

50524
74



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

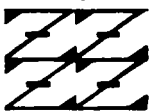
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
" Z A R A G O Z A "

CUANTIFICACION DE MALONDIALDEHIDO POR EL
METODO DE LIPOPEROXIDACION DURANTE LA INFECCION
PRIMARIA POR *Helicobacter pylori* EN JERBOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
ALMA LIDIA OLIVARES CERVANTES

U N A M
F A C U L T A D
D E E S T U D I O S
S U P E R I O R E S
Z A R A G O Z A



LO FUNDAMOS EN
1973 PARA
DEMOSTRAR NUESTRA
REFLEXION

DIRECTOR: DRA. LUZ ELENA ESPINOSA DE LOS MONTEROS PEREZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON
VALIA DE ORIGEN

2003



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.

DEDICATORIA

CON MUCHO CARIÑO Y RESPETO LES DEDICO MI TESIS A;

MI PAPA, POR SER LA PERSONA QUE SIEMPRE ME PREDICO
CON EL EJEMPLO DE VIVIR SIEMPRE EL PRESENTE, LUCHANDO POR
UN FUTURO MEJOR.

A MI MAMA POR INCULCARMEN CONSTANTEMENTE EL DESEO
DE SEGUIR PREPARÁNDOME.

A MIS HERMANAS; ANI Y BECKI QUE SIEMPRE ME
BRINDARON SU APOYO EN TODO MOMENTO.

A MI TIA LULU A LA QUE LE AGRADEZCO EL SER COMO OTRA
MADRE PARA MI, Y EL HACER SUYOS MIS LOGROS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

Gracias Dios por darme la capacidad de terminar una etapa mas en mi vida, por que me has colmado de bendiciones dándome una familia y amigos que me brindaron amor y apoyo.



Abuelita Mati: No existen palabras que describan lo mucho que te quiero, y admiro tu entereza frente a la vida, gracias por tener siempre un lugar en tu casa y en tu corazón para mí.



Tía Chela: Gracias por tu apoyo y comprensión en todo este tiempo.



Esly y Karla: No hay regalo mas hermoso que una sonrisa, sobre todo si esa sonrisa viene de ustedes. El ser feliz y disfrutar lo que hoy vivimos, es el secreto del éxito del mañana.



Lalo: A pesar de que existieron muchos obstáculos en esta carrera, y tu sabes que no solo me refiero a la Licenciatura, nunca dejaste que me diera por vencida, y me enseñaste a disfrutar cada momento. Te quiero mucho.



Larrid: En la vida se conoce poca gente a la que se le puede llamar amigo, tu eres de esas pocas personas, con mucho corazón. Gracias por tu amistad y apoyo.

Laura: Gracias por brindarme tu amistad y confianza. Espero que cuando seas una gran investigadora me des trabajo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A LA DOCTORA LUZ ELENA POR DARMER LA OPORTUNIDAD DE TRABAJAR CON ELLA.

A LA M. EN C. NORMA VELÁZQUEZ, POR BRINDARME SU ASESORAMIENTO Y AMISTAD, EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A TODOS, A Y A CADA UNO, DE LOS QUE CONFORMAN EL EQUIPO DEL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA INTESTINAL DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 ANTECEDENTES.....	3
2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS	
2.2.1 Morfología.....	4
2.2.2 Requerimientos nutricionales.....	5
2.3 FACTORES DE VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD	
2.3.1 Factores de adherencia.....	6
2.3.2 Factores de colonización y permanencia dentro del hospedero....	7
2.3.3 Daños ocasionados en el proceso patógeno.....	10
2.4 ETIOLOGÍA.....	11
2.5 PATOGENÉISIS.....	12
2.5.1 DAÑO OXIDATIVO.....	16
2.5.2 Lipoperoxidación.....	17
2.5.3 Determinación de malondialdehido (MDA).....	18
2.6 MODELO ANIMAL.....	18
2.7 DIAGNÓSTICO.....	20
2.8 TRATAMIENTO.....	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
4. OBJETIVOS	
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	25
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
5. HIPÓTESIS.....	26
6. MATERIALES Y EQUIPO	
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO	27
6.2 MATERIAL DE LABORATORIO.....	27
6.3 REACTIVOS.....	28
6.4 EQUIPO.....	29

7. MÉTODOS

7.1	INFECCIÓN DE JERBOS POR ADMINISTRACIÓN INTRAGÁSTRICA.....	31
7.2	CUANTIFICACIÓN DEL INÓCULO.....	31
7.3	SACRIFICIO Y DISECCIÓN DEL ESTÓMAGO DE LOS JERBOS.....	32
7.4	CULTIVO.....	33
7.5	LIPOPEROXIDACIÓN.....	33
7.5.1	Curva patrón.....	33
7.6	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	34
7.7	ELISA.....	35
7.8	PRUEBA ADICIONAL CONFIRMATORIA.....	36
8.	RESULTADOS.....	37
9.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	48
10.	CONCLUSIONES.....	52
11.	PERSPECTIVAS.....	53
12.	ANEXOS.....	54
13.	REFERENCIAS.....	56

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATCC	Cepas de la American Type Culture Collection
BHI	Infusión cerebro corazón
CagA	Proteína asociada a la citotóxina
CG	Cáncer gástrico
DOC	Solución de desoxicolato de sodio
IL-8	Interlucina 8
INOS	Óxido nítrico sintasa
LPS	Lipopolisacarido
MDA	Malondialdehido
OPD	o- phenylenediamine dihydrochloride
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PMN	Polimorfonucleares
p/v	relación peso volumen
PUFAs	Ácidos grasos piliinsaturados
ROS	Radicales reactivos de oxigeno
SOD	Superoxido dismutasa
TBA	Ácido tricloroacético
TCA	Ácido tiobarbitúrico
UFC	Unidades formadoras de colonia
VacA	Toxina vacuolizante

1. INTRODUCCIÓN

A través de estudios epidemiológicos y recientemente en modelos animales, se ha establecido que *Helicobacter pylori* juega un papel importante en la infección y origen de carcinogénesis gástrica, sin embargo, aún se desconoce él o los mecanismos mediante los cuales, el microorganismo induce tal evento. En 1994 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud clasifica a *Helicobacter pylori* como carcinógeno de clase I.

Se conoce que en países en desarrollo, el 60% de su población infantil (menores de 10 años) está infectada con *H. pylori*, mientras en los países desarrollados menos del 20%, el mecanismo de transmisión no se ha establecido del todo, encontrando gran similitud con las enterobacterias, esto es; oral-oral y oral-fecal, en ambas poblaciones el hacinamiento y la pobreza son factores muy relacionados con la infección. En México, se han observado regiones de mayor riesgo, como las zonas altas del estado de Chiapas donde existen grupos indígenas que presentan una elevada incidencia de cáncer gástrico asociado al microorganismo.

H. pylori presenta una maquinaria compleja, la cual le permite adherirse, colonizar y permanecer en el epitelio gástrico, induciendo a gastritis asociada a infección, esto da lugar a una respuesta inflamatoria que es mediada por polimorfonucleares y macrófagos principalmente, ocasionando destrucción celular por las especies reactivas de oxígeno liberadas, lo que desencadena en el paciente desde gastritis péptica ulcerosa hasta carcinoma gástrico, esto ha sido identificado mediante pruebas histopatológicas en biopsias humanas.

La infección con *Helicobacter pylori* induce una respuesta inflamatoria que genera una serie de radicales libres, o sustancias reactivas de oxígeno, las cuales oxidan lípidos (ácidos grasos poliinsaturados), reaccionando con la capa lipídica

PAGINACIÓN DISCONTINUA

de las membranas celulares, generando intermediarios como el malondialdehído (MDA), proceso que causa una alteración de gradientes de iones transmembranales, desequilibrio de funciones secretoras e inhibición de procesos metabólicos, todo esto conlleva a una muerte celular, también el MDA reacciona con el ADN formando aductos, que están involucrados en la mutagénesis y/o carcinogénesis, en el proceso de la infección. Estudios recientes han determinado la presencia de aductos en biopsias de pacientes con gastritis y úlcera péptica infectados con *Helicobacter pylori*, sin que hasta el momento se conozca la relación que existe entre el proceso inflamatorio inducido por la infección y la lipoperoxidación. La evaluación de la peroxidación lipídica durante el proceso de la infección, como uno de los mecanismos asociados a la mutagénesis y/o carcinogénesis permitirá implementar alternativas para reducir el peligro de padecer la enfermedad relacionada con la infección.

Es necesario emplear un modelo animal que sea semejante a lo que ocurre en humanos por lo que se han estudiado diferentes modelos, sin embargo, se ha observado que el jerbo desarrolla una respuesta inmune, procesos inflamatorios graves y cáncer gástrico, como ocurre en el humano, lo que lo hace un modelo ideal, para el estudio de dicha infección.

El objetivo de este trabajo es evaluar la lipoperoxidación, generada durante la infección primaria con *Helicobacter pylori* en jerbos de 4 a 6 semanas de nacidos, se cuantificará la concentración del malondialdehído por el método de lipoperoxidación, en los animales infectados por vía intragástrica con una cepa de *H. pylori* ATCC (Cepas de la American Type Culture Collection) 43504, identificando la infección por serología, cultivo, prueba de la urea, y estudio histopatológico, sacrificando a los animales por dislocación cervical al tiempo 0, 1, 2, 4, y 6 meses después de inducida la infección.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

En 1979 el patólogo Robin Warren observó por primera vez en una biopsia gástrica aislada de un paciente con gastritis crónica activa, a un bacilo, el cual sería llamado mas tarde; *Helicobacter pylori*, este fue aislado hasta 1982, y en 1983 se asocia con gastritis crónica sugiriendo por primera vez que la úlcera péptica pudiera ser de etiología infecciosa.⁽¹⁾ Dadas sus características en los primeros estudios realizados con esta bacteria, se pensó que podía ser una nueva especie dentro del género *Campylobacter* por su aspecto en la tinción de Gram y su requerimiento microaerofilico, aunque presentaba ciertas características atípicas como la presencia de sus múltiples flagelos unipolares y su gran actividad enzimatica de la urea ⁽²⁾ por lo que se le dio el nombre de *Campylobacter pyloridis*, y en 1987 por razones gramaticales se cambia su nombre a *Campylobacter pylori*, sin embargo, los estudios genómicos modernos, especialmente el análisis de secuencias del ácido ribonucléico ribosomal 16S (ARNr), permitieron demostrar que no se trataba de una nueva especie, sino de un nuevo género al cual se le llamo *Helicobacter* ⁽³⁾ estableciendo que *Campylobacter* y *Helicobacter* eran dos géneros diferentes. ^(2, 4, 5)

Los primeros años de la historia de *Helicobacter pylori* existieron controversias, algunos investigadores le atribuían un papel patogénico en la gastritis duodenal, mientras otros asumían que sólo se trataba de un saprófito. La asociación estadística entre la presencia de *H. pylori* y patología como gastritis o úlceras pépticas arrojaban resultados altamente significativos y cuya información se repetía en distintos países. Otro factor importante fueron los resultados de infecciones experimentales en animales que confirmaron clínica e histopatológicamente la presencia de la bacteria en las zonas afectadas. Todo esto contribuyo para que en 1994 la Conferencia Consenso del Instituto Nacional

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de Salud declaró a *H. pylori* la principal causa de úlcera péptica, y en este mismo año la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud lo clasificó como un agente cancerígeno en humanos. ^(5, 6)

El reservorio de *Helicobacter pylori* es el ser humano, desconociendo hasta el momento otros, su modo de transmisión es controversial, siendo las más aceptadas el contagio directo por contacto de persona a persona por vía oral-oral, oral-gástrica, y fecal-oral. ^(3, 7, 8) Se sabe que es un microorganismo órgano-específico que coloniza el epitelio gástrico, y su colonización no esta asociada con otros tejidos del cuerpo humano. ⁽⁹⁾

2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS

2.2.1 Morfología

Helicobacter pylori es un bacilo gram-negativo, de forma espiral que mide aproximadamente 0.5 por 2.5 micrómetros (*in vivo*), posee de 4 a 6 flagelos en uno de sus polos, con una longitud de 3 a 5 micrómetros cada uno lo que lo hace altamente móvil. ⁽¹⁰⁾ figura 1



Figura 1. Morfología microscópica de *Helicobacter pylori*

Cuando se prolonga el tiempo de cultivo ya sea en medio líquido o sólido se crean formas cocoides del microorganismo. ^(2, 10)

Cuando esta bacteria crece en los medios de cultivo se observan como colonias pequeñas, brillantes y transparentes como gotas de rocío.

2.2.2 Requerimientos nutricionales

Helicobacter pylori es una bacteria exigente y necesita una atmósfera adecuada para crecer; condiciones microaerofilicas con una baja concentración de oxígeno y alta concentración de anhídrido carbónico (5-10%), requiere de un medio de cultivo rico en nutrientes que contenga sangre de carnero, caballo, humana o productos derivados de la sangre, suplementados con antibióticos para evitar contaminación con otros microorganismos; como ácido Nalidixico, Trimetoprim, Vancomicina y Anfotericina B que impiden el crecimiento de un alto porcentaje de cocos, enterobacterias y hongos entre otros. ⁽⁴⁾

Los medios mas empleados son; Agar base Casman, Agar base Campylobacter, que contiene GC-Agar Base, Agar Bacto más sangre de caballo y antibióticos para evitar el crecimiento de otros microorganismos, ya que el medio al ser altamente rico en nutrientes es muy fácil que se contamine, por lo que de esta forma se protege ⁽¹¹⁾.

Con respecto a los medios de transporte existen artículos que reportan un aislamiento en medios como el Stuart ⁽¹¹⁾, y otros que reportan que no es apto para el aislamiento, que el caldo de brucella o caldo BHI con sangre de caballo o solución amortiguadora de fosfatos enriquecido, son los que mejor conservan la viabilidad de la bacteria ⁽¹²⁾.

Para su primoaislamiento se requiere de un periodo de incubación extraordinariamente prolongado (de 5 a 7 días a 35° C) comparado con el resto de las bacterias Gram negativas. *H. pylori* puede conservarse una vez crecido, en un congelador a -80° C o en nitrógeno líquido ^(4, 12).

2.3 FACTORES DE VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD

2.3.1 Factores de adherencia

Helicobacter pylori se adhiere a receptores, en el epitelio gástrico por medio de adhesinas específicas, su estudio e identificación es complicada, dada su variabilidad, estas pueden ser clasificadas directamente o por caracterización de los receptores celulares. Esto conlleva a una versatilidad en la unión de diferentes cepas del microorganismo al epitelio gástrico. Una de estas adhesinas es la hemoaglutinina, que se a estudiado por su habilidad de aglutinar eritrocitos, pero este factor no es suficiente para que este pueda colonizar otros tejidos o causar una bacteremia ⁽¹⁰⁾.

Aunque la mayoría de los microorganismos se encuentran libres en la mucosa gástrica, una porción aparece adherida a las células epiteliales del tejido gástrico gracias a las adhesinas, las cuales reconocen de forma específica a receptores de la mucosa gástrica uniéndose a ellos y comenzando la colonización bacteriana ^(13,14). La heparina y proteoglicanos participan en la adhesión molecular, recientemente se a observado que *H. pylori* tiene una afinidad elevada a glicosaminoglicanos semejantes a la heparina. Los proteoglicanos son importantes en el funcionamiento celular, coagulación sanguínea, adhesión celular y acción de las citosinas. La adhesión se lleva a cabo por mecanismos, como interacciones electrostáticas, seguidas de una adherencia ⁽¹⁵⁾. figura 2

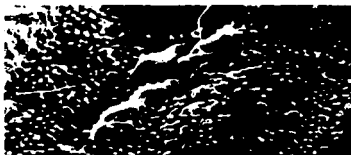


Figura 2. Presencia de adhesión al epitelio gástrico de *Helicobacter*

En las células epiteliales del estómago se forman pedestales por la activación de tirosinas que juegan un papel muy importante en la señalización de transducción en las células eucariotas, este mecanismo es raro en bacterias. En el caso de *Helicobacter pylori* contiene una proteína *CagA* que es mostrada a las tirosinas y ocasiona una polimerización de actina y de la membrana celular, lo cual promueve la penetración de la bacteria a través de la membrana celular, *CagA* es considerada como un antígeno inmunodominante que interviene en la señalización de las células eucariotas ⁽¹⁶⁾.

2.3.2 Factores de colonización y permanencia dentro del hospedero

Helicobacter pylori contiene una maquinaria enzimática que le ayuda a crear las condiciones adecuadas en el estómago, para poder colonizarlo y permanecer. El estómago tiene un pH ácido, por lo cual este microorganismo posee una enzima llamada **ureasa** que hidroliza la urea produciendo amoníaco y dióxido de carbono, con lo que neutraliza el ambiente y le permite colonizar el epitelio ⁽⁶⁾. figura 3

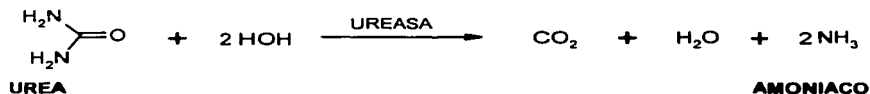


Figura 3. Reacción de hidrólisis de la urea por acción de la ureasa

La ureasa es una molécula de un peso molecular de 550 KDa y esta formada por 2 subunidades *Ure A* y *Ure B*, es una de las proteínas más abundantes en la bacteria, constituye un 5% del total de las proteínas que la

conforman, la ureasa requiere de 2 iones de níquel (Ni^{2+}) que se fijen en un sitio activo para que lleve a cabo su función de neutralizar el pH gástrico.^(6, 10)

El amoniaco generado durante la hidrólisis de urea contribuye significativamente al daño histológico asociado con la infección, el amoniaco no es tóxico, sino que el daño es el resultado del ión hidróxido generado por el equilibrio del amoniaco con el agua, éste desdobra el moco gástrico, haciéndolo más fluido, con lo cual la bacteria puede desplazarse más fácilmente para ganar espacios intercelulares.^(6, 10)

Otra enzima que produce *H. pylori* es la **catalasa**, que descompone el peróxido de hidrógeno, en agua y oxígeno impidiendo que las células blancas del sistema inmune las destruyan a través de la liberación del H_2O_2 ^(13, 14).

H. pylori posee otras características que le permiten colonizar la mucosa gástrica del estómago, inducir daños en los tejidos o evadir los mecanismos de defensa del huésped. Entre las características de virulencia se encuentran: la **estructura espiral y motilidad** de la bacteria, que le permiten introducirse a través de la capa de moco gástrico, atravesando la primera barrera de defensa del huésped, actuando de forma similar a un sacacorchos, lo que favorece al acercamiento a las células epiteliales gástricas.^(13, 14)

El **lipopolisacarido (LPS)** que *H. pylori* posee contiene un antígeno muy similar a los carbohidratos de Lewis "x" (Le^x) o Lewis "y" (Le^y) o ambos, que están presentes en el grupo sanguíneo tipo "O" y en la superficie de las células epiteliales gástricas, esto le permite colonizar el epitelio gástrico no siendo reconocido como extraño en un inicio, este factor de virulencia puede producir un mimetismo molecular el cual ayuda al microorganismo a evadir la respuesta inmune. Sin embargo, puede provocar una respuesta autoinmune contra los

antígenos de Lewis que expresan *H. pylori*, que son compartidos por las células epiteliales sanas de la mucosa gástrica ^(2, 6).

La toxina vacuolizante es otro factor importante que produce la formación de grandes vacuolas en las células eucarióticas. Este efecto lo producen más de la mitad de los aislamientos clínicos de *H. pylori* y aquellos que poseen la toxina se han asociado con los cuadros más graves de enfermedad. Se han reportado tres mecanismos de acción de la citotóxina, el primero; la formación de grandes vacuolas en el citoplasma de las células epiteliales, que se originan a nivel perinuclear hasta llenar completamente el citosol de la célula y causar su muerte, dado que estas se acidifican por la actividad de una bomba de protones debido a una ATP-asa de tipo vacuolar unida a la membrana de estas vesículas, la citotóxina *VacA* es capaz de alterar el tráfico transmembranal, de proteínas y ligandos causando un deterioro en la degradación proteolítica dentro de los lisosomas, ocasionando una disfunción letal para la célula.

El segundo mecanismo de acción, es el aumento en la permeabilidad de las membranas celulares, al paso de moléculas de bajo peso molecular, aumentando así el flujo de nutrientes del interior de la célula hacia la submucosa favoreciendo la sobrevida de *Helicobacter pylori*.

El tercer mecanismo de acción es la formación de canales a través de la capa de lípidos de la membrana celular, el aumento en la conductividad de iones en las membranas ocasiona cambios osmóticos que aumentan la entrada de agua y por consiguiente, un hinchamiento del compartimiento endosomal y finalmente la muerte celular.⁽⁶⁾

Un factor de virulencia importante es una proteína de membrana externa denominada **Proteína Asociada a la Citotóxina (CagA)** la cual es codificada por el gen *CagA*, es altamente inmunogénica y su función no se conoce del todo ⁽⁶⁾, aunque podría estar implicada en el proceso de activación de la toxina vacuolizante. La presencia de esta proteína podría influir en la respuesta

inflamatoria y aumentar la secreción de interlucina 8. Algunos autores han observado una clara diferencia en cuanto al proceso de enfermedad que se produce cuando se trata de una cepa *CagA+* o *CagA-*, sin embargo, para otros autores la diferencia no es tan importante ^(13, 14).

2.3.3 Daños ocasionados en el proceso patogénico

- a) Inflamación gástrica
- b) Disturbios en la barrera de la mucosa
- c) Alteraciones histológicas

La inflamación gástrica inducida por el microorganismo está mediada por la secreción de interlucina 8 (IL-8) la cual recluta y activa neutrófilos CD11 y CD18 a las células endoteliales y un factor activador de plaquetas, altamente ulcerogénico ⁽⁹⁾.

Los disturbios ocasionados por *Helicobacter pylori*, en la barrera de la mucosa gástrica esta mediada por la producción de diversas enzimas; la fosfolipasa que rompe la membrana apical de las células, la mucinasa que contribuye al deterioro de la mucosa y la superóxido dismutasa que produce radicales reactivos de oxígeno (ROS), capaces de inducir daños a macromoléculas como proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos ⁽¹⁰⁾.

Altera la fisiología de las células gástricas, al incrementar la liberación por parte de los macrófagos, de productos como el óxido nítrico dado por la óxido nítrico sintasa (*iNOS*), cuyo resultado es el incremento de óxido nítrico, e inhibición de las enzimas reparadoras durante la proliferación celular.

2.4 ETIOLOGÍA

Los estudios epidemiológicos han demostrado que la infección por *H. pylori* ocurre en la población mundial. Se estima que en los países en desarrollo la mayoría de las personas (80% aproximadamente) se infectan con *H. pylori* a una edad promedio de 10 años, además de la edad, otros factores de riesgo importantes son las carencias socioeconómicas, que engloban; el hacinamiento, la vivienda insalubre, el agua contaminada, promiscuidad y la consanguinidad ^(7, 10).

Sin embargo, la incidencia de la infección entre países desarrollados y en vías de desarrollo es significativamente diferente. Por ejemplo, en Estados Unidos la incidencia anual de infección se presenta en el 50% de los adultos, con un promedio de edad de 60 años. Por otro lado, en el grupo de afro-americanos, hispanos e indios nativos de ese país, la infección por el microorganismo se observa desde edades tempranas y la transmisión intrafamiliar es alta, lo cual nos demuestra que las carencias socioeconómicas influyen en la transmisión del microorganismo.

El cáncer gástrico (CG) ocupa el 2° lugar por mortalidad a nivel mundial y la prevalencia de la infección por *H. pylori* y la incidencia de CG están relacionados con los aspectos socioeconómicos de la población, encontrando a través de distintos estudios serológicos una estrecha relación entre la alta prevalencia de anticuerpos contra *H. pylori* y la elevada incidencia de CG. ⁽¹⁷⁾ La mortalidad por cáncer de estómago tiene una tendencia decreciente en la mayoría de los países desarrollados del mundo, en comparación con países subdesarrollados en los que los servicios como drenaje, y agua potables no son accesibles para todos, causando un mayor índice de gente infectada por *H. pylori* y/o muerte por CG ^(17, 18).

En México se han observado regiones de mayor riesgo, como las zonas altas del estado de Chiapas donde existen grupos indígenas que presentan una elevada incidencia de cáncer gástrico asociado al microorganismo ⁽⁵⁾.

Algunos posibles progresos de esta situación son; un mejor diagnóstico y registro de nuevos casos, la presencia de factores de riesgo potenciales, principalmente de tipo dietético, que en la población mexicana no han sido modificados, así como el desconocimiento de la magnitud de la infección por *H. pylori*.

Para detener o revertir la tendencia de la mortalidad observada se requerirá eventualmente de la implementación de programas de promoción de la salud que permitan reducir la exposición a los factores de riesgo nacionales, y de investigación que proporcione mayor información sobre la etiología del cáncer de estómago, su diagnóstico y tratamiento ^(17, 18).

2.5 PATOGÉNESIS

H. pylori se ha asociado a diferentes enfermedades del tracto digestivo, como úlceras gastroduodenales y cáncer gástrico, siendo la principal causa de úlceras pépticas, estas lesiones se observan como nodularidades en la mucosa del antro con apariencia de parches ⁽²⁰⁾, aunque también existen pacientes colonizados por la bacteria en los que, no se observan manifestaciones clínicas, permaneciendo asintomáticos ^(1, 12).

Una úlcera péptica es una llaga o herida en la mucosa del estómago (úlceras gástricas) o en la parte superior del intestino delgado (úlceras duodenales). Las úlceras se desarrollan cuando los jugos digestivos dañan la capa que reviste el estómago o el duodeno. Los jugos digestivos, especialmente el ácido clorhídrico y la enzima pepsina, se producen en el estómago, el intestino y las glándulas digestivas; estos descomponen y digieren los almidones, las grasas y las proteínas de los alimentos.

La infección por *H. pylori* produce anomalías importantes, en la secreción de hormonas gastrointestinales, como el incremento de los niveles de gastrina, así como el aumento del pico de secreción ácida observada en los individuos

portadores, que juega un rol de importancia en pacientes que padecen de úlcera duodenal. Este fenómeno podría ser debido a una hipergastrinemia persistentemente elevada la cual produciría un incremento en la masa de células parietales; lo que es característicos en los pacientes con úlcera duodenal. El fenómeno de hipergastrinemia se explica a través del hipotético mecanismo de gastrin-link que consiste en que el sector de la mucosa gástrica colonizada tiene una mayor alcalinidad, debido a la producción de amonio lo que genera a nivel local un falso mensaje que el organismo interpreta como una falta de secreción, estimulando a las células productoras de gastrina a una mayor liberación de la hormona ⁽¹⁹⁾. El estómago y el duodeno están formados especialmente por proteínas que pueden ser dañados por estos ácidos y enzimas.

Para protegerse contra estas potentes sustancias, el cuerpo cuenta con algunos sistemas defensivos como la capa mucosa, que recubre el estómago y el duodeno, forma la primera línea de defensa.

El cuerpo secreta bicarbonato a la capa mucosa, que neutraliza el ácido, y unas sustancias parecidas a hormonas llamadas prostaglandinas que ayudan a mantener los vasos sanguíneos del estómago dilatados, asegurando un buen flujo sanguíneo y protegiendo contra las lesiones, si se altera alguno de estos mecanismos de defensa, el ácido y la pepsina pueden atacar la mucosa del estómago, y producir úlceras.

Como se observa en la figura 4, la forma de tornillo de *H. pylori* le permite penetrar en la membrana mucosa del estómago o el duodeno para poder adherirse. La bacteria sobrevive a este entorno tan ácido produciendo ureasa, una enzima que neutraliza el ácido generando amonio, también produce una serie de toxinas que causan inflamación, daños en la mucosa y cambios en el sistema inmune, que permite que persista durante la vida de una persona.⁽¹⁰⁾

El proceso del daño que causa *H. pylori* se lleva a cabo principalmente cuando el sistema inmune es activado por los factores citotóxicos del microorganismo como el amonio producido por la ureasa, los LPS ubicados en el

antígeno "O", la citotóxina vacuolizantes (*VacA*) que es responsable de la formación de vacuolas en células del epitelio gástrico entre otros ⁽⁵⁾. Estos factores generan una inflamación en el epitelio y tienen un importante efecto quimiotáctico sobre eosinófilos y neutrófilos, esto se puede observar en la figura 4.

La bacteria también se considera una causa importante de gastritis (inflamación del estómago) crónica aguda y duodenitis crónica activa (inflamación del duodeno), y está fuertemente vinculada al cáncer de estómago.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

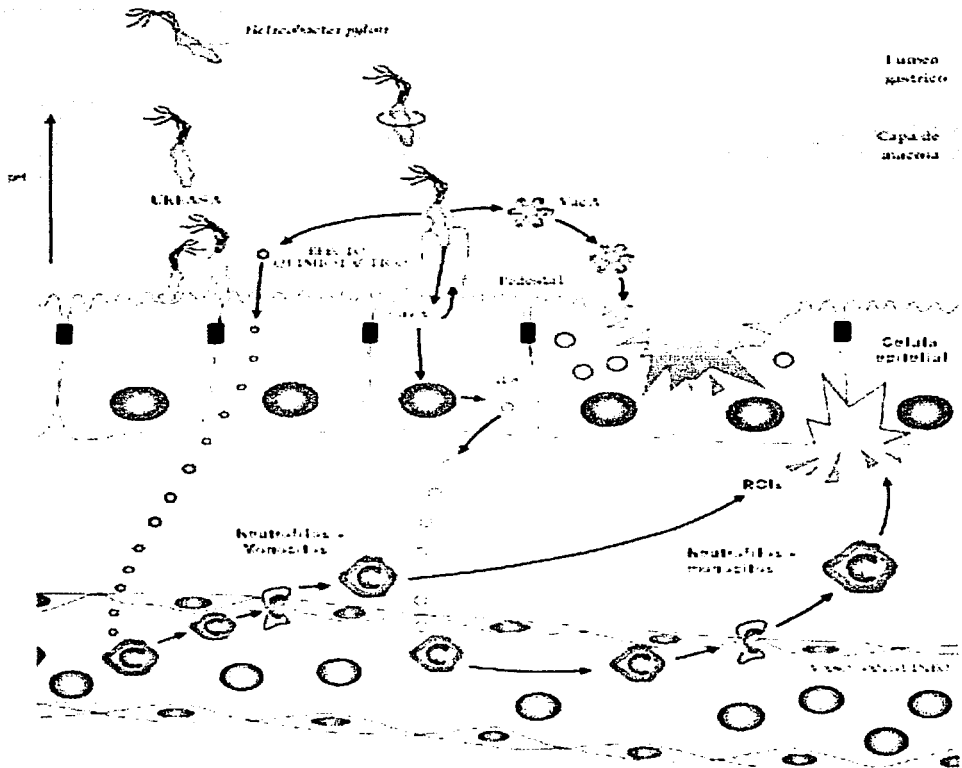


Figura 4. Patogénesis del daño causado por *Helicobacter pylori* en estómago. ⁽²⁴⁾
VacA: Toxina vacuolizante
IL-8: Interleucina 8
ROIs: radicales libres de oxígeno

2.5.1 Daño Oxidativo

Estudios recientes han demostrado que *H. pylori* induce la producción de radicales de oxígeno en epitelio gástrico generando daños en la membrana de las células ⁽²¹⁾, lo que activa la respuesta inmune y da inicio a la migración de los PMN que son activados por IL-8 procedente de las propias células epiteliales después de la adhesión bacteriana, estos liberan proteasas y metabolitos reactivos de oxígeno (O₂) provocando un estallido oxidativo (estrés oxidativo) en las células del epitelio gástrico, lo que origina la oxidación de biomoléculas. La mayoría de las biomoléculas pueden ser atacadas por radicales libres, siendo más susceptibles los lípidos encontrados en la membrana celular del epitelio gástrico, (la fuente más rica de ácidos grasos poliinsaturados), a la destrucción oxidativa de estos se le llama lipoperoxidación, ⁽²²⁾ y da origen a la formación de compuestos como el malondialdehído (MDA), que al reaccionar con el ADN forman aductos, ⁽²³⁾ induciendo finalmente mutagénesis todo ello en el proceso de la infección. ⁽¹⁰⁾

2.5.2 Lipoperoxidación

La membrana celular es una fuente rica de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), los cuales son atacados por oxidación de radicales libres de oxígeno, la destrucción oxidativa de PUFAs esta dada por la Lipoperoxidación, lo que da origen a radicales peróxidos de ácido grasos ($\text{OH}\cdot$ $\text{LO}\cdot$ $\text{LOO}\cdot$), que ha su vez oxidan nuevas moléculas de PUFAs e inician nuevas cadenas, produciendo más peróxidos de ácidos grasos, todo este proceso genera aldehídos como el MDA principalmente ⁽²²⁾. figura 5

Este proceso provoca una alteración de gradientes de iones transmembranales, desequilibrio de funciones secretoras e inhibición de procesos metabólicos celulares de integración, todo esto conlleva a una muerte celular, además el MDA reacciona con el ADN de las células epiteliales, formando aductos induciendo mutagénesis y/o carcinogénesis ⁽²⁴⁾.

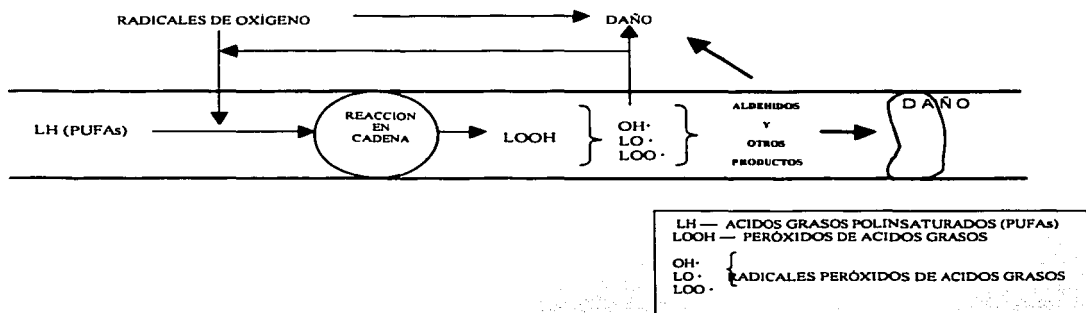


Figura 5. Efecto de los radicales libres de oxígeno sobre ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).⁽²⁵⁾

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5.3 Determinación de malondialdehído (MDA)

Existen diversos ensayos que cuantifican la lipoperoxidación, uno de ellos es la modificada por Weinberg y col., que es una técnica colorimétrica en la que se hace reaccionar ácido tiobarbitúrico (TBA) con MDA en un medio ácido, dando como producto una sustancia colorida que es medible a 532 nm.^(25,26) figura 6

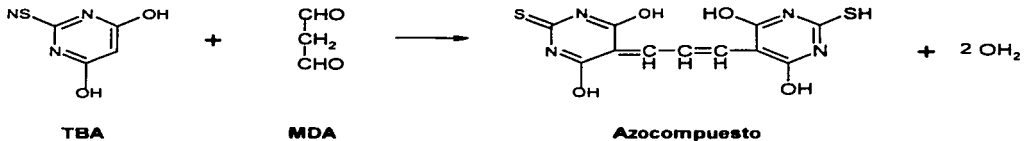


Figura 6. Reacción de la determinación de MDA con TBA.⁽²⁵⁾

2.6 MODELO ANIMAL (Jerbos de Mongolia)

Se han realizado estudios experimentales en diferentes modelos animales como; hámsteres, perros, ratas, ratones, gatos, en los cuales se ha observado el daño inflamatorio que causa el microorganismo^(27,28), sin embargo, ninguno de estos cumple con las características del jerbo que fueron demostradas en 1996 cuando se realizaron los primeros estudios en Japón por Hirayama, F., S. Takagi, Matsumoto y colaboradores, en los que se manifiesta la similitud de la infección de *H. pylori* entre Jerbos y humanos⁽²⁸⁾.

Se ha observado que el Jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) presenta cambios histopatológicos en la mucosa gástrica muy semejantes a los

que se presentan en el humano cuando son infectados con *H. pylori*, así también una gran similitud en la respuesta inmunológica ⁽²⁹⁾. figura 7



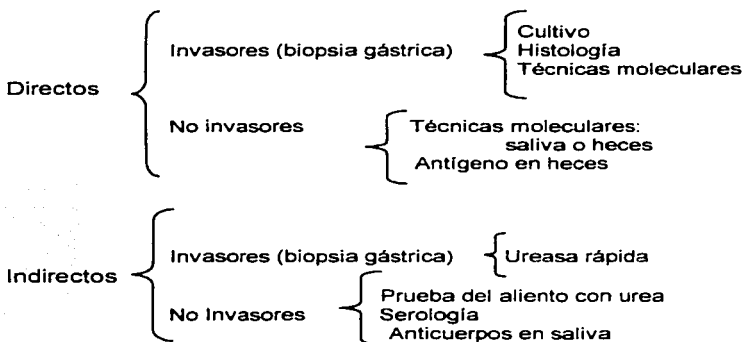
Figura 7. Jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.7 DIAGNÓSTICO

Existen diferentes métodos para diagnosticar la infección producida por *H. pylori*. Los métodos pueden diferenciarse según el tipo de muestra que se utiliza, clasificándose en invasores o no invasores, y a la forma de detectar el microorganismo; directamente a la bacteria, o de forma indirecta a sus metabolitos.

Los principales métodos de diagnóstico utilizados en la infección por *H. pylori* son los siguientes:



El **cultivo** es una de las pruebas más empleadas para la identificación de la infección causada por *H. pylori*, el éxito para cultivar la bacteria depende en gran parte de la manera en la cual se prepara la biopsia previo a su inoculación. Un porcentaje importante de casos puede resultar negativo si no se emplean medios selectivos como agar base Casman con antibióticos, también se utilizan para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos utilizados para su erradicación, y para caracterizar o tipar a *H. pylori* ⁽³⁰⁾.

La **histología** ofrece información sobre la densidad de la colonización de *H. pylori* el cual se presenta como un bacilo curvo o espiral en forma de alas de

gaviota, adyacente al epitelio gástrico y a la capa de moco, se puede emplear la tinción de hematoxilina-eosina si el patólogo cuenta con la experiencia para identificarla, pero se debe utilizar tinciones especiales, como la de plata de Warthin-Starry, Giemsa o la de naranja de acridina, las cuales tienen una sensibilidad de 90%, para esta prueba generalmente se emplean 2 biopsias del antro gástrico para un buen diagnóstico, otra ventaja es que nos permite evidenciar la gravedad de la gastritis, y la presencia de leucocitos polimorfonucleares, metaplasias y de atrofas ^(30,31).

Las **técnicas moleculares** permiten detectar el ADN de *H. pylori* de diferentes tipos de muestras, identificando principalmente sus genes *CagA*, *VacA* y *Ure*, así también de posibles factores de patogenicidad, la presencia de mutaciones en los genes que codifican la resistencia a los antimicrobianos y las posibles infecciones mixtas por diferentes cepas de *H. pylori* en el mismo paciente ⁽³²⁾.

La **ureasa rápida** permite detectar la presencia de la ureasa de *H. pylori*, directamente de la biopsia en poco tiempo. La detección del **antígeno en heces** es un método en investigación que parece presentar una muy buena sensibilidad y especificidad y sería un método no agresivo para detectar la infección por *H. pylori*.

Prueba del aliento con urea se basa en la capacidad que tiene *H. pylori* de hidrolizar la urea gracias a su enzima ureasa, después de ingerir urea marcada, con carbono 14 o con carbono 13, se puede medir la cantidad de CO₂ marcado liberado, que se producirá cuando el paciente está infectado con *H. pylori*, ^(4, 5, 10)

El método de **ELISA**, es especialmente útil para detectar la infección por esta bacteria en los pacientes, aunque pueden presentarse resultados falsos negativos sobre todo en niños, ancianos y sujetos inmunocomprometidos que no

han desarrollado una respuesta inmunológica adecuada a la infección. Todas las pruebas serológicas (sobre todo si son comerciales) deberán de evaluarse en forma independiente en la población a estudiar, mediante pruebas contra un panel de sueros de pacientes *H. pylori* negativos (control) de la misma población para establecer el valor de corte. La prueba con saliva no es tan sensible ni tan específica como las basadas en suero, y la prueba con jugo gástrico esta en espera de validación adicional ⁽⁵⁾.

2.8 TRATAMIENTO

Durante muchos años se han utilizado, para el tratamiento de úlceras, diferentes medicamentos que neutralizan o inhiben la secreción ácida del estómago; los *antisecretores* y los *inhibidores* del ácido.

Los primeros (cimetidina, ranitidina y famotidina) conseguían, a las dosis adecuadas, cicatrizar las úlceras en cerca del 90% de los casos tras un tratamiento de 4 a 8 semanas, según la localización y tamaño de la úlcera. Con la aparición de los potentes inhibidores del ácido (omeprazol, lansoprazol y

pantoprazol) se consigue la cicatrización de la úlcera de estómago y duodeno casi en el 100% de los casos.

El problema con cualquiera de estos tratamientos era que la úlcera, una vez cicatrizada, solía reproducirse (se reactivaban más del 80% de las úlceras de duodeno al año). Estas recaídas, por otra parte, se asocian a una mayor incidencia de complicaciones ulcerosas, como la hemorragia o la perforación, por lo que se podría hablar de *cicatrización* pero no de *curación* de la enfermedad ulcerosa.

Se deben utilizar tratamientos combinados ya que la monoterapia no ha demostrado utilidad clínica. Se pueden emplear pautas dobles, triples o incluso

cuádruples. Las pautas dobles alcanzan porcentajes de erradicación más bajos y generalmente se recomienda pauta triple: Las pautas dobles incluyen un antibiótico y un agente antiulceroso, las triples asocian dos antibióticos y un agente antiulceroso y en las cuádruples se administran dos antibióticos y dos agentes antiulcerosos.

Entre las pautas más utilizadas para el tratamiento de la infección producida por *H. pylori* se pueden citar:

Inhibidor de la bomba de protones + macrólido (Azitromicina, Claritromicina, Roxitromicina)

Ranitidina + citrato de bismuto + macrólido

Inhibidor de la bomba de protones + Amoxicilina + Macrólido

Sales de bismuto + Metronidazol + Tetraciclina + Antagonista de los receptores H₂

Sales de bismuto + Amoxicilina + Metronidazol

Estas pautas se recomiendan a las dosis habituales y durante un período de 7 a 10 días de tratamiento ^(4, 10).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han realizado estudios epidemiológicos en los que se asocia la infección de *Helicobacter pylori* con cáncer gástrico en humanos, dicho microorganismo presenta una maquinaria compleja, la que le permite adherirse, colonizar y permanecer en el epitelio gástrico, se conoce que *H. pylori* es capaz de inducir al paciente desde una gastritis péptica ulcerosa hasta adenocarcinomas, esto ha sido identificado mediante pruebas histopatológicas en muestras de biopsia en humanos. *Helicobacter pylori* induce una respuesta inflamatoria que genera una serie de radicales libres o sustancias reactivas de oxígeno, las cuales oxidan lípidos (ácidos grasos poliinsaturados), proceso llamado lipoperoxidación, que se lleva a cabo en mayor porcentaje en la membrana celular, generando intermediarios como el malondialdehído (MDA), este daño a la membrana ocasiona un cambio en el flujo de gradientes lo que ocasiona la muerte de la célula, el MDA al reaccionar con el ADN forma aductos induciendo finalmente a mutagénesis y/o carcinogénesis durante el proceso de la infección, Sin embargo, hay controversia acerca de si existe o no un incremento en los valores de MDA. Diferentes estudios han determinado la presencia de MDA en la infección, pero no se conoce si el proceso inflamatorio, induce de forma constante la liberación de las sustancias reactivas dando lugar a la lipoperoxidación, o van en incremento dependiendo del proceso de infección.

Al establecer el proceso de infección primaria, en animales libres de patógenos específicos, durante el proceso de adherencia, colonización y permanencia del microorganismo, nos permitirá establecer una cinética de daño oxidativo, si fuese el caso. Esto nos permitirá en estudios posteriores evaluar y establecer medidas preventivas para reducir el factor de riesgo para el cáncer gástrico. Empleando al jerbo como modelo para desarrollar la infección por la similitud que presenta respecto al humano.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

- **Cuantificar el malondialdehído por el método de lipoperoxidación con la técnica de Weinberg, durante el estrés oxidativo, inducido por la infección primaria con *Helicobacter pylori* en jerbos.**

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- **Inducción de la infección en el jervo.**
- **Identificación de la infección por varios métodos diagnósticos:**
 - **Ureasa**
 - **Cultivo**
 - **ELISA**
- **Histopatológica; realizada en el Laboratorio. de Patología**
- **Cuantificación de proteínas totales**
- **Evaluación de la lipoperoxidación mediante la cuantificación del malondialdehído.**

5. HIPÓTESIS

Si *Helicobacter pylori* provoca una respuesta inflamatoria local intensa estimulando a PMN y macrófagos a liberar una serie de radicales libres o sustancias reactivas de oxígeno, entonces dará origen a estrés oxidativo en donde se oxidaran lípidos generando intermediarios como el malondialdehído.

6. MATERIALES Y EQUIPO

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepa de *H.pylori* ATCC (Cepas de la American Type Culture Collection) 43504
- **POBLACIÓN**

Jerbos De Mongolia (*Meriones unguiculatus*) de 6 a 8 semanas de edad con un peso aproximado de 50 a 60 gramos pertenecientes a una cepa isogénica, se emplearon 4 camadas de 4 a 5 jerbos cada una, para los diferentes tiempos de sacrificio (tiempo 0, 1, 2, 4 y 6 mes de inducida la infección)

- **CRITERIOS DE INCLUSIÓN.** Jerbos de 6 a 8 semanas de nacidos, libres de patógenos específicos.
- **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.** Jerbos mayores de 8 y menores de 6 semanas de nacidos, que estén infectados con algún microorganismo patógeno.

6.2 MATERIAL DE LABORATORIO

- Cajas Petri de plástico, nuevas y estériles
- Cubre bocas
- Gradillas metálicas para tubos de 10 mm X 75 mm
- Gradillas para tubos Eppendorf
- Guantes de hule látex
- Jeringas de insulina nuevas y estériles
- Jeringas de 10 mL nuevas y estériles
- Cánula
- Tubos Eppendorf de 1.5 µL nuevos y estériles
- Tubos de vidrio y rosca limpios y estériles (20 X 140)

- Tubos de vidrio limpios y estériles (10 X 75)
- Pinzas de disección
- Tijeras de disección
- Puntas para micropipetas: 250 μ L y 1000 μ L
- Placas de ELISA de 96 pozos
- Asas bacteriológicas
- Matraces de vidrio pyrex de 2 L, 1 L, 250 mL
- Piseta de plástico
- Mechero Fisher
- Portaobjetos
- Espátula
- Gasas
- Papel filtro
- Filtros
- Sensidiscos de ácido Nalidíxico y Cefalotina

6.3 REACTIVOS

- Ácido tiobarbitúrico ("BAKER ANALYSED" REACTIVO)
- Ácido tricloroacético ("BAKER ANALYSED" REACTIVO)
- Agua desionizada ("BAKER ANALYSED" REACTIVO)
- Bicarbonato de sodio ("BAKER ANALYSED" REACTIVO)
- Caldo Brucella (BBL)
- Caldo BHI (BBL)
- Carbonato de sodio ("BAKER ANALYSED" REACTIVO)
- Cloruro de potasio (PROD. QUÍMICO MONTERREY)
- Cloruro de sodio ("BAKER ANALYSED" REACTIVO)
- Fosfato de sodio dibásico ("BAKER ANALYSED" REACTIVO)
- OPD (o- phenylenediamine dihydrochloride) (ICN BIOMEDICALS INC.)
- Anticuerpo Ig-G anti-ratón con peroxidasa (SIGMA)

- > Alcohol al 70%
- > Glicerina
- > Éter
- > Suero de caballo
- > Hidróxido de sodio
- > Ácido sulfúrico
- > PBSRojo de fenol
- > KIT DE PROTEÍNAS (SIGMA)
- > Peróxido de hidrógeno
- > Colorantes para la tinción de Gram
- > Metanol
- > Medio de cultivo Casman (DIBICO) con sangre de caballo 5%, con antibióticos:
 - o Ac. Nalidixico 10 mg/L
 - o Trimetroprim 5 mg/L
 - o Vancomicina 3 mg/L
 - o Anfotericina B 2 mg/L
- > Tween 20 ("BAKER ANALYSED" REACTIVO)
- > Urea ("BAKER ANALYSED" REACTIVO)

6.4 EQUIPO

- > Balanza granataria (OHAUS)
 - > Balanza analítica (SAUTER)
 - > Estufa con cámara de CO₂ (SL SHELLAB SHELDON MANUFACTURING)
 - > Centrífuga (IEC CENTRA-8 CENTRIFUGE)
 - > Microcentrífuga (EPPENDORF)
 - > Campana de flujo laminar LABCONCO (PURIFIER CLASS II BIOSAFETY CABINET)
-

- > Micropipetas SEALPETTE Y GILSON (5-50 μ L, 200-1000 μ L, 200 μ L)
- > Vortex (SUPER- MIXER)
- > Homogenizador manual
- > Reciprocating/Orbital (SHERKING INCUBATOR ROSI 1000)
- > Autoclave (AMERICAN CYCLOMATI CONTROL)
- > Refrigerador (OJEDA)
- > Spectrometer UV/VIS (PERKIN ELMER LAMBDA 40)
- > Lector de microplacas (GENIOUS TECAN)

7. MÉTODOS

7.1 Infección de jerbos por administración intragástrica

- a) Se deja en ayuno a los animales por doce horas antes de la inoculación.
- b) Se prepara un inóculo denso de *Helicobacter pylori* con una concentración aproximada de 1.8×10^9 UFC/mL en PBS, a partir de un cultivo masivo realizado en una caja petri con medio de cultivo Casman
- c) A la cepa ATCC (Cepas de la American Type Culture Collection) 43504 previamente caracterizada, se les realizan las siguientes pruebas, antes de ser empleada:
 - Ureasa
 - Resistencia a ácido Nalidíxico
 - Oxidasa
 - Catalasa
 - Sensibilidad a Cefalotina
- d) Con ayuda de una cánula se les administra por vía oral 0.8 mL de NaHCO_3 a las 4 camadas (de 4 a 5 jerbos cada una).
- e) Pasada ½ hora se les administra de la misma forma el inóculo, a cada uno de los jerbos, dejando 5 para controles negativos
- f) Se prolonga el ayuno por dos horas más y se alimenta con comprimidos de Purina y agua *ad libitum*

7.2 Cuantificación del inóculo

- a) Se toma una alícuota de 100 μL del inóculo y se realizan 3 diluciones seriadas en 9.9 mL de caldo brucella.
 - b) 100 μL de la última dilución es disuelta en 0.9 mL y se realizan 4 diluciones seriadas
 - c) 100 μL de cada una de las diluciones son sembradas en forma masiva en cajas con agar Casman con sangre de caballo al 5% suplementado con antibióticos; Ácido nalidíxico, Trimetoprim, Vancomicina y Anfotericina B.
 - d) Se incuban a 37° C en condiciones microaerofilicas (6% de CO_2)
-

- e) Se realiza el conteo de las colonias en las cajas que contengan de 30 a 300 colonias
- f) Se realizan los cálculos para obtener el número de UFC/mL el cual debe de ser aproximado a 1.8×10^9 UFC/mL

7.3 Sacrificio y disección del estómago de los jerbos

- a) Los jerbos son anestesiados con éter, y sacrificados por dislocación cervical.
- b) Se limpia con alcohol la superficie del abdomen
- c) Se extrae sangre por punción cardiaca:
Aproximadamente 1 mL
Se centrifuga y se obtiene el suero
Se guarda a -70° C
- d) Se coloca boca arriba y se desprende la piel realizando una incisión en la parte media del abdomen.
- e) Se realiza un corte en el peritoneo dejando al descubierto las vísceras.
- f) Se extrae el estómago el cual se encuentra en la porción superior izquierda y media de la cavidad abdominal.
- g) Se divide en 3 secciones incluyendo cada una; fondo, cuerpo y antro.
 1. - Una sección se emplea para realizar la prueba de la ureasa.
 2. - La segunda sección se fija en formol al 10% y se lleva al Depto. De Patología del Hospital Infantil de México, para su estudio histopatológico.
 3. - La tercera sección se homogeniza en PBS para realizar lo siguiente:
 - a. Cultivo
 - b. Lipoperoxidación
 - c. Cuantificación de Proteínas

7.4 Cultivo

- a) Hacer una dilución tomando 10 μL del homogenizado mas 990 μL de caldo BHI con antibiótico.
- b) Adicionar 100 μL en placas de agar Casman con sangre y antibiótico
- c) Incubar a 37° C de 5 a 7 días en condiciones microaerófilicas (CO₂ al 6%)

7.5 Lipoperoxidación por la técnica de Weinberg

- a) El tejido se corta y se lava en KCl 0.9 % (0.15M) amortiguada a un pH 7.4
- b) Quitar o remover la grasa y el tejido conectivo, se homogeniza en 10 % p/v en el mismo amortiguador.
- c) El homogenizado se incuba durante 1 hora a 37° C en baño María
- d) A 500 μL de la mezcla de incubación se le agregan 250 μL de TCA 40 % y 250 μL de TBA 0.2%
- e) Los tubos son homogenizados por agitación, y hervidos durante 15 minutos enfriándolos en hielo durante 15 minutos
- f) 500 μL de TCA 70% se agregan a todos los tubos y se homogenizan por agitación
- g) Se incuban a temperatura ambiente por 20 minutos, y se centrifugan a 3,500 rpm
- h) La absorbancia se lee a 532 nm.

7.5.1 CURVA PATRÓN

- a) Se preparan diluciones de Tetraetoxipropano con las siguientes concentraciones: 0.2 nM/mL, 0.4 nM/mL, 0.8 nM/mL, 1.6 nM/mL, 3.2 nM/mL, 6.4 nM/mL, 12.9 nM/mL.
 - b) Se toman 10 μL de cada una de las diluciones y se completan a 500 μL .
 - c) Se sigue el mismo procedimiento que para lipoperoxidación a partir del punto d
-

7.6 Cuantificación de proteínas totales

Técnica realizada con un Kit comercial marca Sigma

- a) Llevar a 1 mL total las muestras con H₂O
- b) Adicionar 0.1 mL de la solución de DOC (solución acuosa de desoxicolato de sodio [1.5 mg/mL]) a las muestras estándar y blanco.
- c) Mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente
- d) Adicionar 0.1 mL de TCA
- e) Mezclar y centrifugar de 5 a 10 minutos a 2000 rpm
- f) Desechar el sobrenadante y disolver el botón con 1 mL de solución de Lowry.
- g) Adicionar 1 mL de H₂O y mezclar
- h) Incubar 20 minutos a temperatura ambiente
- i) Mezclando adicionar 0.5 mL de solución de trabajo
- j) Incubar 30 minutos
- k) Medir Abs a 750 nm, e interpolar el valor, en un gráfico realizado a partir de una curva patrón con albúmina sérica bovina

PROTEINAS mL	AGUA mL	CONCENTRACIÓN [$\mu\text{g/mL}$]
0.125	0.875	50
0.250	0.750	100
0.500	0.500	200
0.750	0.250	300
1.000	0	400
0	1.000	blanco

PROTEINAS; Albúmina sérica bovina, con una concentración de 400 $\mu\text{L/mL}$.

7.7 ELISA

Obtención del antígeno

1. A partir de una suspensión de *Helicobacter pylori* en PBS sonicar 3 veces por 30 segundos a 60 decibeles, con periodos de reposo de 30 segundos
2. Centrifugar a 40,000 rpm por 60 minutos a 4° C
3. Separar el sobrenadante
4. Cuantificar proteínas totales de membrana y citoplasmáticas, principalmente a la proteína *CagA* que es reportada como el mayor inmunogeno durante la infección.

Técnica de ELISA para titular anticuerpos séricos obtenidos por punción cardíaca

- a) Diluir el antígeno a una concentración de 10 µg/mL en amortiguador de bicarbonatos pH 9.6 y agregar 100 µL a cada pozo de la placa
- b) Incubar toda la noche a 4° C
- c) Lavar 3 veces con PBS-Tween 20 (0.05%)
- d) Bloquear con 200 µL de albúmina sérica bovina 1% en PBS-Tween 0.05% por 2 horas a temperatura ambiente
- e) Lavar 3 veces con PBS-Tween 20 (0.05%)
- f) Adicionar 100 µL del anticuerpo diluido 1:50
- g) Incubar 2 horas a temperatura ambiente
- h) Lavar 3 veces con PBS-Tween 20 0.05%
- i) Adicionar 100 µL de anticuerpo Ig-G anti-ratón con peroxidasa, diluido 1:700 en solución de PBS-albumina 1%
- j) Lavar 3 veces en PBS-Tween 20 (0.05%)
- k) Adicionar 100 µL de OPD;
5.4 mg OPD en 10 mL de buffer de citratos mas 4 µL de agua oxigenada.
- l) Incubar en oscuridad por 15 minutos
- m) Adicionar 20 µL de H₂SO₄ 2 N
- n) Leer la placa a 450 nm

7.8 Prueba adicional confirmatoria

- Estudio histopatológico realizado en el Departamento de Patología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez".

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9. RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los porcentajes de infección en los diferentes lotes de jerbos infectados, sacrificados al tiempo 0, 1, 2, 4, y 6 meses, así como los valores de los controles negativos que no recibieron ninguna dosis de *Helicobacter pylori*, a los que se les realizaron cuatro pruebas para identificar la presencia de *H. pylori* en estómago.

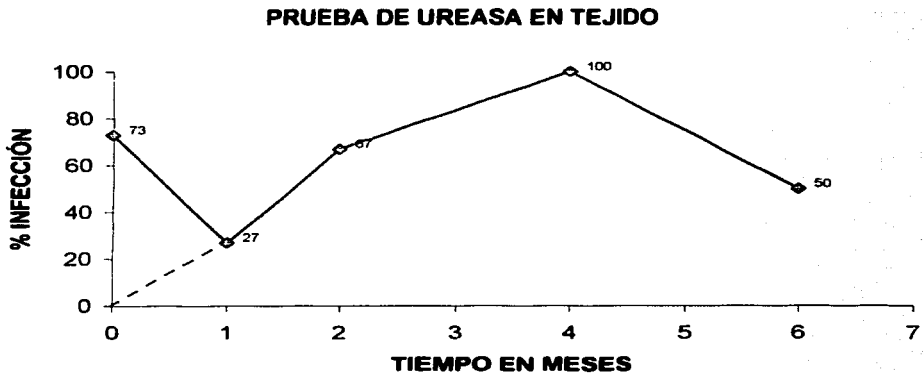
TABLA 1 Porcentaje de infección de diferentes pruebas de jerbos mongolianos inoculados con 1.8×10^9 UFC/mL con una cepa ATCC 43504 de *Helicobacter pylori* en una infección primaria

TIEMPO EN MESES	C (-)	0	1	2	4	6
PRUEBA						
Ureasa	0%	73%	27%	67%	100%	50%
Cultivo	0%	10%	20%	15%	28%	27%
Serológica	0%	0%	18%	16%	70%	80%
Histopatológica	0%	0%	30%	66%	70%	62.5%

C(-) Control negativo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el gráfico 1 se esquematiza el comportamiento de la prueba de ureasa, en donde el tiempo 0 presenta un porcentaje de infección del 73%, y esquematizado con líneas punteadas un 0%, obtenido de los controles negativos, se obtuvo el máximo valor al cuarto mes con un valor del 100%, y disminuyendo a un 50% en el sexto mes.



----- % de infección al tiempo cero de los controles negativos

GRAFICO 1. Prueba de ureasa realizada en tejido de jerbos mongolianos inoculados con 1.8×10^8 UFC/mL, con una cepa ATCC 43504 de *Helicobacter pylori* en una infección primaria

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la prueba de cultivo el porcentaje de infección registrado es muy irregular, encontrando en el tiempo 0 un 10% de infección, y en el primer mes se eleva al doble con un 20%, sin embargo, en el segundo mes baja nuevamente a un 15%, en el mes cuarto y sexto se eleva nuevamente, registrando valores semejantes, de 28% y 27% respectivamente, esto es claramente mostrado en el gráfico 2.

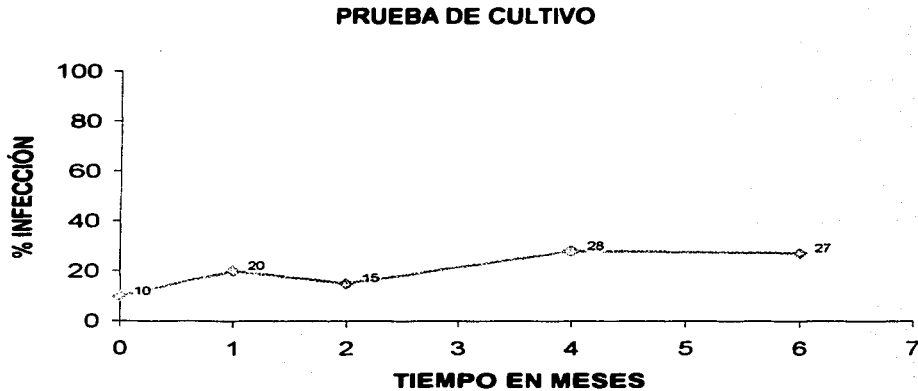


GRAFICO 2. Cultivo de tejido amacerado de jerbos mongolianos inoculados con 1.8×10^9 UFC/mL con una cepa ATCC 43504 de *Helicobacter pylori* en una infección primaria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La prueba serológica presenta valores que se van incrementando conforme el tiempo de infección, encontrando que al tiempo 0, el porcentaje es de 0, aumentando al primer y segundo mes en un 18% y 16% respectivamente, al cuarto mes el porcentaje de infección se eleva considerablemente alcanzando un valor del 70%, el valor mas elevado se registra en el sexto mes con un 80%, mostrado en el gráfico 3

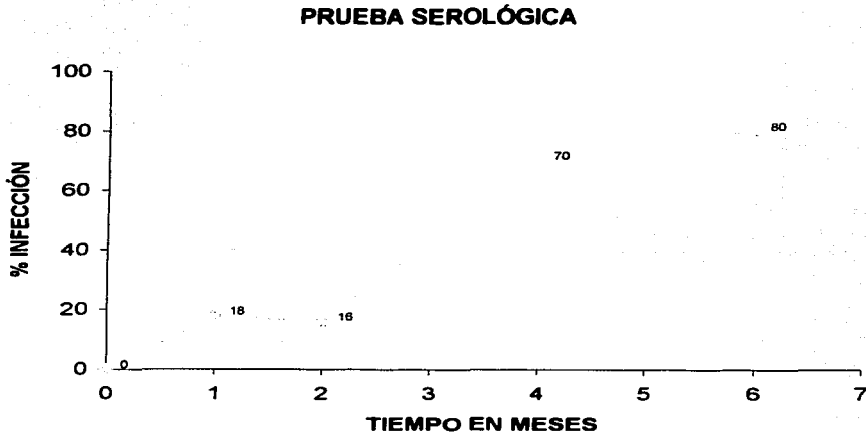


GRAFICO 3. Prueba Serológica, para la identificación de IgG contra *Helicobacter pylori* en suero de jerbos mongolianos inoculados con 1.8×10^9 UFC/mL con una cepa ATCC 43504 en una infección primaria

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El comportamiento de la prueba histopatológica y el de la prueba de ureasa, es semejante a partir del primer mes de inducida la infección, ya que, en el tiempo 0 se registra el menor porcentaje de infección con un 0% de detección y el mayor porcentaje en el cuarto mes con un 70%, observando una baja al 62% en el sexto mes, mostrado en el gráfico 4.

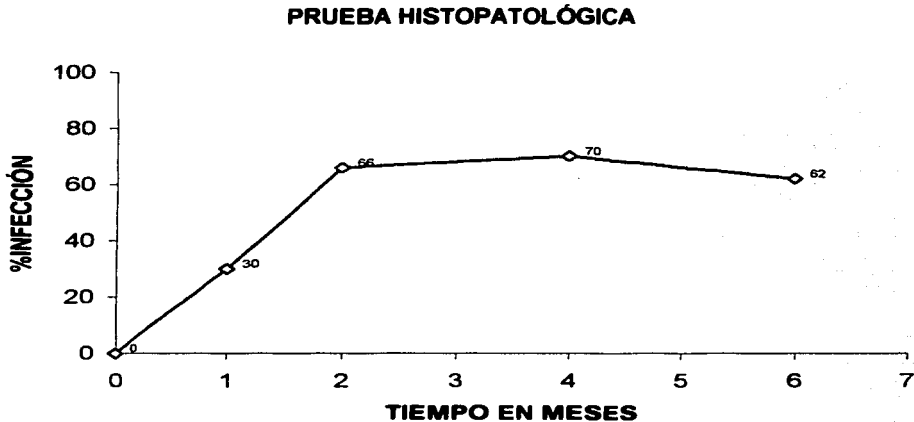
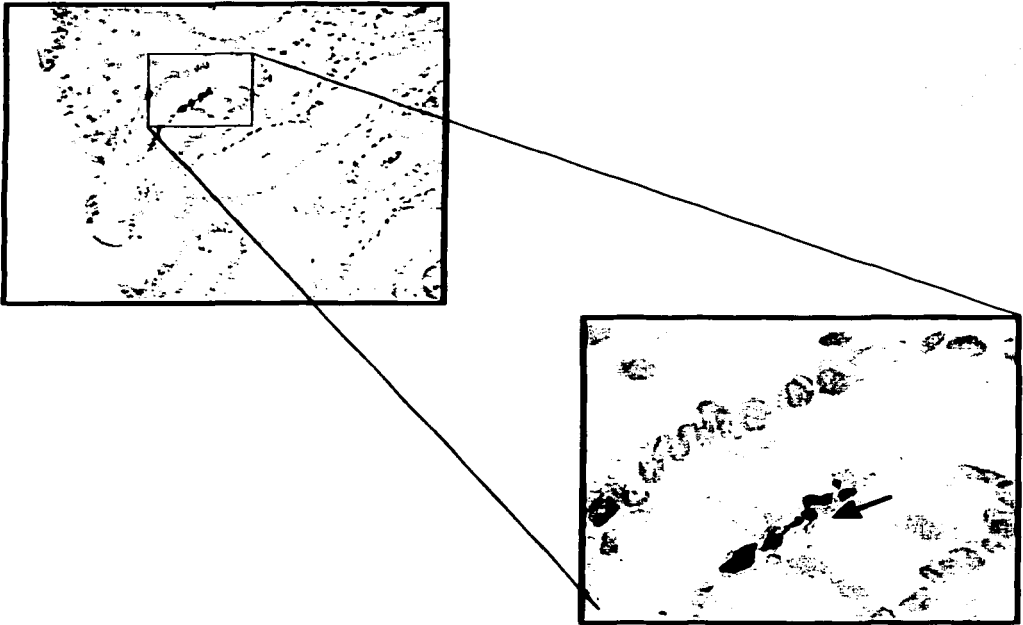


GRAFICO 4. Prueba histopatológica de tejido en jerbos mongolianos inoculados con 1.8×10^8 UFC/mL con una cepa ATCC de *Helicobacter pylori* en una infección primaria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la siguiente ilustración se muestra una biopsia del estómago de un jerbo infectado por *H. pylori*, en una infección primaria, en el que se observan bacilos en la zona alveolar del epitelio.



Biopsia de jerbo de Mongolia, inoculado con *Helicobacter pylori* en una infección primaria

En la tabla 2 y en el gráfico 5 se aprecia claramente como los niveles de malondialdehído se incrementan conforme el tiempo y porcentaje de la infección, encontrando que los valores arrojados al cuarto y sexto mes son estadísticamente significativos con respecto al tiempo 0 e sus controles negativos, datos que fueron analizados con una prueba de análisis de Varianza (ANOVA) con $p < 0.05$

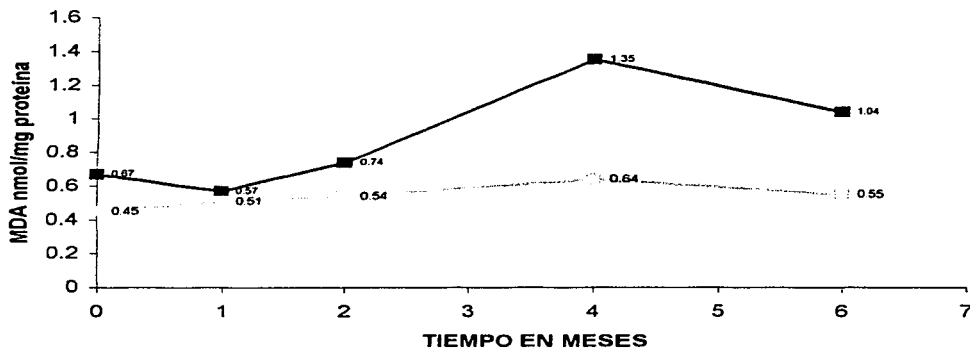
TABLA 2 Niveles de MDA nmol/mg proteína \pm DE realizada en tejido de jerbos mongolianos inoculados con 1.8×10^9 UFC/mL con una cepa ATCC 43504 de *Helicobacter pylori* en una infección primaria

TIEMPO EN MESES	0	1	2	4	6
POBLACIÓN					
Control negativo	0.45 \pm 0.1346	0.51 \pm 0.1569	0.54 \pm 0.2948	0.64 \pm 0.35	0.55 \pm 0.2529
Infectados con <i>H.pylori</i>	0.67 \pm .2542	0.57 \pm 0.2355	0.74 \pm .0905	*1.35 \pm 0.28	*1.04 \pm .2457

*Estadísticamente significativos ANOVA $p < 0.05$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

NIVELES DE MALONDIALDEHÍDO



— Valores de MDA de jerbos infectados
... Valores de básales de MDA

GRAFICO 5. Niveles de lipoperoxidación (MDA nmol/mg proteína) realizados en tejido de jerbos mongolianos inoculados con 1.8×10^9 UFC/mL con una cepa ATCC 43504 de *Helicobacter pylori* en una infección primaria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la tabla 3 se encuentran reportados los valores de porcentaje de infección por tiempo, de los jerbos inoculados con *Helicobacter pylori*, y los no inoculados (control negativo), determinadas por 3 técnicas diagnósticas como positivas en un mismo jervo.

TABLA 3. Porcentaje de infección, tomando como referencia 3 pruebas de infección como positivas para el mismo jervo

TIEMPO EN MESES	C (-)	0	1	2	4	6
% INFECCIÓN	0%	0%	10%	16%	70%	62%

C(-) Control negativo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el gráfico 6 se observa como el comportamiento del porcentaje de infección es igual al de los niveles de MDA, conforme el tiempo de infección, disminuyendo ambos en el sexto mes.

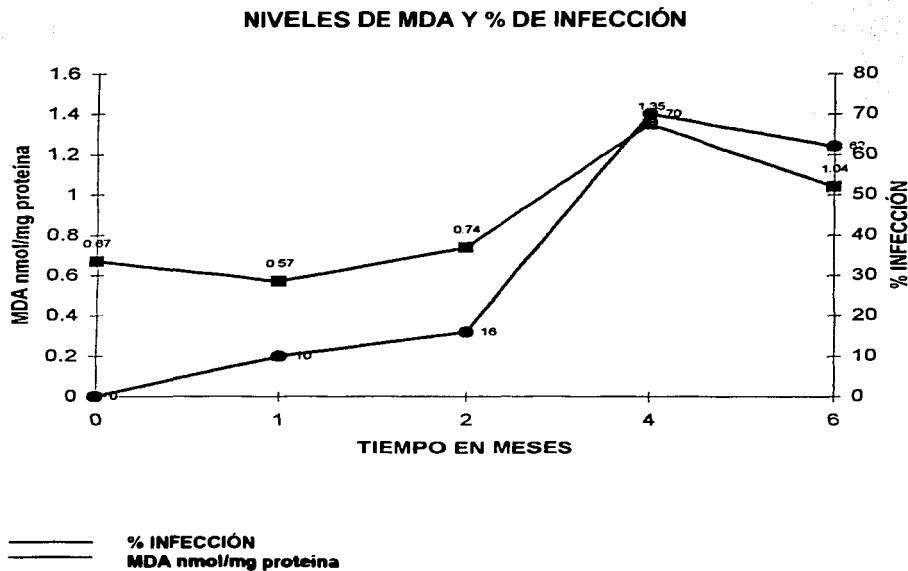


GRAFICO 6. Comparación de niveles de lipoperoxidación (MDA) con porcentaje de infección, en jerbos mongolianos inoculados con 1.8×10^9 UFC/mL con una cepa ATCC 43504 de *Helicobacter pylori* en una infección primaria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el gráfico 7 se esquematiza la correlación lineal que existe entre el porcentaje de infección y los niveles de MDA, en la cual se obtuvo un coeficiente de correlación lineal del 0.98, este valor fue calculado a partir del tiempo 0 al cuarto mes de infección.

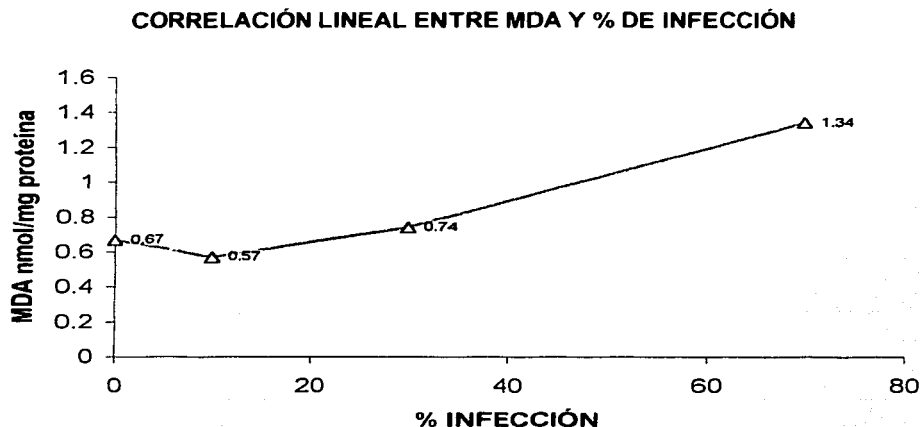


GRAFICO 7. Correlación lineal entre el porcentaje de infección y niveles de MDA, en jerbos mongolianos inoculados con 1.8×10^9 UFC/mL con una cepa ATCC de *Helicobacter pylori* en una infección primaria.
Coeficiente de correlación lineal = 0.98

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para cuantificar los niveles de malondialdehído (MDA) en una infección primaria por *Helicobacter pylori*, se requiere de infectar a jerbos de Mongolia, que son susceptibles a la infección por este microorganismo ^(27, 28), para la identificación de está, fue necesario el empleo de diferentes pruebas, como la ureasa, cultivo, serología e histopatología.

La reacción casi inmediata de la ureasa es una característica importante de *Helicobacter pylori*, por lo que se le considera una prueba rápida para su identificación presuntiva en humanos ^(6, 13, 14, 37). En el tiempo 0, la prueba de la ureasa (Christensen modificada), demostró la presencia del microorganismo recién inoculado en un 73% de los jerbos tratados, esto se debe a que *H. pylori* posee una alta viabilidad al tratarse de un inóculo fresco, y debido a que las defensas del huésped aun no reconocen al invasor, por lo que no obtenemos el valor teóricamente esperado de un 0%, que es observando en los controles negativos. En los meses 1 y 2 postinoculación, se observo una tendencia de incremento, lográndose el valor mas elevado de la infección al cuarto mes. En el sexto mes baja drásticamente el porcentaje, esto probablemente se deba, a que *H. pylori* al causar daño a las células del epitelio gástrico, las lleva a regeneración, apoptosis o metaplasias, por lo que el nicho biológico de *H. pylori* se ve afectado ⁽³⁸⁾ y por lo tanto la población disminuye drásticamente.

Se debe tomar en cuenta, que en esta prueba de ureasa realizada en tejido, pueden existir falsos positivos, dada la elevada concentración de flora normal, y en menor grado falsos negativos, debido a la poca concentración presente de *H. pylori* ⁽³⁷⁾ adherida en la porción del tejido gástrico tomado para esta prueba.

La detección de *H. pylori*, también fue corroborada por cultivo, esta prueba requiere experiencia por parte del microbiólogo para poder identificar las colonias características ^(37, 39), además de que, a diferencia de nuestro modelo animal, el cultivo realizado en el ser humano es a partir de biopsias de una medida aproximada de 2 cm², y tomadas directamente de la zona lesionada, caracterizada por nodularidades en la mucosa del antro con apariencia de parches ⁽²⁰⁾, lo que hace que su identificación sea más fácil y directa. Sin embargo, en el jerbo se empleó una tercera parte del estómago, la cual contiene gran cantidad de flora bacteriana normal, que en algunos casos inhibió o enmascara el crecimiento de *H. pylori*, a pesar de que se tomaron las medias necesarias para recuperarlo, como el uso de un medio selectivo con antibióticos cuya concentración fue empleada para la finalidad de inhibir la mayor cantidad de flora bacteriana normal, sin afectar la viabilidad de *H. pylori*, lo que permitió en un menor grado el crecimiento de flora normal, para minimizar este factor se ocupó también una dilución 1:100 del homogenizado ^(37, 39).

La técnica serológica (ELISA) se emplea para estudios de tipo epidemiológicos, en donde se cuantifican IgG séricas, que son anticuerpos de memoria, los cuales pueden estar aun activos sin que la infección este presente, por lo que no se le considera una prueba diagnóstica confiable en humanos ^(5, 8, 17), sin embargo, en el jerbo es aceptable tomar en cuenta estos valores de serología, ya que se trabajó con animales libres de patógenos específicos, a los cuales se les realizó la prueba serológica previa a la inoculación, para verificar que no presentara niveles elevados de IgG. La infección fue inducida, por lo que no cabe duda de que los niveles de IgG detectados, pertenecen a una infección primaria y no a una reinfección.

Esto explica el hecho de que el porcentaje de infección al sexto mes, sea mas elevado que en las otras pruebas, este factor es corregido al tomar tres

pruebas diagnosticas como positivas y no solo una, para obtener el porcentaje de infección en el proceso del estudio.

En el estudio histopatológico se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina para identificar principalmente daños en el epitelio, y la tinciones de giemsa y de plata para identificar los bacilos en forma de ala de gaviota propios de *Helicobacter pylori* ^(37, 39), se observo un comportamiento semejante a la prueba de ureasa, a excepción, claro esta del tiempo 0 ya que no existía una implantación del microorganismo, por lo que al realizar lavados, y la técnica de fijación se elimino a *H. pylori*, en el sexto mes se observa una disminución del porcentaje de infección, demostrando nuevamente que el nicho de *H. pylori* se encuentra dañado ⁽³⁸⁾ y por lo tanto existe una probabilidad de que su población disminuya.

Los niveles de malondialdehído se elevan cuando existe gastritis por causa de *Helicobacter pylori* ^(23, 33, 34, 35) en el jerbo los valores se elevaron al 4 y 6 mes de la infección, siendo estadísticamente significativos correlacionando con el porcentaje de infección. Esto se debe a que *Helicobacter pylori* produce inflamación induciendo a la migración de polimorfonucleares (PMN), ^(1, 2, 8, 10,) los cuales atacan a membranas celulares que son agredidas por radicales libres, producidos por PMN atacando principalmente a ácidos grasos poliinsaturados, generando radicales de ácido graso que reaccionan con oxígeno formando radicales peróxidos de ácidos grasos, estos a su vez pueden oxidar mas moléculas de ácidos grasos e iniciar nuevas cadenas produciendo lípidos hidróxidos, los cuales originan malondialdehído (MDA).^(23, 33, 34, 35) Todo este proceso causa una alteración de gradientes de iones transmembranales, desequilibrio de funciones secretoras e inhibición de procesos metabólicos celulares de integración, todo esto conlleva a una muerte celular, ^(21, 22, 23) además que el MDA reacciona con el ADN de las células epiteliales, formando aductos e induciendo a mutagénesis⁽²²⁾, esta serie de procesos son los que muy

probablemente conllevan a la disminución en el porcentaje de infección al sexto mes, así como en los niveles de MDA.

Hasta el momento no se cuenta con información sobre los niveles de MDA en el proceso de la infección, y ahora sabemos que conforme el microorganismo se va implantando en el epitelio, los niveles de MDA van en aumento, encontrando una correlación lineal del 0.98 hasta el cuarto mes de infección.

Se debe tomar en cuenta que se esta trabajando con un modelo vivo por lo que existen variables, como el sistema inmune del animal que no es controlable, y de este depende la infección y la lipoperoxidación.

11. CONCLUSIONES

- Se logró inducir la infección en jerbos mongolianos libres de patógenos específicos, identificado la misma a base de 3 pruebas; ureasa, serología e histopatología. La prueba de cultivo se descarta dada que se obtuvo un porcentaje muy bajo de rescate a lo largo de la infección.
- *Helicobacter pylori* provoca una respuesta inflamatoria local intensa en estómago, estimulando a PMN y macrófagos a la liberación de radicales libres, que oxidan lípidos (ácidos grasos poliinsaturados), generando intermediarios como el malondialdehído (MDA), el cual fue medido en relación con las proteínas totales en tejido.
- Los niveles de malondialdehído se incrementaron conforme el tiempo de infección, encontrando que en el cuarto mes, se localiza el pico máximo, disminuyendo los valores conforme la infección, indicando que *H. pylori* dañó el epitelio de tal forma, que su microambiente se ve afectado, por lo que su población disminuye ya que no tiene las condiciones necesarias para proliferar, quedando muy probablemente latente hasta la regeneración del epitelio.

12. PERSPECTIVAS

La implementación del modelo animal permitirá el estudio de los daños ocasionados en el proceso de la infección y dilucidar de esta forma el origen del cáncer que es asociado con la infección por *Helicobacter pylori*.

Evaluar si al elevarse los niveles de MDA en el proceso de la infección, estos pueden dar lugar a la formación de aductos que alteran oncogenes como el p53, dando lugar a cáncer gástrico.

Otro posible mecanismo a estudiar es el daño a la membrana celular y alteraciones de transporte transmembranal llevando a la muerte a la célula y generando la proliferación de las mismas, llevando de esta forma a mutagénesis todo ello en el proceso de la infección.

12. ANEXOS

MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo son preparados pesando primeramente el polvo y adicionándolo poco a poco en 1 L de H₂O bidestilada, una vez disuelto se hierve por 1 minuto agitando constantemente, finalmente se esteriliza por 15 minutos de 115 a 120 libras de presión.

- Medio de Agar Casman; 47 g
- Medio de Agar Campylobacter; 40 g

Una vez que los medios ya están estériles se les deja enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45° C aproximadamente y se le adiciona 75 mL de sangre de carnero desfibrinada, obteniendo un 7.5%, finalmente se adiciona 10 mL del Stock de antibióticos y se sirve en cajas Petri limpias y estériles.

CALDOS DE CULTIVO

Los caldos son preparados pesando primeramente el polvo y disolviéndolo lentamente en 1 L de H₂O bidestilada, una vez disuelto se hierve por 1 minuto agitando constantemente, finalmente se esteriliza por 15 minutos de 115 a 120 libras de presión a 120° C.

- Caldo de brucella; 37 g
- Caldo BHI; 37 g

UREA DE CHRISTENSEIN MODIFICADA

Urea 10%

100 mL PBS

4 gotas de rojo de fenol 1%

Agar bacteriológico 0.6%

Disolver el Agar bacteriológico en PBS y con el rojo de fenol, esterilizar por 15 minutos de 115 a 120 libras de presión a 120° C, cuando la temperatura del medio sea de 40° C aproximadamente tomar 10 mL y disolver la urea, adicionándola posteriormente esterilizando la solución por filtración, y dispensar en tubos de 13 X 100.

STOCK DE ANTIBIÓTICOS

Cada uno de los antibióticos son pesados y disueltos en diferentes disolventes:

- Ácido nalidíxico [10mg/L] NaOH 1N
- Trimetoprim [5 mg/L] Metanol
- Vancomicina [3 mg/L] H₂O
- Anfotericina B [2 mg/L] H₂O

Una vez disueltos se juntan completando a un volumen de 100 mL, los cuales son esterilizados por filtración y alicuotados en volúmenes de 10 mL.

Se guardan a -20° C.

SOLUCIONES

- PBS pH 7.4

NaCl	[137mM]	8g
KCl	[2.7mM]	0.2g
Na ₂ HPO ₄	[4.3mM]	1.44g
KH ₂ PO ₄	[1.4mM]	0.24g

Disolver en 800 mL de agua desionizada ajustando el pH y aforar a 1 L.

Amortiguador de bicarbonatos pH 9.6

Sol A 21.2 g Na₂CO₃ en 1 L

Sol B 16.8 g NaHCO₃ en 1 L

80 mL (A) + 170 mL (B) + 250 mL H₂O desionizada

13. REFERENCIAS

1. Naomi U, Shiro O, Soichiro Y, Nobutoshi M, Hhiji Y, Michio Y, Kiyomi T, Naomi S. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. The New England journal of Medicine 2001;345:784-789.
 2. Owen R J. *Helicobacter*-species classification and identification. British Medical Bulletin 1998;54:17-30.
 3. Farthing J G. *Helicobacter pylori* infection: an overview. British Medical Bulletin 1998;54:1-6.
 4. <http://www.helicobacterspain.com/Microbiologia/microbiologia.htm>
 5. Vasile S, Barbro Z, Torkel W. Optimal Survival of *Helicobacter pylori* under Various Transport Conditions. Journal of Clinical Microbiology 1992;30:1453-1456.
 6. Martínez R M, Martínez R J. Microbios en línea. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno.UNAM.2001 Cap. 11. p. 199-220.
 7. Buckley J M, Colm A O. *Helicobacter* biology-discovery. British Medical Bulletin 1998;54:7-16.
 8. Rowland M, Drumm. Clinical significance of *Helicobacter* infection in children. British Medical Bulletin 1998;54:95-103.
 9. Kanae S, Yoshito T, Michio S, Yasuhiro F, Futoshi M, Mangen Z, et al. *Helicobacter pylori* in the Natural Environment. Scand J Infect 199;31:275-279.
 10. Bruce E. Dunn. Hartley Cohen and Martin J. Blaser. *Helicobacter pylori*. Clinical Microbiology Review 1997;10:720-741.
 11. Vasile S, Barbro Z, Torkel W. Optimal Survival of *Helicobacter pylori* under Various Transport Conditions. Journal of Clinical Microbiology 1992;30:1453-1456
-

12. Rossendaal R, Ernst J, Kuipers, A, Salvador P, Johannes G. Recovery of *Helicobacter pylori* from Gastric Biopsy Specimens Is Not Dependent in the Transport Medium Used. *Journal of Clinical Microbiology* 1995;33:2798-2800
13. Shmueli H, Passaro D, Figer A, Niv Y, Pitlik S, Samra Z, Koren R, Yahav J. Relationship between *Helicobacter pylori* CagA status and colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3406-10.
14. Zakladu B, Klinicznej I. Diagnostyki Laboratoryjnej Instytutu Kardiologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecine. Evaluation of gene expression for cag A in strains of *Helicobacter pylori* colonizing gastric mucosa. *Ann Acad Med Stetin* 2000;46:87-96.
15. Ruiz-Bustos E, Ochoa J.L, Wadström T. Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate proteoglycan. *J Microb Med.* 2000;49:215-222.
16. Ramírez J A, López C L, Fernández M C. Efecto protector de la fibra dietética en la etiología de CANCER GASTRICO. Resumen del trabajo ganador 2º lugar del Premio Nacional Glaxo-Wellcome de investigación en el área de Epidemiológica.
17. López CL. Epidemiología del cáncer de estomago. *Rev Inst Nal Cancerol (Mex).* 1995;41:34-38.
18. McColl K E, El-Omar E, Gillen D. Interactions between H. Pylori infection, gastric acid secretion and anti-secretory therapy. *British Medical Bulletin* 1998;54:121-138.
19. Strachan D P. Non-gastrointestinal consequences of *Helicobacter pylori* infection. *British Medical Bulletin* 1998;54:87-93.
20. Hyeyoung K, Jeong Y S, Kyung H K. Inhibición of Lipid Peroxidation, NK-KB. Activación and IL-8 Production by Rebamipide in *Helicobacter pylori* Stimulated gastric Epithelial Cells, *Digestive Diseases and Sciences* 2000;45:621-628.
21. K.H.Cheeseman, T.F. Slater. An introduction free radical biochemistry. *British medical Bulletin.* 1993;49:481-493.

22. Lawrence J, Marnett. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis. 2000;21:361-370.
23. A.E. Hollye, K.H. Cheeseman. Measuring free radical reactions in vivo. British Medical Bulletin. 1993 49:594-505.
24. How *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2001;2:457-466.
25. Lawrence J. Marnett. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutation Research. 1999;424:83-95.
26. Hermann Esterbauer, Rudolf Jorg Schaur, Helmward Zollner. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radical Biology 1991;11:81-128.
27. Maria I, Esteves, Mark D. Schrenzel, Robert P. Animal Model. *Helicobacter pylori* Gastritis in Cats with Long-Term Natural Infection as a Model of Human Disease. American Journal of Pathology 2000;156:709-713.
28. Hiroto M, Ken-ichi Y, Masaaki K, Haruko K, Yoshihiko I, Yoshie K, Toshi akashi. Distribution of *Helicobacter pylori* in a Mongolian Gerbil Gastric Ulcer Model. Laboratory Animal Science. 1999;49:622-627.
29. Toshio F, Shoji H, Masashi T. Nitric Oxide, *Helicobacter pylori* and gastrointestinal disorders. Journal of Gastroenterology and hepatology. 2000;15:D55-D59.
30. Germán R. Aguilar, Guadalupe Ayala, Geny Fierros-Zárate. *Helicobacter pylori*: Recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. Salud pública de México. 2001;43:237-247.
31. Hirai Y, Hayashi S, Shimomura H, Oguma K, Yokota K. Association of *Helicobacter pylori* with gastroduodenal diseases. Jpn J Infect Dis. 1999;52:183-97.
32. Keiji N, Yoshijo O, Isao I. Modulation of stress-induced gastric mucosal lesions by exogenous L-arginine. J. Lab Clin Med. 1999;133:440-450.
33. Drake, Mapstone, Schorah, White, Chalmers. Dixon. Reactive oxygen species activity and lipid peroxidation in *Helicobacter pylori* associated gastric:

-
- relation to gastric mucosal ascorbic acid concentrations and effect of *H. pylori* eradication. An International Journal of Gastroenterology and Hepatology. 1998;42:768-771.
34. E. Yarsan, M Tanyuksel, S Celik, A Aydin. Effects of Aldicarb and Malathion on Lipid Peroxidation. Environmental Contamination and toxicology. 1999;63:575-581.
 35. Simon M. Everett, Raj Singh, Chiara Leuratti, Kay L.M. White, Peter Neville, Darren Greenwood, Lawrence J. Levels et Malondialdehyde-deoxyguanosine in the Gastric Mucosa: Relationship with Lipid Peroxidation, Ascorbic Acid, and *Helicobacter pylori*. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. 2001;10:369-376.
 36. Mrinalini Bhattacharjee, Samir Bhattacharjee, Arnab Gupta, Ranajit Banerjee. Critical role of an endogenous gastric peroxidase in controlling oxidative damage in *H. pylori*-mediated and nonmediated gastric ulcer. Free Radical Biology and Medicine. 2002;32:731-743.
 37. Jimmy Larisch, Margarita Dehesa Violante. Infección por *Helicobacter pylori*. Enfermedad ácido-peptica. Fascículo 5
 38. Hironori Yoshiyama, Teruko Nakazama. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. Microbes and Infection. 2000;2:55-60.
 39. Douglas J. Passaro, E. Julia Chosy, Julie Parsonnet. *Helicobacter Pylori*. Consensus and controversy. Clinical Infectious Diseases. 2002;35:298-304.
 40. L´Bergendi, L Benes, Z Durackova, M. Ferencik. Chemistry Physiology and pathology of free radicals Life Science. 1999;65:1865-1874.
 41. Leah E. Weinberg and Pawan K. Singal. Refractory heart failure and age-related differences in adriamycin-induced myocardial changes in rats. Can.J. Physiol. Pharmacol. 1987;65:1957-1965.
 42. Patrick R. Murray, PhD. Microbiología Médica, 2º ed. Ed. HARCOURT BRACE Barcelona 1997 pp 249-252.
-

43. Peter L, Lennart F, Pentti S, Lennart D. Effects of *Helicobacter pylori* and bile on N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine exposed antral mucosa of C57BL/6 mice. *Virchows Arch.* 2001;439:661-667.
44. You WC, Zhang L, Pan KF, Jiang J, Chang YS, Perez-Perez GI, Liu WD; MA JL, Gail MH, Blaser MJ, Fraumeni JF, Xu GW. *Helicobacter pylori* prevalence and CagA status among children in two counties of China with high and low risks of gastric cancer. *Ann Epidemiol.* 2001;11:543-546.
45. Markus Gerhard, Norbert Lehn, Nina Nuemayer. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *PNAS.* 1999;96:12778-12783.
46. Stefan Bereswill, Oliver Neuner, Sonja Strobel, Manfred Kist. Identification and molecular analysis of superoxide dismutase isoforms in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Letters.* 2000;183:241-245.
47. Fabio Farinati, Gianni Della Libera, Romilda Cardin, Mario Plebani. Gastric Antioxidant, Nitrites, and Mucosal Lipoperoxidation in chronic Gastritis and *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Gastroenterol.* 1996;22:275-281.
48. M. Peñate, Peña. La importancia del sistema inmune innato. *Revista Española de Enfermedades Digestivas.* 2001;93:721-730.
49. Markus Stein, Rino Rappuoli, Antonello Covacci. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *PNAS.* 1999;97:1263-1268.
50. Bruce A, Freeman, James D, Crapo. Biology of Disease Free Radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation.* 1982;47:412-426.
51. Warburton, Everett, Mapstone, Axon, Hawkey, Dixon. Clinical and histological associations of cagA and vacA genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis. 1998;51:55-61.
52. Russo, R. Acquaviva, A. Campisi, V. Sorreti, C. Di Giacomo, G. Vigarta, M.L. Barcelloma and A. Vanella. Bioflavonoids as antriradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biologi and Toxicology.* 2000;16:91-98.

-
53. A.C. Wotherspoon, MRCPATH, Departamen of Histopathology, Royal Marsden Hospital. Gastric Lynphoma of mucosa-associated lymphoid tissue and *Helicobacter pylori*. Annu. Rev. Med. 1998;49:289-299.
 54. Chen LT, Lin JT, Shyu RY, Jan CM, Chen CL, Chiang IP, Liu SM, Su IJ, Cheng AL. Prospective study of *Helicobacter pylori* eradication therapy in stage I (E) high-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the stomach. J Clin Oncol 2001;19:245-251.