



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA
MOLECULAR

**“Actividad hemaglutinante y lítica de cepas de
Helicobacter pylori de diferente origen clínico
sobre eritrocitos humanos”**

T E S I S

Que presenta

KARINA MARISOL MAYA RAMÍREZ

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

Directores de Tesis:

Dr. Francisco Javier Torres López

Dra. María Teresa Estrada García

Ciudad de México

Agosto, 2016

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	2
ÍNDICE DE TABLAS	3
ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
Epidemiología de <i>Helicobacter pylori</i>	7
Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i>	8
Aspectos clínicos de la infección de <i>Helicobacter pylori</i>	10
Factores de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i>	14
Adhesinas	17
Adhesina BabA	18
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Selección de cepas de <i>Helicobacter pylori</i>	22
PCR para los genes <i>cagA</i> , <i>vacA</i> y <i>babA2</i>	23
Estandarización del ensayo de hemaglutinación bacteriana.....	24
Estandarización del ensayo de hemólisis.....	25
RESULTADOS	27
Selección de cepas de <i>Helicobacter pylori</i>	27
Caracterización molecular de las cepas <i>H. pylori</i> para los genes de virulencia <i>cagA</i> , <i>vacA</i> y <i>babA</i>	27
Estandarización del ensayo de hemaglutinación de <i>H. pylori</i> con eritrocitos humanos Le ^{a+} , Le ^{b+} y Le ^{a-b-}	28
Ensayo de hemaglutinación de las cepas de <i>H. pylori</i> de diferente origen clínico y eritrocitos humanos del grupo Le ^{a+} , Le ^{b+} y Le ^{a-b-}	30
Ensayo de hemaglutinación con cepas de <i>H. pylori</i> aisladas de pacientes con gastritis	31

Ensayo de hemaglutinación con cepas de <i>H. pylori</i> aisladas de pacientes con metaplasia intestinal	32
Ensayo de hemaglutinación con cepas de <i>H. pylori</i> aisladas de pacientes con cáncer gástrico	33
Estandarización del ensayo de hemólisis	35
Ensayo de hemólisis.....	36
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIÓN	42
PERSPECTIVAS DEL PROYECTO	42
APÉNDICE 1. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	43
REFERENCIAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de algunas implicaciones de la translocación de cagA.....	16
Figura 2. La proteína VacA influye en procesos celulares de diferentes formas, lo cual le permite la colonización de la mucosa gástrica por <i>H. pylori</i>	17
Figura 3. Representación esquemática de la síntesis de los antígenos del sistema de grupo sanguíneo AB0.....	20
Figura 4. Representación esquemática de la síntesis de los antígenos del sistema de grupo sanguíneo Lewis a y Lewis b.....	20
Figura 5. Representación esquemática de la organización del ensayo de hemaglutinación de <i>Helicobacter pylori</i> utilizando eritrocitos humanos Le ^{a+} , Le ^{b+} y Le ^{a-b-}	25
Figura 6. Estandarización del ensayo de hemaglutinación con la cepa de referencia TX30 para los tubos 1, 2 y 3 del Estándar de Mc Farland.....	29
Figura 7. Estandarización del ensayo de hemaglutinación con la cepa de referencia J99 para los tubos 1, 2 y 3 del Estándar de Mc Farland.....	29
Figura 8. Ejemplos representativos del ensayo de hemaglutinación para las cepas aisladas de pacientes con gastritis.....	31
Figura 9. Ejemplos representativos del ensayo de hemaglutinación para las cepas aisladas de pacientes con metaplasia.....	32
Figura 10. Ejemplos representativos del ensayo de hemaglutinación para las cepas aisladas de pacientes con metaplasia.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Adhesinas y proteínas asociadas a la virulencia de <i>H. pylori</i>	18
Tabla 2. Iniciadores utilizados para la amplificación de los genes de virulencia <i>babA2</i> , <i>cagA</i> y <i>vacA</i>	23
Tabla 3. Estándar de Mc Farland correspondiente a los tubos 1,2 y 3.....	24
Tabla 4. Estándar de Mc Farland y sus densidades celulares aproximadas para cada tubo.....	25
Tabla 5. Condiciones utilizadas para la estandarización del ensayo de hemólisis de acuerdo a la proporción del volumen de la suspensión bacteriana y el volumen de la suspensión de eritrocitos Lewis b con respecto a cada tubo del Estándar de Mc Farland.....	26
Tabla 6. Cepas de <i>Helicobacter pylori</i> seleccionadas y su genotipo de acuerdo a los genes de virulencia <i>cagA</i> , <i>vacA</i> y <i>babA2</i>	27
Tabla 7. Distribución de los genotipos por origen clínico.....	28
Tabla 8. Hemaglutinación de las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> aisladas de pacientes con gastritis y sus respectivos genotipos.....	34
Tabla 9. Hemaglutinación de las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> aisladas de pacientes con metaplasia intestinal y sus respectivos genotipos.....	34
Tabla 10. Hemaglutinación de las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> aisladas de pacientes con cáncer gástrico y sus respectivos genotipos.....	35
Tabla 11. Promedio de los valores de la densidad óptica para cada concentración bacteria correspondiente a los tubos del Estándar de Mc Farland.....	35
Tabla 12. Valores de absorbancia de <i>Staphylococcus aureus</i> para eritrocitos Le ^{a+} , Le ^{b+} y Le ^{a-b-}	37
Tabla 13. Valores de absorbancia de 10 cepas de <i>Helicobacter pylori</i> para eritrocitos Le ^{a+} , Le ^{b+} y Le ^{a-b-}	37
Tabla 14. Porcentaje de hemólisis de las cepas de <i>H. pylori</i> tomando como 100% los resultados obtenidos con <i>Staphylococcus aureus</i> para eritrocitos Le ^{a+} , Le ^{b+} y Le ^{a-b-}	37
Tabla 15. Porcentaje de hemólisis de las cepas de <i>H. pylori</i> tomando como 100% los resultados obtenidos con los eritrocitos Le ^{a+} , Le ^{b+} y Le ^{a-b-} sonificados.....	38

ABREVIATURAS

BabA	Proteína de adhesión a los antígenos de Lewis B
CagA	Citotoxina asociada al gen A
Cag-PAI	Isla de patogenicidad cag
CG	Cáncer gástrico
FUT 2	Galactosa 2-L-fucosiltransferasa
FUT 3	Galactosa 3(4)-L-fucosiltransferasa
GNA	Gastritis no atrófica
Kb	Kilobase
Lea+	Lewis a
Lea-b-	Lewis a negative b negativo
Leb+	Lewis b
MI	Metaplasia intestinal
Mpb	Un millón de pares de bases
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
SabA	Adhesina de unión al ácido siálico
VacA	Citotoxina vacuolizante

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, especie específica, ya que sólo coloniza a los seres humanos. Hasta el momento los factores de virulencia de *H. pylori* más estudiados y relacionados tanto con gastritis como con cáncer gástrico son: la citotoxina asociada al gen A (CagA) y la citotoxina vacuolizante (VacA) particularmente el alelo *s1m1*. Por otro lado, el gen de la adhesina *babA2* de *H. pylori* que codifica para la proteína BabA, la cual reconoce al antígeno del grupo sanguíneo Lewis b sobre la superficie de epitelio gástrico, también se ha asociado con cepas causantes de cáncer gástrico. Hasta el momento se desconoce si las cepas de *H. pylori* son capaces de adherirse a los eritrocitos humanos de manera dependiente a la presencia del antígeno Le^{b+} y el resultado de esta interacción. El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de adherencia, hemaglutinación y lisis de los aislados clínicos de *H. pylori* *babA2*⁺, *cagA*⁺ y *vacA*⁺ así como de *babA2*⁻, *cagA*⁻ y *vacA*⁻ obtenidos de diferente origen clínico, sobre eritrocitos humanos de los grupos Lewis Le^{a+}, Le^{b+} y Le^{a-b-} negativos (Le^{a-b-}). Por lo que se estandarizaron los ensayos de hemaglutinación con dos cepas de referencia la TX30 (*babA2*⁻, *cagA*⁻ y *VacA s2m2*) y J99 (*babA2*⁺, *cagA*⁺ y *vacA s1m1*), mientras el ensayo de lisis con la TX30 de *H. pylori* y eritrocitos humanos de los grupos Le^{a+}, Le^{b+} y Le^{a-b-}, ya que no hay reportes previos de estos ensayos con *H. pylori*. Se determinó que la concentración óptima de bacterias para ambos ensayos de hemaglutinación y de lisis era la del tubo 2 de Mc Farland (DO_{625nm} 0.31, 6 X 10⁸ bac/mL) utilizando una suspensión de eritrocitos al 2% y una incubación de 3 horas a 37 °C para el ensayo de lisis y a temperatura ambiente para el ensayo de hemaglutinación. Se genotificaron un total de 15 cepas aisladas de pacientes con gastritis no atrófica (GNA), 13 metaplasia intestinal (MI) y 15 de cáncer gástrico (CG) para los genes de virulencia *babA2*, *cagA* y los alelos de *vacA*. El genotipo más frecuente fue *vacA s1m1*, *cagA*⁺, *babA2*⁺; 46.6% de las cepas de GNA; 61.5% de las de MI y 66.6% de las CG. El 74.4% de todas las cepas fueron capaces de hemaglutinar, el 73% de los aislados de GNA y CG, así como el 77% de las de MI. La formación de la malla de hemaglutinación fue similar entre todos grupos. En la prueba de hemólisis se evaluaron 9 cepas al azar, tres por cada origen clínico y la cepa de referencia TX30 como control, todas las cepas hemolisaron. El promedio de hemólisis para los eritrocitos del grupo Le^{a+} fue del 12%, del 15.6% para Le^{b+} y del 8.7% para Le^{a-b-}; tomando como el 100% de hemólisis la hemoglobina liberada de la interacción de *Staphylococcus aureus* con los tres grupos de eritrocitos humanos. En este trabajo describimos por primera vez la capacidad de las cepas de *H. pylori* de hemaglutinar y lisar a los eritrocitos humanos y estas actividades parecen ser independientes tanto de la presencia del gen de la adhesina *babA2* como del genotipo de la cepa.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a species specific Gram-negative bacteria, since only colonizes humans. Until now the best studied *H. pylori* virulence factors are the cytotoxin associated gen A (CagA) and the vacuolizing toxin (VacA) particularly s1m1 allele that have been related with gastritis and gastric cancer. On the other hand, the *H. pylori* adhesin babA2 gen that encodes for the BabA protein, that recognizes on the gastric epithelium surface the Lewis b antigen blood group, has as well been associated with strains causing gastric cancer. At the moment it is unknown if *H. pylori* strains has the capacity to bind to human erythrocytes, if this is in a dependent way of the presence of Leb+ antigen, and as well we do not know what is the result of this interaction. The aims of this study was to determine the capacity of binding, hemagglutination and hemolysis of *H. pylori* babA2+, cagA+ y vacA+ as well babA2-, cagA- y vacA-, clinical isolates, obtained from a variety of clinical origins. Therefore, we standardized the hemagglutination assays with two reference strains TX30 (babA2-, cagA- y VacA s2m2) and J99 (babA2+, cagA+ y vacA s1m1) while the lysis assay with the TX30 and human erythrocytes Lea+, Leb+ y Lea-b, since there are not previous reports for these assays for *H. pylori*. It was determined that the optimal bacteria concentration for both hemagglutination and lysis assays was the one of the Mc Farland tube 2 (DO625nm 0.31, 6×10^8 bac/mL) and an erythrocyte 2% suspension and an incubation of 3 hours at RT and 37 °C for the hemagglutination and lysis assays, respectively. A total of 15 strains isolated from patients with non-atrophic gastritis (GNA), 13 from intestinal metaplasia (MI) and 15 from gastric cancer (CG) were genotyped for the babA2, cagA alleles, and vacA virulence genes. The most frequent genotype was vacA s1m1, cagA+, babA2+, that was found in 46.6%, 61.5% and 66.6% of the GNA, MI and CG strains, respectively. 74.4% of all the strains had a hemagglutination activity, 73% of the ones isolated from GNA and CG as well as 77% of the ones isolated from MI. The hemagglutination net was similar in all groups. Nine randomly selected strains were evaluated in the hemolysis assay, three for each clinical origin and TX30 reference strain as a control; all the strains had hemolytic activity. When taking as the 100% hemolysis the hemoglobin liberated by *Staphylococcus aureus* with three erythrocytes groups, the average hemolytic activity of our isolates was 12% for Lea+, 15.6% for Leb+ and 8.7% for Lea-b-erythrocytes. In the present study we have described for the first time the capacity of *H. pylori* strains to hemagglutinate and lyse human erythrocytes and these biological activities seem to be independent of the babA2 adhesin, strain genotype and the erythrocytes Lewis group.

INTRODUCCIÓN

Epidemiología de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori fue aislado por primera vez en 1982 por Barry Marshall y Robin Warren (B. Marshall & Warren, 1983). Esta bacteria es un patógeno gástrico, que causa, gastritis no atrófica, úlcera péptica, y linfoma MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*) y es un factor de riesgo importante para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico (Moblely, Mendz, & Hazell, 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 50% de la población mundial se ha expuesto a *H. pylori* habiendo diferencia en la prevalencia entre los países desarrollados y en vías de desarrollo. La infección con *H. pylori* es reconocida actualmente como un problema mundial de salud pública (OMS, 2010).

En una revisión realizada por Malaty en el 2007 se documentó que los estudios de seroprevalencia de *H. pylori* han mostrado que la infección se adquiere a edades tempranas, se ha estimado que a la edad de 5 años más del 20% de los niños son seropositivos a *H. pylori* y para los 20 años el 80% de la población es seropositiva. En contraste, en los países desarrollados la seroprevalencia de la infección es baja en niños menores de 10 años, ésta se adquiere generalmente en la infancia tardía y adolescencia, alcanzando el pico máximo en la edad adulta, en donde entre los 30 y 40 años llega aproximadamente al 40% (Konturek, Konturek, & Brzozowski, 2009).

Por otro lado, estudios realizados en Rusia, mostraron que si se mejoran las condiciones sanitarias de la población disminuye de manera considerable a edades tempranas. Por ejemplo, en Rusia en 1995, la seroprevalencia en niños menores de 5 años fue del 30%, una década después en el mismo grupo etario la prevalencia era tan sólo del 2%, mostrando así que tanto el nivel socioeconómico como las condiciones sanitarias son factores clave en la infección por *H. pylori* (Tkachenko et al., 2007).

La seroprevalencia de la infección por *H. pylori* en la población adulta se ha estimado de 62% en China y en América Central, 82% en Europa Oriental, 71% en Japón, y en Estados Unidos varía del 26% al 53% (Mbulaiteye, Hisada, & El-Omar, 2009). Cabe señalar que la prevalencia varía entre las diferentes subpoblaciones, siendo mayor en ciertas

poblaciones étnicas, como asiáticos o africanos así como en poblaciones de bajo nivel socioeconómico (Konturek et al., 2009).

Torres y colaboradores en 1998 reportaron la seroprevalencia de *H. pylori*. En este estudio se analizaron más de 11.000 muestras de suero de pacientes recolectadas entre 1987-1988 provenientes de los 32 estados del país. Las muestras representaban todas las edades, incluyendo los diferentes niveles socioeconómicos. El estudio documentó una seropositividad del 66% del total de las muestras, 20% en niños a partir de 1 año de edad, en cambio para los niños de 10 años casi el 50% resultaron seropositivos. En los adolescentes, la seroprevalencia de la infección aumentó de manera constante, y por la edad de 20 años el 80% de la población se encontraba infectada. El hacinamiento, el bajo nivel educativo y bajo nivel socioeconómico representaron factores de riesgo para la infección. En cambio el origen geográfico de la muestra tuvo escasa relación con la infección por *H. pylori*; regiones con diferentes niveles de desarrollo tuvieron tasas similares de infección, y no se encontró diferencia significativa en la infección entre las comunidades urbanas y rurales (Torres et al., 1998).

Generalidades de *Helicobacter pylori*

H. pylori pertenece al género *Helicobacter*, subdivisión ϵ -*Proteobacteria*, del orden *Campylobacteriales*, familia *Helicobacteraceae*. Su genoma es aproximadamente de 1.7 Mpb, con un contenido de G+C del 35-40%, puede expresar en promedio 1,491 genes. Se ha mostrado que varios de los genes de virulencia como los que codifican para proteínas de membrana externa (*sabA*, *sabB*, *hopZ* y *oipA*) juegan un papel importante en la variación fenotípica de *H. pylori*, al igual que los lipopolisacáridos de su membrana (Kusters, van Vliet, & Kuipers, 2006).

H. pylori es una bacteria Gram-negativa, que mide aproximadamente de 2 a 4 μm de longitud y 0.5 a 1 μm de ancho. Aunque *H. pylori* generalmente presenta forma de espiral, puede presentar forma cocoide en cultivos prolongados; se cree que esta forma cocoide es una etapa viable no cultivable del microorganismo (Enroth et al., 1999). El bacilo presenta de 2 a 6 flagelos unipolares de aproximadamente de 3 μm de longitud, estos flagelos le confiere motilidad y le permiten desplazarse rápidamente en soluciones

viscosas, como la capa de moco que recubre a las células epiteliales gástricas (O'Toole, Lane, & Porwollik, 2000).

H. pylori es ureasa, catalasa y oxidasa positiva, es un microorganismo microaerofílico por lo que para su crecimiento óptimo los niveles de O₂ deben estar entre 2 a 5% y los niveles de CO₂ entre 5 a 10%, con humedad del 70-90%. Muchos laboratorios utilizan para el crecimiento de *H. pylori* condiciones microaeróbicas estándar, 85% N₂, 10% de CO₂ y 5% de O₂, y una temperatura de crecimiento de 34 a 40 °C, con un óptimo de 37°C. Aunque su hábitat natural es la zona gástrica la cual tiene un pH de 1-2, *H. pylori* puede sobrevivir a un pH menor a 4 por un corto periodo de tiempo, sin embargo, para que su crecimiento se lleve a cabo requiere un pH de 5.5 a 8.0, con un crecimiento óptimo a pH neutro (Stingl, Altendorf, & Bakker, 2002)(Scott, Marcus, Weeks, & Sachs, 2002).

Las colonias de *H. pylori* son pequeñas (0.5-2 mm), dependiendo del medio pueden ser translúcidas amarillentas o grisáceas además de presentar una superficie lisa(Han et al., 1995). Requiere un medio de crecimiento enriquecido que a menudo se complementa con sangre o suero, los cuales funcionan como fuentes adicionales de nutrientes (Kusters et al., 2006). Comúnmente se utilizan medios sólidos para el cultivo y el aislamiento de rutina de esta bacteria, tales como agar Columbia o agar Brucella suplementados con sangre de caballo o de carnero.

El agar Columbia y el agar Brucella pueden estar suplementados con una mezcla de antibióticos, lo cual los hace selectivos para el cultivo de *H. pylori*; comúnmente se usa el suplemento Dent que es una mezcla de vancomicina, trimetoprim, cefsoludina, y anfotericina B (Dent & McNulty, 1988) o el suplemento Skirrowel el cual es una mezcla de vancomicina, trimetoprim, polimixina B y anfotericina B (Skirrow, 1977). Los medios líquidos utilizados por lo general son el caldo Brucella, el caldo Mueller-Hinton o el caldo de infusión de cerebro y corazón suplementado con un 2 a un 10% de suero de ternera más cualquier suplemento de antibióticos (Dent o Skirrow)(Reynolds & Penn, 1994). Debido a que *H. pylori* carece de rutas biosintéticas para algunos aminoácidos, es necesario cultivarlo en medios suplementados con aminoácidos adicionales, tales como arginina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina y valina; algunas cepas también requieren alanina y/o serina (Kusters et al., 2006).

Aspectos clínicos de la infección de *Helicobacter pylori*

La colonización por *H. pylori* no es una enfermedad en sí, sino una condición que afecta el riesgo relativo de desarrollar diversos trastornos clínicos del tracto gastrointestinal superior y, posiblemente, el tracto hepatobiliar. Las pruebas para la detección de infección por *H. pylori* se deben realizar para encontrar la causa de una enfermedad subyacente, como la enfermedad de úlcera péptica, o con el propósito de prevención de enfermedades, como por ejemplo en pacientes con cáncer gástrico familiar (Kusters et al., 2006).

Aunque la colonización gástrica por *H. pylori* induce la gastritis histológica en todos los individuos infectados, sólo una minoría desarrolla signos clínicos aparentes de esta colonización. Se estima que pacientes positivos a *H. pylori* tienen un riesgo de por vida de 10 a 20% de desarrollar úlcera gástrica y un riesgo de 1 a 2% de desarrollar cáncer gástrico (Ernst & Gold, 2000) (Kuipers, 1999) (Kuipers, Thijs, & Festen, 1995). El riesgo de desarrollo de estos trastornos en la presencia de infección por *H. pylori* depende de diversos elementos tales como la cepa, el huésped y factores ambientales.

Los datos sobre la fase aguda de la infección son escasos y en gran parte provienen de los informes de sujetos que ingirieron deliberada o accidentalmente *H. pylori*, o de sujetos que fueron sometidos a procedimientos con material contaminado (Graham, Alpert, Smith, & Yoshimura, 1988) (B. J. Marshall, Armstrong, McGeachie, & Glancy, 1985) (Morris & Nicholson, 1987) (Sobala et al., 1991). Recientemente, se introdujo un modelo de exposición humana para la infección por *H. pylori*; se permitió estudios de la fase aguda de la infección controlada con la infección deliberada de voluntarios sanos con una cepa de laboratorio bien caracterizado de *H. pylori* (Graham et al., 2004).

En conjunto, estos informes mostraron que la fase aguda de la colonización con *H. pylori* puede estar asociado con síntomas dispépticos no específicos transitorios, tales como náuseas, vómito, y con considerable inflamación tanto de la mucosa proximal y distal del estómago, o pangastritis. Esta fase se asocia a menudo con hipoclorhidria, que puede durar meses. No está claro si esta colonización inicial puede ser seguida por el aclaramiento y la resolución espontánea de la gastritis y, en caso afirmativo, con qué frecuencia ocurre esto.

Los estudios de seguimiento de niños pequeños con pruebas serológicas o de aliento sugirieron que la infección puede desaparecer espontáneamente en algunos pacientes en este grupo de edad (Granström, Tindberg, & Blennow, 1997) (Malaty et al., 1999); esto no se ha observado en adultos que no sean en circunstancias específicas, como el desarrollo de gastritis atrófica.

Sin embargo, los estudios de gemelos homocigotos han mostrado una concordancia en su estado de infección de *H. pylori* con independencia de si habían crecido juntos o separados (Malaty, Engstrand, Pedersen, & Graham, 1994). Tal concordancia no se observó entre los gemelos heterocigóticos. Esto sugiere que algunos individuos son propensos a la colonización por *H. pylori*, mientras que otros pueden ser capaces de prevenir la colonización o borrar una infección establecida. Esta hipótesis es apoyada por la observación de que en muchos países en desarrollo el nivel de exposición a *H. pylori* es muy elevada en edades jóvenes y, sin embargo, algunas personas nunca desarrollan persistente infección por *H. pylori*.

El término gastritis crónica se refiere esencialmente a un diagnóstico histológico y se define como un proceso inflamatorio crónico en la mucosa gástrica, caracterizado por la presencia de polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos B y T, así como, de células plasmáticas. Si bien, diversos factores desencadenan el desarrollo de gastritis, como son la ingesta de alcohol o antiinflamatorios no esteroideos. La epidemiología mundial indica que el principal factor asociado al desarrollo de esta entidad clínica es la infección con *H. pylori* (Peek & Blaser, 2002).

Se han desarrollado diferentes clasificaciones con la finalidad de tener un consenso en las características de esta entidad clínica. En 1972, Whitehead y colaboradores establecieron una clasificación según el tipo de mucosa, el grado de gastritis, superficial o atrófica, y el tipo de metaplasia asociada (Whitehead, Truelove, & Gear, 1972). Strickland y Mackay, en 1973, clasificaron a la gastritis de acuerdo a la topografía en tipo A y B; la primera se refiere a la gastritis presente en el cuerpo gástrico, que frecuentemente se asocia a autoanticuerpos contra las células parietales, mientras que la gastritis de tipo B se presenta predominantemente en la parte distal del estómago (Strickland & Mackay, 1973). Posteriormente, Wyatt y Dixon, en 1988, propusieron una clasificación basada en las características histológicas y en la patogénesis de la gastritis,

de esta manera se clasificó a la gastritis en tipo A (autoinmune), Tipo B (bacteriana) y tipo C (química o por reflujo) (Wyatt & Dixon, 1988).

Finalmente, la clasificación para gastritis más reciente y de mayor uso, es la clasificación de Sydney, la cual surgió con la finalidad de conjuntar las clasificaciones previas y tomar en cuenta las observaciones endoscópicas e histológicas, con el objetivo de tener un sistema estandarizado de clasificación clínica, que además permite la valoración semicuantitativa de cada una de las observaciones realizadas. De esta manera, la clasificación de Sydney toma en cuenta la etiología, topografía y morfología observada (Price, 1991). Esta clasificación evalúa 5 parámetros a nivel histológico, la inflamación crónica, actividad de la gastritis (definida por la presencia de infiltrado de neutrófilos), atrofia, metaplasia intestinal y densidad bacteriana de *H. pylori*, las cuales son catalogadas como leve, moderado o severo.

La gastritis asociada a *H. pylori* puede manifestarse de diferentes formas, que va desde una gastritis en el antro o una gastritis en el cuerpo gástrico, hasta una pangastritis (con o sin presencia de atrofia gástrica). Estos diversos patrones de la gastritis se asocian además con el desarrollo de otras patologías, como la úlcera duodenal y el cáncer gástrico. La primera se asocia con una gastritis predominantemente en antro, mientras que el cáncer gástrico se ha asociado en mayor medida a una gastritis con atrofia en el cuerpo gástrico (Amieva et al., 2008). Es importante señalar que la presencia del proceso inflamatorio crónico en el estómago causa una destrucción progresiva de las estructuras glandulares del epitelio que está fuertemente asociado al desarrollo de la atrofia antes mencionada (Shepherd et al., 2013).

Las úlceras gástricas o duodenales, conocidas como úlceras pépticas, se definen como defectos de la mucosa con un diámetro de al menos 0,5 cm de penetración a través de la mucosa muscular. Las úlceras gástricas se producen a lo largo de la curvatura menor del estómago, en particular, en la transición del cuerpo a la mucosa del antro (Veldhuyzen van Zanten, Dixon, & Lee, 1999). En cambio, las úlceras duodenales, generalmente se producen en el bulbo duodenal, que es el área más expuesta al ácido gástrico.

El desarrollo de úlceras en la presencia de *H. pylori* está influenciada por una variedad de factores del huésped y bacterianas. Las úlceras en su mayoría se producen en los sitios donde la inflamación de la mucosa es más grave (Veldhuyzen van Zanten et al., 1999). En pacientes con disminución de la producción de ácido, esto normalmente es la zona de transición entre cuerpo gástrico y el antro, dando lugar a la enfermedad de úlcera gástrica. Si la producción de ácido es normal a alto, la inflamación más grave, por lo general, se encuentra en el estómago distal y el duodeno proximal, dando lugar a la enfermedad de úlcera yuxtapilórica y duodenal.

La metaplasia intestinal se considera una lesión preneoplásica, en la cual la mucosa gástrica normal se reemplaza por una con características de la mucosa intestinal (Busuttill & Boussioutas, 2009). Histológicamente, se observa un fenotipo que consiste en células caliciformes secretoras de moco y enterocitos con microvellosidades que expresan enzimas específicas del intestino, esta lesión aparece primero en la región entre el cuerpo-antro y con el tiempo se extiende a la mucosa colindante (Correa, Piazuolo, & Wilson, 2010).

Existen tres subtipos de metaplasia intestinal de acuerdo a las características que presenta el tejido; en la metaplasia intestinal completa (tipo I), el epitelio parece semejante al presente en el intestino delgado, con la presencia de enterocitos y células caliciformes. En ocasiones también se presentan células de Paneth (productoras de lisozimas), así como, sialomucinas. Posteriormente, la lesión progresa a una metaplasia de tipo incompleta (tipo II y III) en donde se observa el cambio en la morfología celular, la cual adquiere características que se observan en el intestino grueso (tipo II), con la presencia de células columnares y caliciformes, además de sialomucinas y mucinas neutras. En la última etapa de la metaplasia (tipo III) la morfología ya es de tipo colónica con la expresión de sulfomucinas (Barros et al., 2010).

El cáncer gástrico se refiere a cualquier neoplasma que surge en la región entre la unión gastroesofágica y el píloro. Es importante señalar que aproximadamente el 95% de los casos de cáncer gástrico tienen un origen epitelial por lo cual se denominan como adenocarcinomas.

El cáncer gástrico secundario a infección por *H. pylori*, con frecuencia no produce síntomas o son de carácter inespecífico. Aproximadamente 50% de los pacientes presentan síntomas de dispepsia en etapas tempranas o superficiales del cáncer gástrico y que pueden ser tratadas de manera quirúrgica. Cabe señalar que únicamente del 1 al 2% de los sujetos a los que se les realiza una endoscopia por síntomas de dispepsia son diagnosticados con cáncer, lo que se traduce en una demora en el diagnóstico de la enfermedad, por lo que aproximadamente 80% de los casos se detectan en etapas avanzadas, cuando ya existe metástasis y la efectividad de la resección quirúrgica es baja, lo que correlaciona con la alta mortalidad de la enfermedad, ya que la tasa de supervivencia a 5 años en los pacientes varía entre un 10 y 30% (Dicken et al., 2005).

Hasta el momento, la endoscopia se considera el procedimiento más sensible y específico de realizar el diagnóstico de cáncer gástrico, ya que permite la visualización de las lesiones y la toma de biopsias para realizar el análisis y diagnóstico histológico (Dicken et al., 2005). Sin embargo, el uso de esta técnica como una herramienta de tamizaje en población asintomática, sólo se utiliza en países como China y Japón, en donde la incidencia de cáncer gástrico es alta, y en el caso de países con una incidencia baja, sólo se recomienda en pacientes con alto riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico (p. ej., historia familiar de cáncer gástrico) (Dicken et al., 2005). Por tanto, se plantea la alternativa de desarrollar una prueba de tamizaje para la detección y diagnóstico temprano de cáncer gástrico, que no sea invasiva y que tenga un bajo costo para el monitoreo de la población general y que permita el monitoreo de la enfermedad en etapas tempranas.

Factores de virulencia de *Helicobacter pylori*

Dentro de los factores de virulencia de *H. pylori* más estudiados y relacionados fuertemente a la inducción de cáncer gástrico en pacientes infectados, se encuentran la isla de patogenicidad Cag (cag-PAI), la proteína asociada a la citotoxina (CagA) y la citotoxina vacuolizante (VacA).

H. pylori puede tener en su genoma una isla de patogenicidad llamada Cag (cag-PAI); la infección con cepas que poseen este segmento cromosomal se asocia con un mayor grado de inflamación de la mucosa gástrica y con una atrofia gástrica más grave, ambos

procesos celulares están asociados con el desarrollo de cáncer gástrico (Kusters et al., 2006).

A nivel mundial, estudios epidemiológicos han mostrado que cag-PAI está presente en aproximadamente el 70% de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes y también se han observado variaciones genotípicas dependiendo de la zona geográfica entre las cepas de Oriente y de Occidente (Jones, Whitmire, & Merrell, 2010).

La isla de patogenicidad cag-PAI tiene un tamaño aproximado de 40 kb y contiene alrededor de 31 genes, que en su mayoría presentan homología con genes del sistema de secreción tipo IV (SST4) de *Agrobacterium tumefaciens* (Tegtmeyer, Wessler, & Backert, 2011). Este sistema de secreción le permite a *H. pylori* translocar tanto a CagA, como a otros componentes bacterianos dentro de las células epiteliales [20]. *H. pylori* puede o no tener esta isla en su genoma, sin embargo, la infección con cepas que poseen este segmento cromosomal se asocia a un mayor grado de inflamación en la mucosa gástrica, así como, a la atrofia gástrica más grave, procesos celulares considerados importantes en el desarrollo de cáncer gástrico. En cag-PAI también se encuentra uno de los factores de virulencia más estudiados y altamente asociados a la inducción de cáncer gástrico que es la proteína asociada a la Citotoxina A (CagA) (Kusters et al., 2006).

CagA (*cytotoxin-associated gene A*) es uno de los factores de virulencia más estudiados y asociado al desarrollo de cáncer gástrico. Es una proteína de 120-145 kDa, codificada por el gen *cagA*, localizado en el extremo terminal de cag-PAI, un segmento cromosomal que se sugiere fue adquirido por transferencia horizontal (Hatakeyama, 2009). El Sistema de Secreción Tipo (SST4) le permite a *H. pylori* translocar tanto a CagA, como a otros componentes bacterianos dentro de las células epiteliales (Tegtmeyer et al., 2011), ocasionando cambios morfológicos, proliferación celular así como una respuesta proinflamatoria por parte del hospedero (Fig.1) (Kusters et al., 2006).

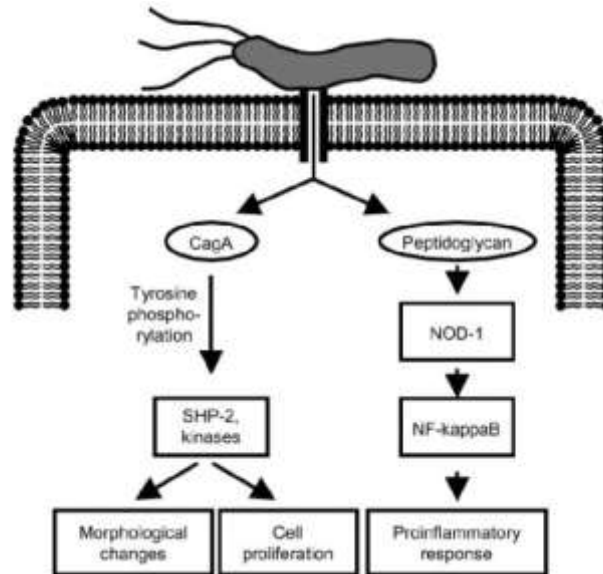


Figura 1. Representación esquemática de algunas implicaciones de la translocación de cagA (Kusters et al., 2006)

Otro factor de virulencia importante es la citotoxina vacuolizante (VacA: *Vacuolating cytotoxin A*) está codificada por el gen *vacA* el cual es polimórfico, es decir, puede presentar 4 variantes: *s1m1*, *s1m2*, *s2m2*, *s2m1*, siendo *s1m1* la que presenta mayor vacuolización *in vitro*. Esta proteína ejerce diversos efectos en las células epiteliales (Fig.2) (Mbulaiteye et al., 2009), como son la formación de vacuolas (su actividad más importante y mejor estudiada), la inducción de apoptosis y la supresión de la respuesta de linfocitos T.

La principal actividad biológica que presenta VacA es la inducción de vacuolas en las células epiteliales (Molinari et al., 1997), sin embargo, VacA tiene la capacidad de oligomerizarse en la membrana celular del epitelio y formar canales iónicos (Szabo, 1999), esto favorece el paso de nutrientes hacia el exterior de la célula que son aprovechados por la bacteria favoreciendo su crecimiento (Jones et al., 2010).

VacA también puede reducir la resistencia eléctrica trans-epitelial de las células epiteliales al incrementar la permeabilidad celular, lo que permite la liberación de cationes, de aminoácidos y de azúcares, favoreciendo la captación de nutrientes por la bacteria (Szabo, 1999). Si bien la consecuencia fisiológica de estos efectos durante la infección de *H. pylori* no son bien comprendidos, es posible que la formación de vacuolas

y de canales iónicos alteren el tráfico de moléculas en las células que tendrían consecuencias a nivel de sus funciones celulares (Palframan, Kwok, & Gabriel, 2012).

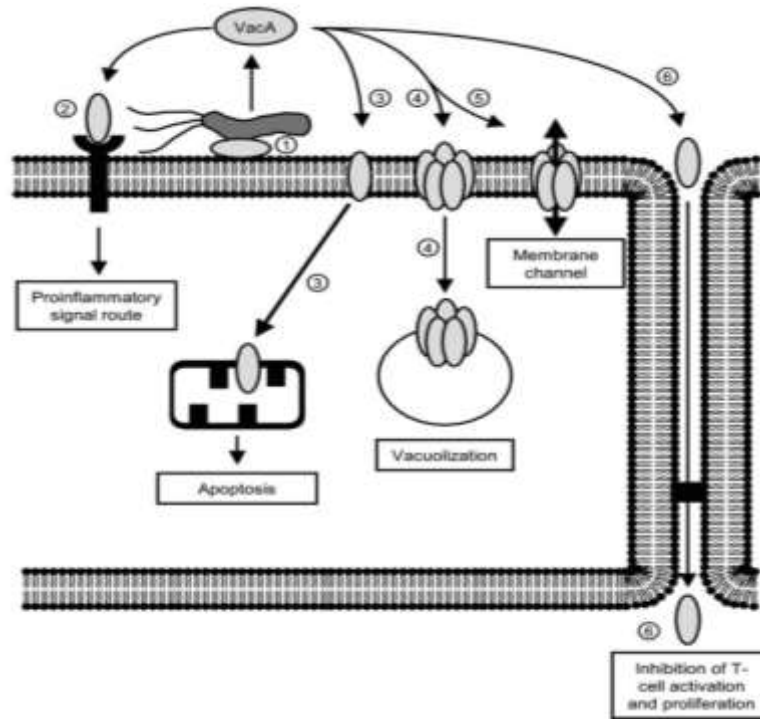


Figura 2. La proteína VacA influye en procesos celulares de diferentes formas, lo cual le permite la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori*. (1) VacA se une directamente a la superficie de la membrana de la célula hospedera. (2) puede unirse a un receptor de membrana de la célula hospedera e iniciar un proceso proinflamatorio. (3) puede introducirse a la célula para interactuar con la mitocondria e inducir apoptosis. (4) puede ser pinocitada e inducir vacuolización. (5) puede formar un canal en la membrana de la célula hospedera. (6) VacA puede atravesar las uniones estrechas de las células epiteliales gástricas e inhibir la activación y proliferación de células T. (Kusters et al., 2006)

Adhesinas

Las adhesinas son factores sumamente importantes en la infección de *H. pylori*, pues son las moléculas que le permiten adherirse al epitelio gástrico y favorecer la colonización. Hasta el momento se han descrito varias adhesinas algunas de ellas se muestran en la Tabla 1. En el presente trabajo nos centraremos en la adhesina BabA.

Tabla 1. Adhesinas y proteínas asociadas a la virulencia de *H. pylori* (Kusters et al., 2006).

Proteína	Posible función	Asociación con cuadros clínicos relacionados con <i>H. pylori</i>
BabA	Se une al antígeno fucosilado del grupo sanguíneo Le ^b en la célula hospedera	Ha sido relacionada con úlcera péptica y cáncer gástrico
SabA	Se une a los antígenos Le ^x y Le ^y y está involucrada en la activación de neutrófilos.	Desconocida
SabB	Se desconoce su receptor	Asociada con úlcera duodenal
OipA	Involucrado en la inducción de IL-8, pero esta asociación no es universal.	Relacionada con úlceras duodenal y cáncer gástrico
AlpA y AlpB	La inactivación de los genes <i>alpA</i> y <i>alpB</i> da como resultado una disminución de la adherencia a las células epiteliales gástricas y abate la colonización en el modelo de cobayo.	Desconocida
HP-NAP	Involucrado en la activación de neutrófilos; posible función en el almacenamiento de hierro.	Desconocida
Jhp09447-jhp0950 (región con plasticidad genética)	Desconocida	La plasticidad de esta región está asociada con el desarrollo de cáncer gástrico, linfoma MALT y úlcera duodenal
DupA	Proteína homóloga a VirB4.	Asociada con úlcera péptica pero también con menor riesgo de atrofia gástrica y cáncer

Adhesina BabA

En 1993 se reportó que la unión de *H. pylori* al epitelio gástrico humano era dependiente de la presencia de Lewis b, el cual es un antígeno fucosilado de los grupos sanguíneos. La expresión de Lewis b en los diferentes tejidos es variable (Evans & Evans, 2000). El reconocimiento del antígeno Le^{b+} por la adhesina BabA de *H. pylori* parece ser un factor clave en la colonización sitio específico. BabA tiene un papel importante en la virulencia de *H. pylori*, ha sido asociada con la enfermedad de úlcera péptica y con adenocarcinoma gástrico (Gerhard et al., 1999), sin embargo, estas asociaciones han sido controversiales. Estudios en modelos animales sugieren que la adhesión mediada por BabA es relevante para la colonización y la patogénesis de *H. pylori* (Rad et al., 2002).

Las bases moleculares del sistema sanguíneo ABO fueron elucidadas en 1990. Ya que se identificó el gen que codifica para una glicosiltransferasa, esta proteína transfiere N-acetil D-galactosamina (para el grupo sanguíneo A) o D-galactosa (para el grupo sanguíneo B) a los extremos no reducidos en las glicoproteínas o glicolípidos. El fenotipo del grupo sanguíneo O resulta de la inactivación del gen que codifica para la A1

glicosiltransferasa, por lo que los sujetos de grupo sanguíneo O sólo expresan el oligosacárido precursor denominado antígeno H (Fig 3). Los antígenos ABH no solo se encuentran en los eritrocitos, sino que también se encuentran ampliamente expresados en los fluidos corporales y tejidos (Anstee, 2010).

Los antígenos de Lewis a y b (Le^a y Le^b) están bioquímicamente relacionados con los grupos sanguíneos ABO (Weiner & Heppel, 1971). La expresión de los antígenos ABH está regulada por el gen secretor (*FUT2*) el cual codifica para una alfa-1,2-fucosiltransferasa capaz de transferir L-fucosa al carbono 2 de la galactosa del glicano $Gal\beta 1, 3GlcNAc-R$ (Fig 4). En la ausencia de la actividad de FUT2 (no secretor) la estructura resultante es Le^a . El producto de el gen *Le* es una alfa 1,3/4 fucosiltransferasa (FUT3), la cual transfiere L-fucosa al carbono 4 del N-acetil-D-galactosamina. La estructura presente en tejidos por la acción combinada de FUT2 y FUT3 es el antígeno Le^b . Los antígenos A y B solo están formados en tejidos de individuos en donde FUT2 está activa por la acción de la alfa-glucosiltransferasa capaz de transferir N-acetil-D-galactosamina o D-galactosa al carbono 3 del mismo glicano (Fig 4)(Anstee, 2010).

Una de las primeras asociaciones epidemiológicas entre los grupos sanguíneos con enfermedad y patologías gástricas fue entre sujetos con grupo sanguíneo O y úlcera péptica (Clarke et al., 1956). Existen estudios que han demostrado que una cepa de *H. pylori* P466 proveniente de sujetos de Sudamérica se une a las estructuras del grupo sanguíneo OLe^b pero no a ALe^b encontradas sobre el epitelio gástrico, proporcionando así una relación para la susceptibilidad del grupo O (Borén, Falk, Roth, Larson, & Normark, 1993). Estudios más recientes sobre las cepas de *H. pylori* de diferentes partes del mundo han demostrado que no todas las cepas son tan específicas para OLe^b , se han encontrado cepas no provenientes de América del Sur con la capacidad de unirse a ALe^b además de OLe^b . Sin embargo, estas cepas tienen una afinidad de unión mayor para OLe^b en comparación con ALe^b (Aspholm-Hurtig et al., 2004).

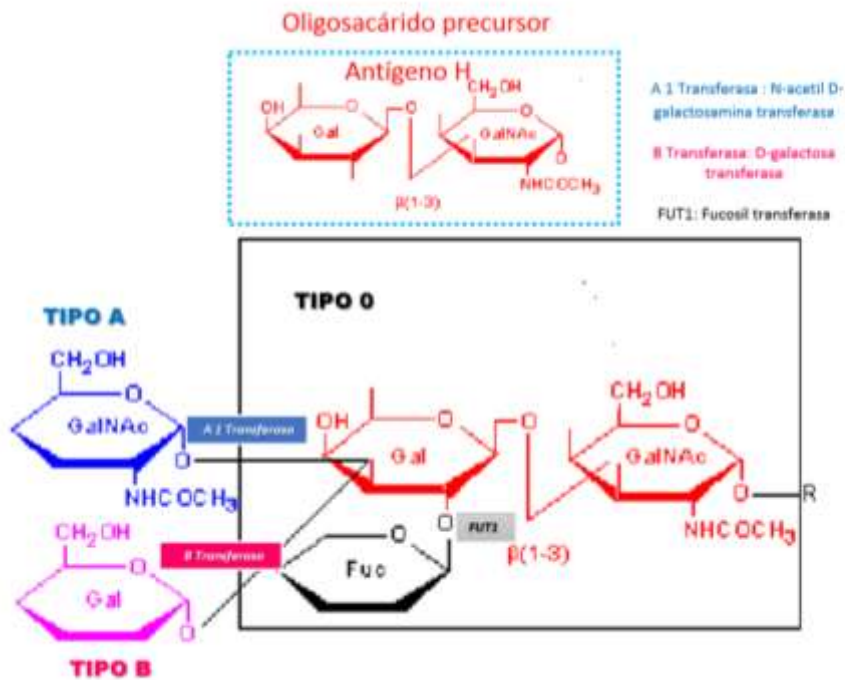


Figura 3. Representación esquemática de la síntesis de los antígenos del sistema de grupo sanguíneo ABO.

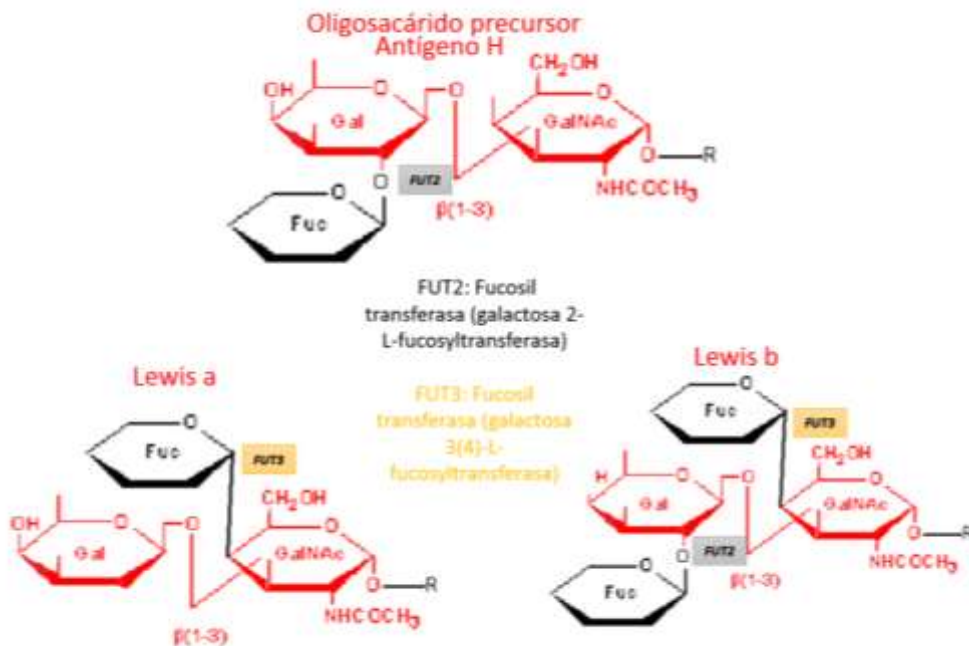


Figura 4. Representación esquemática de la síntesis de los antígenos del sistema de grupo sanguíneo Lewis a y Lewis b.

JUSTIFICACIÓN

BabA es una de las adhesinas mejor caracterizadas de *Helicobacter pylori* la cual se une a los antígenos del grupo sanguíneo Lewis b (Le^b) expresados en la superficie de los enterocitos de la mucosa gástrica y su expresión se ha asociado con cepas virulentas capaces de producir adenocarcinoma. Recientemente, nuestro grupo de trabajo observó que *H. pylori* puede unirse a los eritrocitos humanos en muestras de tejido de cáncer gástrico. Puesto que los eritrocitos también expresan los grupos Lewis b es probable que dicha interacción se lleve a cabo mediante BabA y esté asociada al gen *babA2*. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si *H. pylori* es capaz de adherirse a eritrocitos humanos de manera dependiente a los antígenos Lewis y si esta interacción afecta la integridad del eritrocito.

HIPÓTESIS

Las cepas de *Helicobacter pylori* tienen capacidad de adherirse a eritrocitos humanos y este fenómeno correlaciona con la presencia del gen *babA2* y del grupo Lewis.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de adherencia de cepas de *Helicobacter pylori babA2* positivas y negativas, de diferente origen clínico, a eritrocitos humanos de los grupos Le^{a+}, Le^{b+} y Le^{a-b-}.

OBJETIVOS PARTICULARES

Seleccionar cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con gastritis, metaplasia y cáncer gástrico; y genotipificarlas para los genes de virulencia *babA2*, *cagA* y *vacA*.

Estandarizar el ensayo de hemaglutinación con cepas de *H. pylori* de referencia y eritrocitos tipificados para los antígenos del sistema Lewis.

Determinar la capacidad de hemaglutinación de los aislados de *H. pylori* utilizando eritrocitos humanos de diferentes grupos sanguíneos del sistema Lewis.

Correlacionar la capacidad de hemaglutinación de las cepas *babA2+*, tanto con los genotipos *cagA* y *vacA*, así como con su origen clínico.

Correlacionar la capacidad de adherencia de las cepas de *Helicobacter pylori* *babA2+* y *babA2-*, de diferente origen clínico, con el grupo sanguíneo Lewis de los eritrocitos humanos.

Estandarizar un ensayo que nos permita determinar si la integridad del eritrocito se ve afectada (hemólisis) cuando las cepas se adhieren/interaccionan con los eritrocitos humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de cepas de *Helicobacter pylori*

Del cepario del Laboratorio de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas del Centro Médico Nacional Siglo XX IMSS, se seleccionaron cepas de *Helicobacter pylori* las cuales fueron previamente aisladas de biopsias de antro gástrico obtenidas de pacientes sometidos a endoscopia como parte del protocolo de diagnóstico. Se seleccionaron cepas de pacientes con gastritis no atrófica (GNA), metaplasia intestinal (MI) y de cáncer gástrico (CG). Para el aislamiento primario las muestras de tejido fueron homogenizadas e inoculadas en placas agar sangre de carnero, incubadas bajo condiciones microaerofílicas, a 37 °C. Las colonias con características morfológicas propias de *H. pylori* fueron confirmadas con las pruebas bioquímicas ureasa, catalasa, oxidasa positivas y con tinción de Gram. Se tomó una colonia del cultivo primario para ser propagada. Cada cepa se almacenó a -70 °C, en caldo Brucella, suplementado con 15% de glicerol hasta ser utilizadas. Se estudiaron un total 43 cepas de *H. pylori*: 15 de pacientes con GNA, 13 de pacientes con MI y 15 de pacientes con CG.

PCR para los genes *cagA*, *vacA* y *babA2*

Se realizó la caracterización de las cepas seleccionadas para los genes de virulencia *cagA*, *vacA* y *babA*, por medio de PCR. Las 43 cepas de *Helicobacteri pylori* se propagaron, el crecimiento bacteriano fue resuspendido en solución salina para la extracción de DNA. La extracción de DNA de cada cepa se realizó usando el kit Wizard genomic DNA purification kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) y fue resguardado a -70 °C para su posterior utilización. La presencia de los genes de virulencia *babA2*, *vacA* y *cagA* fue determinada por PCR preciamente descrita (Torres-Morquecho, Giono-Cerezo, Camorlinga-Ponce, Vargas-Mendoza, & Torres, 2010). Los iniciadores utilizados para cada gen se muestran en la Tabla 2. La amplificación de cada gen fue llevada a cabo de 25 µL que contenía 1 µL de DNA templado de cada aislado clínico, buffer de PCR 1X, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L de cada desoxinucleótido trifosfato (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 2 U de DNA Taq polimerasa (Invotrogen, Carsbad CA, USA), y 30 mmol/L de cada iniciador (Tabla 2). La reacción de amplificación se realizó por 35 ciclos para cada gen en un sistema de PCR GeneAmp (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA), y los amplicones fueron analizados en un gel de agarosa al 1% (Vásquez-Jiménez *et al.* 2015). La reacción en cadena de la polimerasa para los genes *babA2* y *cagA* fue realizada con el fin de detectar la presencia de dichos genes, mientras que para el gen *vacA* fue realizada para genotipificar la región señal y media de dicho gen. Como controles fueron utilizadas las cepas de referencia de *Helicobacter pylori* 26695 (*cagA*-, *babA2*-, *m1*), J99 (*cagA*+, *babA2*+, *s1m1*), 8822 (*cagA*-, *babA2*-, *s2m2*) y la cepa 8823 (*cagA*+, *babA2*-, *s1m1*).

Tabla 2. Iniciadores utilizados para la amplificación de los genes de virulencia *babA2*, *cagA* y *vacA*.

Gen	Iniciador	Secuencia
<i>babA2</i>	babA2F babA2R	AATCCAAAAAGGAGAAAAAGTATGAAA TGTTAGTGATTTCCGGTGTAGGACA
<i>cagA</i>	F1 B1	GATAACAGCCAAGCTTTTGAGG CTGCAAAGATTGTTTGGCAGA
<i>vacAs1/s2</i>	VACS-F VACS-R	ATGGAAATACAACAAACACAC CCTGAGACCGTTCCTACAGC
<i>vacAm1/m2</i>	VACM-F VACM-R	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG TGAGGTTGTTTGATATTGAC

Estandarización del ensayo de hemaglutinación bacteriana

Para la estandarización se utilizaron cultivos de 48 horas de las cepas de referencia TX30 (*babA2*⁻, *cagA*⁻ y *s2m2*) y J99 (*babA2*⁺, *cagA*⁺ y *s1m1*). La preparación del inóculo bacteriano se realizó tomando de una placa de agar sangre varias colonias con un hisopo estéril, el cual se distribuyó de manera homogénea sobre la superficie de otra placa de agar sangre y se incubó a 37 °C por 48 horas en condiciones microaerofílicas. Pasado este tiempo con un asa estéril se tomó toda la biomasa de la caja, se colocó en un tubo con 1500 µL de PBS, se resuspendió y se determina la concentración bacteriana utilizando el espectrofotómetro a una absorbancia de 625nm. Las concentraciones bacterianas se ajustaron de acuerdo a los tubos 1, 2 y 3 del Estándar del Mc Farland (Tabla 3).

Tabla 3. Estándar de Mc Farland correspondiente a los tubos 1,2 y 3.

Estándar de Mc Farland			
Tubo	1	2	3
Densidad celular aproximada X10 ⁸ /mL	3	6	9
Absorbancia 625 nm	0.14 – 0.17	0.27 – 0.31	0.38 – 0.42

Como se muestra en la Figura 1, en una placa de 96 pozos con fondo en U, por muestra por duplicado se colocaron 50 µL de cada una de las suspensión bacteriana, las cuales corresponde a una concentración bacteria del tubo 1, 2 y 3 de Mc Farland y de una dilución 1:2 en los pozos. A cada pozo se le agregó 50 µL de una suspensión de eritrocitos al 2%. Los ensayos se realizaron por cepa con cada uno de los diferentes grupos de Lewis (Le^{a+}, Le^{b+} y Le^{a-b}). El ensayo se dejó a temperatura ambiente con na incubación de 3 horas.

Los eritrocitos utilizados en este trabajo fueron tipificados por el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI UMAE.

Para la selección de la mejor concentración bacteriana se tomó en cuenta la formación de la malla en el fondo del pozo.









































































	Lewis a+				Lewis b+				Lewis a-b-			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Cepa TX30												
												
												
Cepa J99												
												
												
Bacteria	50 µL	50 µL	50 µL (1:2)	50 µL (1:2)	50 µL	50 µL	50 µL (1:2)	50 µL (1:2)	50 µL	50 µL	50 µL (1:2)	50 µL (1:2)
Eritrocitos	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Figura 5. Representación esquemática de la organización del ensayo de hemaglutinación de *Helicobacter pylori* utilizando eritrocitos humanos Le^{a+}, Le^{b+} y Le^{a-b-}. Los experimentos se realizaron por duplicado para cada concentración bacteriana.

Estandarización del ensayo de hemólisis

De un cultivo de 24 horas de la cepa J99 (*babA2+*, *cagA+* y *s1m1*), crecida en medio sólido de Agar sangre bajo condiciones microaerofílicas, a 37 °C, de un cultivo masivo se recolecto la biomasa y se respondió en PBS a diferentes densidades ópticas según los nueve tubos del Estándar de Mc Farland (Tabla 4).

Tabla 4. Estándar de Mc Farland y sus densidades celulares aproximadas para cada tubo.

Estándar de Mc Farland									
Tubo	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8
Densidad celular aproximada X10 ⁸ mL	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24
Absorbancia 625 nm	0.08	0.14	0.27	0.38	0.51	0.67	0.74	0.83	0.94
	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	0.10	0.17	0.31	0.42	0.55	0.70	0.77	0.88	0.98

Se utilizaron dos condiciones distintas con respecto al volumen de suspensión bacteriana y el volumen de la suspensión de eritrocitos Lewis b al 2%, para cada densidad óptica de acuerdo al Estándar de Mc Farland.

En la **condición A** se utilizó 150 µL de suspensión bacteriana y 1350 µL de suspensión de eritrocitos al 2%, los cuales corresponden al 10% y 90% del volumen total respectivamente (Tabla 5).

En la **condición B** se utilizó 300 µL de suspensión bacteriana y 1200 µL de suspensión de eritrocitos al 2%, los cuales corresponde al 20% y 80% del volumen total respectivamente (Tabla 5).

El experimento se realizó en micro-tubos de 2 mL por duplicado, como controles negativos se sustituyó el volumen de suspensión bacteriana por PBS.

Tabla 5. Condiciones utilizadas para la estandarización del ensayo de hemólisis de acuerdo a la proporción del volumen de la suspensión bacteriana y el volumen de la suspensión de eritrocitos Lewis b con respecto a cada tubo del Estándar de Mc Farland.

Tubo Estándar	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8
Condición A									
Volumen de suspensión bacteriana (%V _T)	150 µL (10%)	150 µL (10%)	150 µL (10%)	150 µL (10%)	150 µL (10%)	150 µL (10%)	150 µL (10%)	150 µL (10%)	150 µL (10%)
Volumen de suspensión de eritrocitos Le ^b (%V _T)	1350 µL (80%)	1350 µL (80%)	1350 µL (80%)	1350 µL (80%)	1350 µL (80%)	1350 µL (80%)	1350 µL (80%)	1350 µL (80%)	1350 µL (80%)
Condición B									
Volumen de suspensión bacteriana (%V _T)	300 µL (20%)	300 µL (20%)	300 µL (20%)	300 µL (20%)	300 µL (20%)	300 µL (20%)	300 µL (20%)	300 µL (20%)	300 µL (20%)
Volumen de suspensión de eritrocitos Le ^b (%V _T)	1200 µL (80%)	1200 µL (80%)	1200 µL (80%)	1200 µL (80%)	1200 µL (80%)	1200 µL (80%)	1200 µL (80%)	1200 µL (80%)	1200 µL (80%)

Las muestras se incubaron por 3 horas a 37 °C con agitación a 300 rpm. Transcurrido el tiempo se centrifugaron a 4000 rpm por 5 minutos, y el sobrenadante se leyó a 540 nm en el espectrofotómetro para la detección de hemoglobina liberada.

Para los controles negativos sólo se agregó el volumen de PBS que correspondería al volumen de bacteria en su lugar.

RESULTADOS

Selección de cepas de *Helicobacter pylori*

Se seleccionaron un total de 43 cepas de *H. pylori*, 15 de pacientes con gastritis no atrófica (GNA), 13 de pacientes con metaplasia intestinal (MI) y 15 de pacientes con cáncer gástrico (CG), de género y edad indistinto.

Caracterización molecular de las cepas *H. pylori* para los genes de virulencia *cagA*, *vacA* y *babA*

Como se muestra en la tabla 3, el 86.6% de las cepas aisladas de sujetos con gastritis y de cáncer gástrico fueron positivas para el alelo *s1m1* del gen *vacA* y el 13.3% para el alelo *s2m2* mientras que todas las cepas aisladas de pacientes con metaplasia fueron positivas para el alelo *s1m1*. Todas las cepas de metaplasia y de cáncer gástrico fueron positivas para el gen *cagA* comparado con el 86.6% de las cepas de gastritis. El gen *babA2* fue menos prevalente en los aislados de gastritis (53.3%) y más prevalente en los aislados de cáncer gástrico (Tabla6).

Tabla 6. Cepas de *Helicobacter pylori* seleccionadas y su genotipo de acuerdo a los genes de virulencia *cagA*, *vacA* y *babA2*.

	<i>vacA</i>		<i>cagA</i>	<i>babA2</i>
	<i>s1m1</i>	<i>s2m2</i>		
15 Gastritis (%)	13 (86.6)	2 (13.3)	13(86.6)	8(53.3)
13 Metaplasia (%)	13 (100)	0 (0)	13 (100)	8 (61.5)
15 Cáncer gástrico (%)	13 (86.6)	2 (13.3)	15 (100)	12 (80)

Con respecto a los genotipos el más prevalente fue el de *s1m1*, *cagA*+, *babA2*+, siendo más frecuente en los aislados de cáncer gástrico (66.6) y menos frecuente en gastritis (46.6%), seguido por el genotipo *s1m1*, *cagA*+, *babA2*- el cual es más frecuente en los pacientes con gastritis (Tabla 7)

Tabla 7. Distribución de los genotipos por origen clínico.

Genotipo	Gastritis	Metaplasia	Cáncer
<i>s1m1, cagA+, babA2+</i>	7 (46.6%)	8 (61.5%)	10 (66.6%)
<i>s1m1, cagA+, babA2-</i>	6 (40%)	5 (38.4%)	3 (20%)
<i>s2m2, cagA+, babA2+</i>			1 (6.6%)
<i>s2m2, cagA+, babA2-</i>			1 (6.6%)
<i>s2m2, cagA-, babA2+</i>	1 (6.6%)		
<i>s2m2, cagA-, babA2-</i>	1 (6.6%)		

Estandarización del ensayo de hemaglutinación de *H. pylori* con eritrocitos humanos Le^{a+}, Le^{b+} y Le^{a-b-}

A partir de la estandarización del ensayo de hemaglutinación con la cepa TX30 (*babA2-*, *cagA-* y *s2m2*) utilizada a partir de cultivos de 48 horas, de acuerdo a las concentraciones utilizadas correspondientes al Estándar de Mc Farland, se obtuvieron mejores resultados para la concentración del tubo 2 e cual corresponde a una densidad óptica de 0.31 y una densidad celular aproximada de 6×10^8 cel/mL (Fig 6); a ésta concentración se observó una mejor formación de la malla con respecto a las otras concentraciones, en las cuales, para el tubo 1 la mayor parte del contenido de eritrocitos se sedimentó en el fondo del pozo sin alcanzar a formar la malla de hemaglutinación, para el caso del tubo 3 de igual forma no se logró tener una correcta formación de la malla probablemente por exceso de células bacterianas.

En la concentración donde se obtuvo mejores resultados para la formación de la malla de hemaglutinación con la cepa TX30 se pudo observar claramente que dicha malla se forma completamente cuando se puso a interactuar *H. pylori* con los eritrocitos Le^{b+}, ya que para los eritrocitos Le^{a+} y Le^{a-b-} solo se cubrió parcialmente fondo del pozo con la formación de un anillo.





Cepa TX30	Genotipo <i>babA2-</i> , <i>cagA-</i> y <i>s2m2</i>
Control negativo	
Tubo 1 DO 0.17 a 625nm	
Tubo 2 DO 0.31 a 625nm	
Tubo 3 DO 0.42 a 625nm	

Figura 6. Estandarización del ensayo de hemaglutinación con la cepa de referencia TX30 para los tubos 1, 2 y 3 del Estándar de Mc Farland.

La cepa J99 (*babA2+*, *cagA+* y *s1m1*), presenta un fenómeno similar al de la cepa T30, en las concentraciones bacterianas correspondientes a los tubos 1 y 3 del Estándar de Mc Farland la formación de la malla no fue alcanzada (Fig. 7). Para el caso de la densidad óptica del tubo 2, se pudo observar que a pesar de que para todos los tipos sanguíneos Lewis no se formó una malla completamente, los eritrocitos no se sedimentan en el fondo como en el caso de las otras variables. De esta manera se determinó que la mejor concentración de células bacterias para el ensayo de hemaglutinación es la que corresponde al tubo 2 del Estándar de Mc Farland.





Cepa J99	Genotipo <i>babA2+</i> , <i>cagA+</i> y <i>s1m1</i>
Control negativo	
Tubo 1 DO 0.17 a 625nm	
Tubo 2 DO 0.31 a 625nm	
Tubo 3 DO 0.42 a 625nm	

Figura 7. Estandarización del ensayo de hemaglutinación con la cepa de referencia J99 para los tubos 1, 2 y 3 del Estándar de Mc Farland.

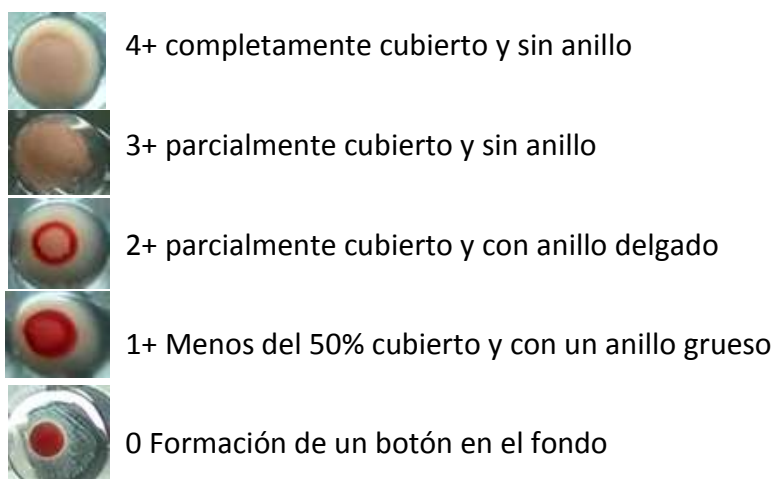
Además, el ensayo de estandarización también mostró que las dos cepas de referencia se adhieren de manera diferencial a los eritrocitos, la cepa TX30 mostró una mejor hemaglutinación con los eritrocitos Le^{b+} que la J99, ya que para los eritrocitos Le^{a+} y Le^{a-} solo se cubrieron parcialmente el fondo del pozo observándose la formación de un anillo (Fig 6 y 7).

Ensayo de hemaglutinación de las cepas de *H. pylori* de diferente origen clínico y eritrocitos humanos del grupo Le^{a+}, Le^{b+} y Le^{a-b-}

Como resultado de la estandarización del ensayo de hemaglutinación se decidió realizar el experimento bajo las siguientes condiciones: las colonias de *H. pylori* cultivadas en medio sólido por 48 horas se cosecharon y resuspendieron en 1500 µL de PBS, de acuerdo a los resultados obtenidos en la estandarización se decidió utilizar la suspensión bacteriana correspondiente a D.O. 625 0.31 que corresponde a una densidad celular aproximada de 6X10⁸ cel/mL.

De igual forma el ensayo se realizó en una placa de 96 pozos con fondo en U donde se colocaron 50 µL de suspensión bacteriana y 50 µL de una suspensión de eritrocitos al 2%. Se dejaron incubar por 3 horas a temperatura ambiente. El experimento se realizó por duplicado para cada cepa y para cada tipo sanguíneo.

Los resultados del ensayo de hemaglutinación se evaluaron según la forma y tamaño de la malla en el fondo del pozo. Se utilizó como puntuación semicuantitativa de la reacción de hemaglutinación los siguientes valores (Nilius et al., 2001):



Ensayo de hemaglutinación con cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con gastritis

Los ensayos de hemaglutinación para las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con gastritis en su mayoría hemaglutinaron con un valor semicuantitativo de 4, independientemente de la presencia del gen *babA2*. Solo dos cepas mostraron patrones diferentes en la formación de la malla, la cepa 2005-100 y la cepa 2005-75, *babA2+* y *babA2-* respectivamente. A continuación, se muestran los resultados representativos de las cepas correspondientes a origen clínico gastritis (Fig. 8) (Tabla 8)



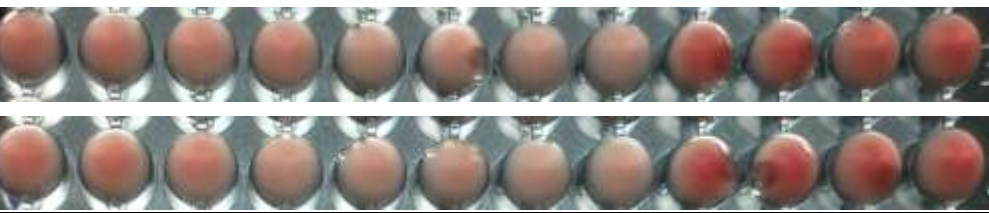

	Le ^{a+}				Le ^{b+}				Le ^{a-b-}			
2003-93	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												
2005-100	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1
	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1
												
2003-150	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												
2011-131	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												

Figura 8. Ejemplos representativos del ensayo de hemaglutinación para las cepas aisladas de pacientes con gastritis.

Ensayo de hemaglutinación con cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con metaplasia intestinal

De las 13 cepas aisladas de pacientes con metaplasia intestinal, 10 de ellas presentaron una hemaglutinación con valor de 4; sólo 3 cepas presentaron un patrón menor a ese valor máximo de hemaglutinación, la cepa 2005-152 *babA2*⁻, 2006-276 *babA2*⁺ y 2006-690 *babA2*⁺; 4 de las cepas negativas para la presencia del gen *babA2* hemaglutinaron con un valor de 4 para los tres tipos de Lewis evaluados (Figuras suplementarias). A continuación, se muestran los resultados representativos correspondientes para las cepas aisladas de sujetos con metaplasia intestinal (Fig 9) (Tabla 9).





	Le ^{a+}				Le ^{b+}				Le ^{a-b-}			
2003-230	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												
2005-226	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												
2005-152	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2
												
2006-276	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1
	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1
												

Figura 9. Ejemplos representativos del ensayo de hemaglutinación para las cepas aisladas de pacientes con metaplasia.

Ensayo de hemaglutinación con cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con cáncer gástrico

Del total de las 15 cepas de *Helicobacter pylori*, 11 formaron una malla de hemaglutinación con valor de 4. La cepa 2011-117 *babA2*- presento un patrón de hemaglutinación con un valor de 3 para todos los tipos de Lewis. Las cepas 2006-52 y 2010-8 hemaglutinaron los eritrocitos Lewis a con un valor de 4 y de 3. Un fenómeno similar sucedió con la cepa 2010-3, pero en éste caso con los Lewis ^{a-b-} (Figuras suplementarias). A continuación, se muestra de forma gráfica los ejemplos representativos las cepas de *Helicobacter pylori* de pacientes de cáncer gástrico (Fig 10) (Tabla 10).




	^{a+} Le				^{b+} Le				^{a-b-} Le			
2011-145	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												
2004-202	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												
2011-117	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
												

Figura 10. Ejemplos representativos del ensayo de hemaglutinación para las cepas aisladas de pacientes con metaplasia.

Tabla 8. Hemaglutinación de las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con gastritis no atrófica y sus respectivos genotipos.

Origen clínico	No de cepa	<i>vacA</i>	<i>cagA</i>	<i>babA2</i>	Lewis a	Lewis b	Lewis a-b-
Gastritis	2003-93	s1m1	1	1	4	4	4
	2003-108	s1m1	1	1	4	4	4
	2005-337	s1m1	1	1	4	4	4
	2006-73	s1m1	1	1	4	4	4
	2005-100	s1m1	1	1	1	2	1
	2003-8	s1m1	1	1	4	4	4
	2005-190	s2m2	0	1	4	4	4
	2011-41	s1m1	1	1	4	4	4
	2005-83	s1m1	1	0	4	4	4
	2011-147	s1m1	1	0	4	4	4
	2003-150	s1m1	1	0	4	4	4
	2005-75	s2m2	0	0	2	4	1
	2011-131	s1m1	1	0	4	4	4

Tabla 9. Hemaglutinación de las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con metaplasia intestinal y sus respectivos genotipos.

Origen clínico	No de cepa	<i>vacA</i>	<i>cagA</i>	<i>babA2</i>	Lewis a	Lewis b	Lewis a-b-
Metaplasia	2003-230	s1m1	1	1	4	4	4
	2006-106	s1m1	1	1	4	4	4
	2003-142	s1m1	1	1	4	4	4
	2005-119	s1m1	1	1	4	4	4
	2006-276	s1m1	1	1	1	2	1
	2006-427	s1m1	1	1	4	4	4
	2006-309	s1m1	1	1	4	4	4
	2006-690	s1m1	1	1	3	3	3
	2005-226	s1m1	1	0	4	4	4
	2005-106	s1m1	1	0	4	4	4
	2005-152	s1m1	1	0	2	1	2
	2006-409	s1m1	1	0	4	4	4
	2006-416	s1m1	1	0	4	4	4

Tabla 10. Hemaglutinación de las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con cáncer gástrico y sus respectivos genotipos.

Origen clínico	No de cepa	<i>vacA</i>	<i>cagA</i>	<i>babA2</i>	Lewis a	Lewis b	Lewis a-b-
Cáncer gástrico	2006-52	s1m1	1	1	3	4	4
	2004-202	s1m1	1	1	4	4	4
	2010-5	s1m1	1	1	4	4	4
	2010-8	s1m1	1	1	3	4	4
	2010-12	s2m2	1	1	4	4	4
	2010-3	s1m1	1	1	3	4	3
	2010-2	s1m1	1	1	4	4	4
	2010-10	s1m1	1	1	4	4	4
	2010-11	s1m1	1	1	4	4	4
	2011-51	s1m1	1	1	4	4	4
	2011-152	s1m1	1	1	4	4	4
	2011-145	s1m1	1	0	4	4	4
	2011-69	s2m2	1	0	4	4	4
	2003-336	s1m1	1	0	4	4	4
	2011-117	s1m1	1	0	3	3	3

Estandarización del ensayo de hemólisis

La cepa J99 (*babA2+*, *cagA+* y *s1m1*) presentó un mayor valor de hemólisis para el tubo 2 del Estándar de Mc Farland en ambas condiciones. Por este motivo se decidió utilizar esta concentración bacteriana para los siguientes ensayos.

Tabla 11. Promedio de los valores de la densidad óptica para cada concentración bacteria correspondiente a los tubos del Estándar de Mc Farland.

Estándar de Mc Farland (X10 ⁸ cel/mL)	Condición A (D.O. 540 nm)	Condición B (D.O. 540 nm)
0.5 (1.5)	0.017	0.019
1 (3)	0.023	0.028
2 (6)	0.028	0.032
3 (9)	0.011	0.017
4 (12)	0.017	0.015
5 (15)	0.012	0.014
6 (18)	0.020	0.018
7 (21)	0.015	0.012
8 (24)	0.013	0.021

Ensayo de hemólisis

De acuerdo a los resultados de la estandarización del ensayo de hemólisis, se decidió realizar los experimentos con las cepas de campo bajo las siguientes condiciones. De un cultivo de *Helicobacter pylori* de 24 horas se recolectó la biomasa y se resuspendió en PBS para tener una suspensión con una DO₆₂₅ de 0.31, la cual se eligió como la mejor concentración para realizar el ensayo, ya que de acuerdo a los resultados de la estandarización a este valor se obtuvo el mayor porcentaje de hemólisis.

En un microtubo de 2ml se puso a incubar 300 µL de la suspensión bacteriana más 1200 µL de una suspensión de eritrocitos humanos al 2%, éstos valores fueron las proporciones de volumen con mayor porcentaje de hemólisis en la estandarización. Las muestras se incubaron por 3 horas a 37 °C con agitación a 300 rpm.

Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras a 4000 rpm por 5 minutos, y el sobrenadante se leyó a 540 nm en el espectrofotómetro con la finalidad de detectar la hemoglobina liberada de los eritrocitos.

Para los controles negativos sólo se agregó el volumen de PBS que correspondería al volumen de bacteria en su lugar. Los controles positivos se obtuvieron a partir de la sonicación por 30 segundos de eritrocitos humanos siendo este valor el 100% de hemólisis. Y también se utilizó como control positivo *Staphylococcus aureus*, con el fin de ajustar los resultados a una bacteria hemolítica siendo ésta el parámetro del 100% de hemólisis. Cada ensayo se realizó por triplicado para cada cepa y para cada grupo sanguíneo. Los resultados del ensayo de hemólisis serán presentados en porcentaje de hemólisis.

Los valores de absorbancia de las cepas de campo (Tabla 13) se ajustaron a los valores obtenidos con *Staphylococcus aureus* y con los eritrocitos sonicados. Tomando en cuenta el 100% de hemólisis los valores de absorbancia obtenidos de la cepa *Staphylococcus aureus* (Tabla 12) para los eritrocitos de corresponden a los grupos Lewis, el valor de hemólisis obtenido fue de 32.65% (Tabla 14) para los eritrocitos Lewis b con la cepa 2008-34. En el caso donde se tomó como el 100% de hemólisis los valores de absorbancia obtenidos de los eritrocitos sonicados (Tabla 12), los porcentajes de

hemólisis disminuyeron considerablemente con éste control arrojándonos un porcentaje máximo de hemólisis del 8.98% (Tabla 15)

Tabla 12. Valores de absorbancia de *Staphylococcus aureus* para eritrocitos Le^{a+}, Le^{b+} y Le^{a-b-}.

Cepa	Lewis a	Lewis b	Lewis a-b-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.454	0.294	0.25
Eritrocitos sonicados	0.92	0.657	0.626

Tabla 13. Valores de absorbancia de 10 cepas de *Helicobacter pylori* para eritrocitos Le^{a+}, Le^{b+} y Le^{a-b-}.

Cepa	Lewis ^{a+}	Lewis ^{b+}	Lewis ^{a-b-}
2005-100	0.0106	0.014	0.003
2011-152	0.0126	0.021	0.004
2006-4	0.066	0.057	0.032
2011-117	0.043	0.035	0.03
2003-356	0.038	0.029	0.021
2011-69	0.048	0.028	0.015
2008-31	0.079	0.059	0.026
2003-336	0.059	0.055	0.03
2008-34	0.093	0.096	0.024
TX30	0.094	0.066	0.032

Tabla 14. Porcentaje de hemólisis de las cepas de *H. pylori* tomando como 100% los resultados obtenidos con *Staphylococcus aureus* para eritrocitos Le^{a+}, Le^{b+} y Le^{a-b-}.

<i>Staphylococcus aureus</i> 100%			
Origen clínico de la cepa	% Hemólisis Le ^{a+}	% Hemólisis Le ^{b+}	% Hemólisis Le ^{a-b-}
Gastritis	2.33	4.76	1.2
Gastritis	2.78	7.14	1.6
Gastritis	14.54	19.39	12.8
Metaplasia intestinal	9.47	11.9	12
Metaplasia intestinal	8.37	9.86	8.4
Metaplasia intestinal	10.57	9.52	6
Cáncer gástrico	17.4	20.07	10.4
Cáncer gástrico	13	18.71	12
Cáncer gástrico	20.48	32.65	9.6
TX30	20.7	22.45	12.8
Promedio por grupo sanguíneo	12.0	15.6	8.7

Tabla 15. Porcentaje de hemólisis de las cepas de *H. pylori* tomando como 100% los resultados obtenidos con los eritrocitos Le^{a+}, Le^{b+} y Le^{a-b-} sonificados.

Eritrocitos sonificados 100%			
Origen clínico de la cepa	% Hemólisis Le ^{a+}	% Hemólisis Le ^{b+}	% Hemólisis Le ^{a-b-}
Gastritis	1.15	2.13	0.48
Gastritis	1.37	3.2	0.64
Gastritis	7.17	8.68	5.11
Metaplasia intestinal	4.67	5.33	4.79
Metaplasia intestinal	4.13	4.41	3.35
Metaplasia intestinal	5.22	4.26	2.4
Cáncer gástrico	8.59	8.98	4.15
Cáncer gástrico	6.41	8.37	4.79
Cáncer gástrico	10.11	14.61	3.83
TX30	10.22	10.05	5.11
Promedio por grupo sanguíneo	5.9	7	3.5

DISCUSIÓN

Con base en una observación de nuestro grupo de trabajo en donde en muestras de tejido de cáncer gástrico se observó que *H. pylori* parecía estar adherida a los eritrocitos, es que nos dimos a la tarea de evaluar si esta bacteria es capaz de adherirse diferencialmente a ellos, puesto que se ha reportado que la adhesina BabA de *H. pylori* se une al grupo Lewis b de las células epiteliales gástricas humanas (Borén et al., 1993). Ya que los eritrocitos también presentan este grupo sobre la superficie, es que consideramos que tal vez en la adherencia, BabA participe en la interacción con los eritrocitos.

En este trabajo demostramos que *H. pylori* tiene la capacidad de unirse a los eritrocitos y de hemaglutinarlos. Cabe mencionar, que las cepas de *H. pylori* hemaglutinaron independiente de ser positivas para el gen de la adhesina BabA, por lo cual concluimos que la hemaglutinación parece ser independiente de esta adhesina o si es que esta adhesina participa, no es la única.

Otra adhesina de *H. pylori*, SabA, se ha descrito que se une a estructuras sialiladas presentes en la mucina gástrica y en las células epiteliales (Unemo et al., 2005). Los eritrocitos, al igual que la mayoría de las células, contienen en su superficie residuos sialilados, por lo que es probable que SabA también participe en la adhesión a eritrocitos. La capacidad de las cepas de *H. pylori* de unirse a los carbohidratos sialilados tal parece que le permite a este patógeno adaptarse a cambios en los patrones de glicosilación del huésped durante la infección (Aspholm et al., 2006).

Por otro lado, observamos que la hemaglutinación por *H. pylori* no depende del grupo Lewis, ya que las cepas de *H. pylori* evaluadas en este trabajo, hemaglutinaron tanto a los eritrocitos Le^{a+}, Le^{b+} y Le^{a-b-}; cabe mencionar que todos estos eritrocitos son del grupo O.

La capacidad de hemaglutinar de una bacteria se ha asociado a su virulencia, ya que indica su capacidad de adherirse a las células del hospedero porque las células de un sujeto expresan en su superficie las moléculas principales de los grupos sanguíneos (Anstee, 2010). Por ejemplo, las hemaglutininas (fimbrias, adhesinas) de *E. coli* son más prevalentes en las cepas asociadas a infecciones gastrointestinales y de vías urinarias

que en las cepas comensales. Estas hemaglutininas les confieren a estas cepas de *E. coli*, la capacidad de unirse de manera diferente a los enterocitos, al uroepitelio o de colonizar al riñón (Provence & Curtiss, 1992). Por otro lado, se ha documentado que la formación de biopelículas bacterianas esta mediado también por hemaglutininas, tal es el caso de la hemaglutinina de *Staphylococcus epidermidis* PIA-HA, las cepas que presentan esta adhesina han estado asociadas a brotes nosocomiales post cirugías (Rupp, Ulphani, Fey, Bartscht, & Mack, 1999).

Varios estudios epidemiológicos han documentado que los sujetos del grupo sanguíneo O presentan casos mas severos de cólera y una mayor susceptibilidad a la infección por *E. coli* 0157:H7 (Anstee, 2010). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la cepa sudamericana de *H. pylori* P466 se une a células del epitelio gástrico que expresan el grupo sanguíneo O Lewis b pero no a las que expresan grupo A Lewis b, apoyando las observaciones de que los sujetos O son más susceptibles a la infección con *H. pylori* (Borén et al., 1993).

En los tejidos de humanos o animales, la concentración de hierro libre es muy baja, ya que la mayoría del hierro esta formando parte de la hemoglobina, y la poca que está libre es queladada por la transferrina en el suero o por la lactoferrina en las superficies mucosas, por lo que no hay hierro libre necesario para muchas de las funciones de las bacterias (van Vliet, Bereswill, & Kusters, 2001). De tal manera que las hemolisinas bacterianas juegan un papel importante en la adquisición de nutrientes y en la liberación del hierro intracelular, permitiéndoles el acceso para su crecimiento (Braun & Focareta, 1991).

Se ha demostrado que la expresión de varios genes de hemolisinas de *E. coli* está regulada por el hierro presente en el medio de cultivo (Braun & Focareta, 1991). Varios patógenos producen hemolisinas y estas son importantes en la virulencia de varias especies bacterianas, tales como *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Listeria monocytogenes* por mencionar algunas.

Las hemolisinas bacterianas pueden dividirse en tres categorías de acuerdo con su mecanismo de acción sobre la membrana de la célula blanco: las enzimáticas (la cual incluye a las fosfolipasas), las formadoras de poros y las surfactantes (Lata, Paul, &

Chattopadhyay, 2014). Hasta el momento, existe un reporte que ha sugerido que *H. pylori* puede tener una actividad hemolítica cuando se cultiva en placas de agar sangre sin lisar, bajo condiciones limitantes de hierro. Por otro lado, el análisis de la secuencia del genoma de *H. pylori* 26695 sugiere la presencia de al menos dos hemolisinas, HP1086 y HP1490, en esta cepa (Martino et al., 2001)

Un ejemplo de la importancia de hemólisis son las hemolisinas producidas por *Vibrio vulnificus*, las cuales pueden lisar eritrocitos y otras células eucariotas, liberando el grupo hemo de diferentes compuestos y así utilizarlo como fuente de hierro en el proceso infeccioso; esto se ha observado cuando causan sepsis e infecciones cutáneas (Marchetti et al., 1995).

El análisis del genoma de *H. pylori* también mostró que contiene un gen similar al que codifica para una proteína denominada TlyA, la cual es una hemolisina expresada en *Mycobacterium tuberculosis* y *Serpulina hyodysenteriae* (Wren et al., 1998). La presencia del gen TlyA-like de *H. pylori* se ha asociado con virulencia en esta bacteria (Lata et al., 2014). TlyA-like purificada ha mostrado tener una actividad hemolítica contra eritrocitos humanos, lo más probable es que se mediante la formación de poros sobre la membrana celular (Lata et al., 2014). Estos datos apoyan nuestras observaciones de que la actividad hemolítica que reportamos en este trabajo es baja, lo cual se asocia con una hemolisina que produce poros más que con una hemolisina que destruye la membrana.

Kusum también reportó que la proteína TlyA-like recombinante inducía una respuesta citotóxica sobre células humanas de adenocarcinoma gástrico. Por lo que se tienen que establecer si *H. pylori* en efecto produce esta hemolisina *in vivo* y establecer cuál es su papel en la patogénesis de este microorganismo.

CONCLUSIÓN

Demostramos que *Helicobacter pylori* es capaz de unirse a los eritrocitos humanos que expresan los antígeno Le^{a+}, Le^{b+} y Le^{a-b-} del sistema Lewis (todos del grupo O sanguíneo) y que *H. pylori* es capaz de inducir hemaglutinación.

La capacidad de hemaglutinación de *H. pylori* no depende únicamente del gen de la adhesina *babA2*, ni correlaciona con la ausencia o presencia de los genes *cagA* y *vacA*.

Describimos por primera vez que la interacción entre *H. pylori* con los eritrocitos humanos induce la salida de hemoglobina.

PERSPECTIVAS DEL PROYECTO


Identificar por PCR la presencia de otras adhesinas y ver si su presencia correlaciona con la actividad hemaglutinante de *H. pylori*.


Buscar también por PCR la presencia del gen TlyA-like y correlacionarlo con la actividad de hemólisis observada en este estudio.


Analizar las secuencias de los genomas de las cepas de *H. pylori* aisladas y buscar los genes que codifiquen para otras posibles adhesinas y hemolisinas.

APÉNDICE 1. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Cepas aisladas de pacientes con gastritis

	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2003-93	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												

	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2003-108	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												

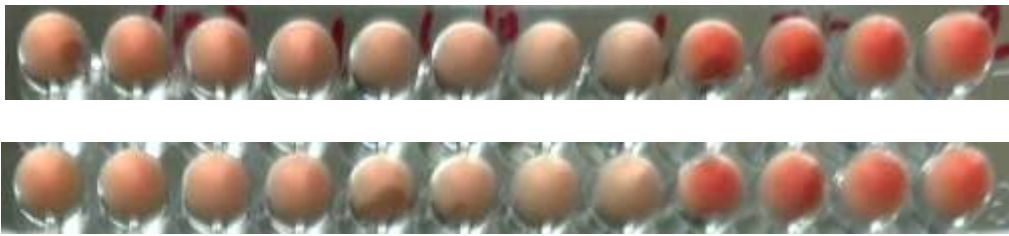
	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2005-108	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												

	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2005-337	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4


	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2005-83	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2011-147	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4


	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2006-73	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4



	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2005-100	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1
	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1




	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2003-115	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4





	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2003-8	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2003-150	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2005-75	2	2	2	2	4	4	4	4	1	1	1	1
	2	2	2	2	4	4	4	4	1	1	1	1


	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2011-131	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												

	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2005-190	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												


	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2011-41	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												

Cepas aisladas de pacientes con metaplasia intestinal


	Le ^{a+}				Le ^{b+}				Le ^{a-b-}			
2003-230	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4



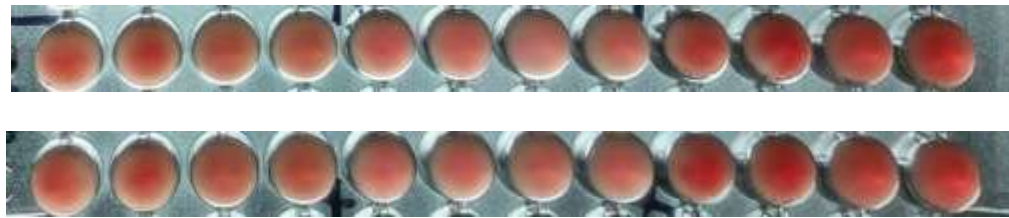
	Le ^{a+}				Le ^{b+}				Le ^{a-b-}			
2005-226	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4




	Le ^{a+}				Le ^{b+}				Le ^{a-b-}			
2005-106	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4




	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2006-106	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

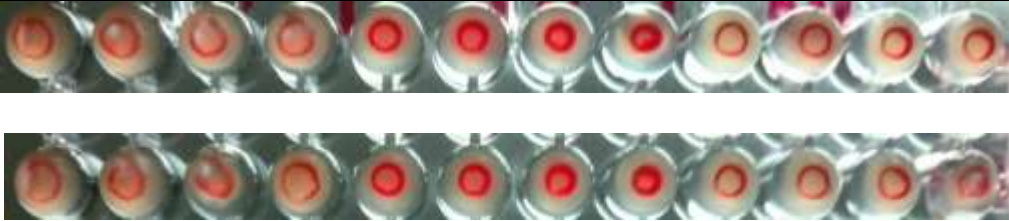



	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2003-142	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

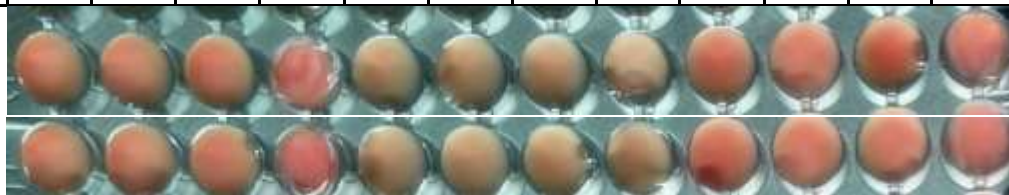


	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2005-119	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4



	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2005-152	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2
												

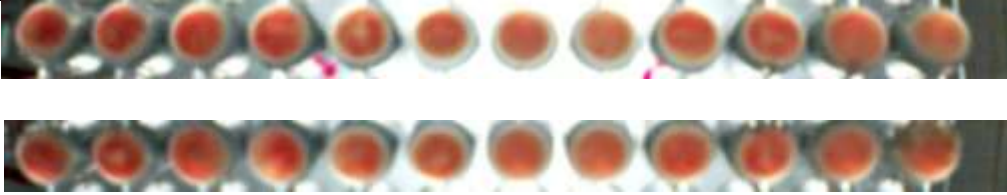
	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2006-276	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1
	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1
												

	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2006-409	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												

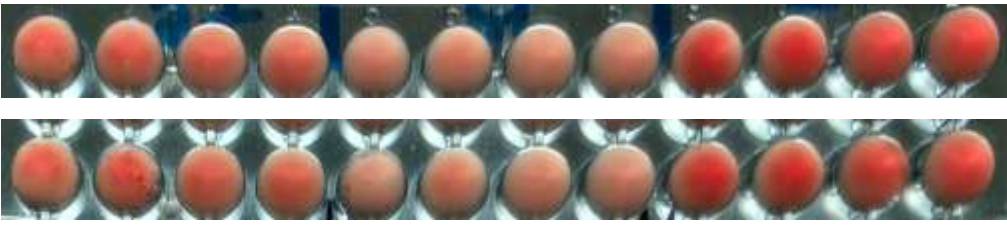
	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2006-427	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4


	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2006-416	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4


	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2006-309	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4


	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2006-690	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
												

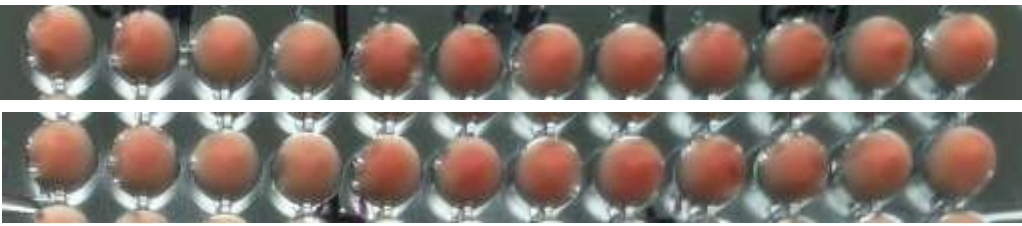
Cepas aisladas de pacientes con cáncer gástrico

	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2011-145	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												


	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2011-69	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												

		Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2006-52	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
													


		Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2004-202	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
													

		Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2003-336	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
													

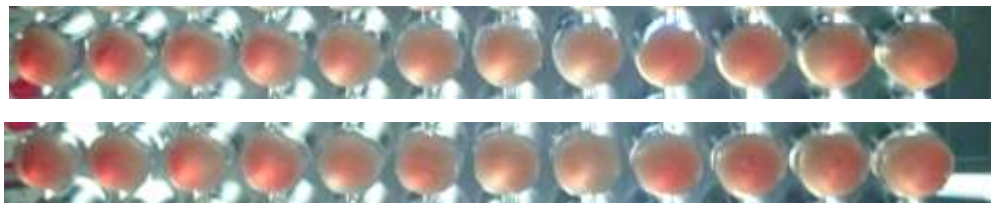
	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2010-5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4




	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2010-8	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4




	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2010-12	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4




	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2010-3	3	3	3	3	4	4	4	4	3	3	4	4
	3	3	3	3	4	4	4	4	3	3	4	4




	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2010-2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4



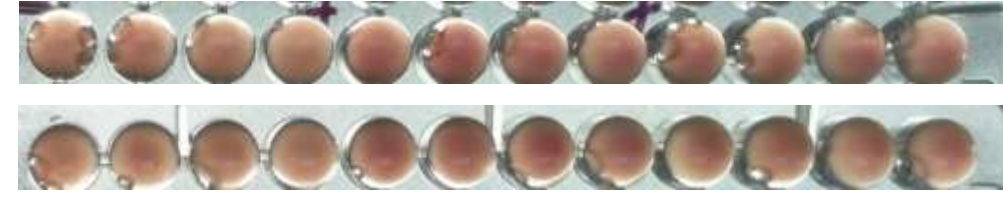
	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2010-10	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4




	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2010-11	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4




	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2011-51	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4



	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2011-117	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3



	Le^{a+}				Le^{b+}				Le^{a-b-}			
2011-152	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
												

REFERENCIAS

- Amieva, M. R., El-Omar, E. M., Hunt, R. H., IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 61. Schistosomes, liver flukes and, *H. pylori*
- Blaser, M. J., Terio, K. A., ... al., et. (2008). Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, *134*(1), 306–23.
<http://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.009>
- Anstee, D. J. (2010). The relationship between blood groups and disease. *Blood*, *115*(23), 4635–43. <http://doi.org/10.1182/blood-2010-01-261859>
- Aspholm, M., Olfat, F. O., Nordén, J., Sondén, B., Lundberg, C., Sjöström, R., ... Borén, T. (2006). SabA Is the *H. pylori* Hemagglutinin and Is Polymorphic in Binding to Sialylated Glycans. *PLoS Pathogens*, *2*(10), e110.
<http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020110>
- Aspholm-Hurtig, M., Dailide, G., Lahmann, M., Kalia, A., Ilver, D., Roche, N., ... Borén, T. (2004). Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science (New York, N.Y.)*, *305*(5683), 519–22.
<http://doi.org/10.1126/science.1098801>
- Barros, R., Camilo, V., Pereira, B., Freund, J.-N., David, L., & Almeida, R. (2010). Pathophysiology of intestinal metaplasia of the stomach: emphasis on CDX2 regulation. *Biochemical Society Transactions*, *38*(2), 358–63.
<http://doi.org/10.1042/BST0380358>
- Borén, T., Falk, P., Roth, K. A., Larson, G., & Normark, S. (1993). Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science (New York, N.Y.)*, *262*(5141), 1892–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8018146>
- Braun, V., & Focareta, T. (1991). Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolysins). *Critical Reviews in Microbiology*, *18*(2), 115–58.
<http://doi.org/10.3109/10408419109113511>
- Busuttill, R. A., & Boussioutas, A. (2009). Intestinal metaplasia: a premalignant lesion

- involved in gastric carcinogenesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(2), 193–201. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05774.x>
- Clarke, C. A., Edwards, J. W., Haddock, D. R., Howel-Evans, A. W., Mcconnell, R. B., & Sheppard, P. M. (1956). ABO blood groups and secretor character in duodenal ulcer; population and sibship studies. *British Medical Journal*, 2(4995), 725–31. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2035396&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Correa, P., Piazuolo, M. B., & Wilson, K. T. (2010). Pathology of gastric intestinal metaplasia: clinical implications. *The American Journal of Gastroenterology*, 105(3), 493–8. <http://doi.org/10.1038/ajg.2009.728>
- Dent, J. C., & McNulty, C. A. (1988). Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 7(4), 555–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3141172>
- Dicken, B. J., Bigam, D. L., Cass, C., Mackey, J. R., Joy, A. A., & Hamilton, S. M. (2005). Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Annals of Surgery*, 241(1), 27–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15621988>
- Enroth, H., Wreiber, K., Rigo, R., Risberg, D., Uribe, A., & Engstrand, L. (1999). In vitro aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, intracellular composition and surface properties. *Helicobacter*, 4(1), 7–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10352082>
- Ernst, P. B., & Gold, B. D. (2000). The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annual Review of Microbiology*, 54, 615–40. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.615>
- Evans, D. J., & Evans, D. G. (2000). *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. *Helicobacter*, 5(4), 183–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11179982>

- Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Borén, T., Rad, R., Schepp, W., ... Prinz, C. (1999). Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(22), 12778–83. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=23096&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Graham, D. Y., Alpert, L. C., Smith, J. L., & Yoshimura, H. H. (1988). Iatrogenic *Campylobacter pylori* infection is a cause of epidemic achlorhydria. *The American Journal of Gastroenterology*, *83*(9), 974–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3414650>
- Graham, D. Y., Opekun, A. R., Osato, M. S., El-Zimaity, H. M. T., Lee, C. K., Yamaoka, Y., ... Monath, T. P. (2004). Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut*, *53*(9), 1235–43. <http://doi.org/10.1136/gut.2003.037499>
- Granström, M., Tindberg, Y., & Blennow, M. (1997). Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(2), 468–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9003617>
- Han, S. W., Flamm, R., Hachem, C. Y., Kim, H. Y., Clarridge, J. E., Evans, D. G., ... Graham, D. Y. (1995). Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *14*(4), 349–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7649201>
- Hatakeyama, M. (2009). *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Journal of Gastroenterology*, *44*(4), 239–48. <http://doi.org/10.1007/s00535-009-0014-1>
- Jones, K. R., Whitmire, J. M., & Merrell, D. S. (2010). A Tale of Two Toxins: *Helicobacter Pylori* CagA and VacA Modulate Host Pathways that Impact Disease. *Frontiers in Microbiology*, *1*, 115. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00115>
- Konturek, P. C., Konturek, S. J., & Brzozowski, T. (2009). *Helicobacter pylori* infection in

- gastric cancerogenesis. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 60(3), 3–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19826177>
- Kuipers, E. J. (1999). Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 13 Suppl 1, 3–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10209681>
- Kuipers, E. J., Thijs, J. C., & Festen, H. P. (1995). The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 9 Suppl 2, 59–69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8547530>
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H. M., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449–90. <http://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>
- Lata, K., Paul, K., & Chattopadhyay, K. (2014). Functional characterization of *Helicobacter pylori* TlyA: pore-forming hemolytic activity and cytotoxic property of the protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 444(2), 153–7. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.011>
- Malaty, H. M., Engstrand, L., Pedersen, N. L., & Graham, D. Y. (1994). *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Annals of Internal Medicine*, 120(12), 982–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8185146>
- Malaty, H. M., Graham, D. Y., Wattigney, W. A., Srinivasan, S. R., Osato, M., & Berenson, G. S. (1999). Natural history of *Helicobacter pylori* infection in childhood: 12-year follow-up cohort study in a biracial community. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 28(2), 279–82. <http://doi.org/10.1086/515105>
- Marchetti, M., Aricò, B., Burrone, D., Figura, N., Rappuoli, R., & Ghiara, P. (1995). Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5204), 1655–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7886456>

- Marshall, B. J., Armstrong, J. A., McGeachie, D. B., & Glancy, R. J. (1985). Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *The Medical Journal of Australia*, *142*(8), 436–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3982345>
- Marshall, B., & Warren, R. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The Lancet*, *321*(8336), 1273–1275. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)92719-8](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)92719-8)
- Martino, M. C., Stabler, R. A., Zhang, Z. W., Farthing, M. J., Wren, B. W., & Dorrell, N. (2001). *Helicobacter pylori* pore-forming cytolysin orthologue TlyA possesses in vitro hemolytic activity and has a role in colonization of the gastric mucosa. *Infection and Immunity*, *69*(3), 1697–703. <http://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1697-1703.2001>
- Mbulaiteye, S. M., Hisada, M., & El-Omar, E. M. (2009). *Helicobacter Pylori* associated global gastric cancer burden. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *14*, 1490–504. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2654592&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Mobley, H. L., Mendz, G. L., & Hazell, S. L. (2001). *Helicobacter pylori*. ASM Press. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2408/>
- Molinari, M., Galli, C., Norais, N., Telford, J. L., Rappuoli, R., Luzio, J. P., & Montecucco, C. (1997). Vacuoles induced by *Helicobacter pylori* toxin contain both late endosomal and lysosomal markers. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(40), 25339–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9312153>
- Morris, A., & Nicholson, G. (1987). Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *The American Journal of Gastroenterology*, *82*(3), 192–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3826027>
- Nilius, M., Wex, T., Müller-Dietz, G., Leodolter, A., Schilling, D., & Malfertheiner, P. (2001). Comparative evaluation of two hemagglutination tests for the detection of anti-*Helicobacter pylori* antibodies. *Diagnostic Microbiology and Infectious*

- Disease*, 41(4), 221–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11777664>
- O'Toole, P. W., Lane, M. C., & Porwollik, S. (2000). *Helicobacter pylori* motility. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 2(10), 1207–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11008110>
- OMS. (2010). *Helicobacter pylori en los países en desarrollo. Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología*. Retrieved from http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/helicobacter_pylori_en_los_paises_desarrollo.pdf
- Palframan, S. L., Kwok, T., & Gabriel, K. (2012). Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 92. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00092>
- Peek, R. M., & Blaser, M. J. (2002). *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nature Reviews. Cancer*, 2(1), 28–37. <http://doi.org/10.1038/nrc703>
- Price, A. B. (1991). The Sydney System: histological division. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 6(3), 209–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1912431>
- Provence, D. L., & Curtiss, R. (1992). Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production. *Infection and Immunity*, 60(11), 4460–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1398960>
- Rad, R., Gerhard, M., Lang, R., Schöniger, M., Rösch, T., Schepp, W., ... Prinz, C. (2002). The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(6), 3033–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884476>
- Reynolds, D. J., & Penn, C. W. (1994). Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. *Microbiology*

(Reading, England), 140 (Pt 1, 2649–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8000535>

Rupp, M. E., Ulphani, J. S., Fey, P. D., Bartscht, K., & Mack, D. (1999). Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infection and Immunity*, 67(5), 2627–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10225932>

Scott, D. R., Marcus, E. A., Weeks, D. L., & Sachs, G. (2002). Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 123(1), 187–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12105847>

Shepherd, N. A., Warren, B. F., Williams, G. T. (Geraint T., Greenson, J. K., Lauwers, G. Y., Novelli, M. R., & Morson, B. C. (Basil C. (2013). *Morson and Dawson's gastrointestinal pathology*.

Skirrow, M. B. (1977). Campylobacter enteritis: a “new” disease. *British Medical Journal*, 2(6078), 9–11. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1631297&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>

Sobala, G. M., Crabtree, J. E., Dixon, M. F., Schorah, C. J., Taylor, J. D., Rathbone, B. J., ... Axon, A. T. (1991). Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut*, 32(11), 1415–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1752479>

Stingl, K., Altendorf, K., & Bakker, E. P. (2002). Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends in Microbiology*, 10(2), 70–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11827807>

Strickland, R. G., & Mackay, I. R. (1973). A reappraisal of the nature and significance of chronic atrophic gastritis. *The American Journal of Digestive Diseases*, 18(5), 426–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4573514>

Szabo, I. (1999). Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by

- the toxin *VacA* of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *The EMBO Journal*, 18(20), 5517–5527. <http://doi.org/10.1093/emboj/18.20.5517>
- Tegtmeyer, N., Wessler, S., & Backert, S. (2011). Role of the *cag*-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *The FEBS Journal*, 278(8), 1190–202. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08035.x>
- Tkachenko, M. A., Zhannat, N. Z., Erman, L. V, Blashenkova, E. L., Isachenko, S. V, Isachenko, O. B., ... Malaty, H. M. (2007). Dramatic changes in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection during childhood: a 10-year follow-up study in Russia. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 45(4), 428–32. <http://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318064589f>
- Torres, J., Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G., Gomez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., ... Muñoz, O. (1998). A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *The Journal of Infectious Diseases*, 178(4), 1089–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9806039>
- Torres-Morquecho, A., Giono-Cerezo, S., Camorlinga-Ponce, M., Vargas-Mendoza, C. F., & Torres, J. (2010). Evolution of bacterial genes: Evidences of positive Darwinian selection and fixation of base substitutions in virulence genes of *Helicobacter pylori*. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(6), 764–776. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.04.005>
- Unemo, M., Aspholm-Hurtig, M., Ilver, D., Bergström, J., Borén, T., Danielsson, D., & Teneberg, S. (2005). The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(15), 15390–7. <http://doi.org/10.1074/jbc.M412725200>
- van Vliet, A. H. M., Bereswill, S., & Kusters, J. G. (2001). *Ion Metabolism and Transport. Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21290720>
- Veldhuyzen van Zanten, S. J. O., Dixon, M. F., & Lee, A. (1999). The gastric transitional zones: Neglected links between gastroduodenal pathology and *Helicobacter* ecology. *Gastroenterology*, 116(5), 1217–1229. <http://doi.org/10.1016/S0016->

5085(99)70025-9

Weiner, J. H., & Heppel, L. A. (1971). A Binding Protein for Glutamine and Its Relation to Active Transport in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, *246*(22), 6933–6941.

Retrieved from <http://www.jbc.org/content/246/22/6933>

Whitehead, R., Truelove, S. C., & Gear, M. W. (1972). The histological diagnosis of chronic gastritis in fiberoptic gastroscopie biopsy specimens. *Journal of Clinical Pathology*, *25*(1), 1–11. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5015372>

Wren, B. W., Stabler, R. A., Das, S. S., Butcher, P. D., Mangan, J. A., Clarke, J. D., ... Stoker, N. G. (1998). Characterization of a haemolysin from *Mycobacterium tuberculosis* with homology to a virulence factor of *Serpulina hydysenteriae*. *Microbiology (Reading, England)*, 1205–11. <http://doi.org/10.1099/00221287-144-5-1205>

Wyatt, J. I., & Dixon, M. F. (1988). Chronic gastritis—a pathogenetic approach. *The Journal of Pathology*, *154*(2), 113–124. <http://doi.org/10.1002/path.1711540203>