



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado.

**INMUNIDAD SISTÉMICA Y DE MUCOSA INDUCIDA CONTRA  
INFECCIONES POR *Helicobacter pylori* EN RATONES BALB/c.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias.**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación Biotecnología)

p r e s e n t a

**Eduardo Ruiz Bustos.**

**La Paz, B.C.S. Noviembre 2000.**

## ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 16 del Mes de Noviembre del 2000, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

**"Inmunidad sistémica y de mucosa inducida contra infecciones por *Helicobacter pylori* en ratones BALB/c."**

Presentada por el alumno:

**Eduardo Ruiz Bustos**

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

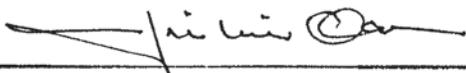
### LA COMISION REVISORA



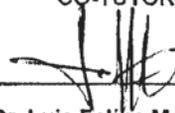
Dr. Felipe Ascencio Valle,  
DIRECTOR DE TESIS



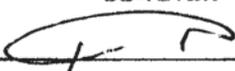
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,  
CO-TUTOR



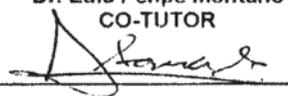
Dr. José Luis Ochoa Ochoa,  
CO-TUTOR



Dr. Luis Felipe Montaña  
CO-TUTOR



Dr. Yoav Bashan,  
CO-TUTOR



Dr. Adolfo García González  
CO-TUTOR



DR. SERGIO HERNANDEZ VAZQUEZ,  
DIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PREFACIO.

**El presente trabajo de tesis esta basado en los siguientes artículos y manuscritos, que habrán de ser referidos por sus números romanos (I-III).**

**I.** Ruiz-Bustos E., Ochoa J.L., Wadström T., y Ascencio F. (2000) Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate proteoglycan. Journal of Medical Microbiology (en prensa).

**II.** Ruiz-Bustos E., Sierra-Beltran A.P., Romero M.J. y Ascencio F. (2000). *H. pylori*-heparan sulfate-binding proteins induces mucosal and systemic immune response in a mouse model. FEMS Immunology and Medical Microbiology (sometido).

**III.** Ruiz-Bustos E., Sierra A., Romero M. J., Rodriguez-Jaramillo C., y Ascencio F. (2000). Protection of BALB/c mice against experimental *Helicobacter pylori* infection by oral immunisation with *H. pylori* heparan sulphate-binding proteins coupled to cholera toxin  $\beta$ -subunit. Journal of Medical Microbiology, 49: 535-541.

Tesis de Doctorado en Ciencias en  
Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales.  
Eduardo Ruiz-Bustos.

CONFORMACION DE COMITES.

**La presente tesis fue dirigida por:**

- Dr. Felipe Ascencio. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

**El comité tutorial y el comité revisor de tesis, fue integrado por:**

- Dr. Felipe Ascencio. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Dr. José Luis Ochoa. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Dr. Luis Felipe Montaña. Instituto Nacional de Cardiología, México D.F.
- Dra. Norma Y. Hernández. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Dr. Yoav Bashan. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Dr. Adolfo García. Instituto Mexicano del Seguro Social.

**El comité sinodal fue integrado por:**

- Dra. Norma Y. Hernández. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Dr. José Luis Ochoa. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Dr. Luis Felipe Montaña. Instituto Nacional de Cardiología, México D.F.
- Dra. Thelma Castellanos. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Dr. Adolfo García. Instituto Mexicano del Seguro Social.

**Dr. Sergio Hernández Vázquez.**  
**Director del Programa de Estudios de Posgrado.**

## AGRADECIMIENTOS.

El presente trabajo fue llevado a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), dentro del departamento de Patología Marina. El autor recibió beca doctoral del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. 89291, así como una extensión de beca doctoral por parte de la Dirección de Posgrado del CIBNOR.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a los miembros de mi comité tutorial: Dr. Felipe Ascencio Valle (CIBNOR), Dr. Jose Luis Ochoa (CIBNOR), Dr. Felipe Montaña (Instituto Nacional de Cardiología), Dra. Norma Y. Hernández (CIBNOR), Dr. Yoav Bashan (CIBNOR), y Dr. Adolfo García (IMSS-CIBNOR), por todo su apoyo, paciencia y amistad.

De igual forma, agradecer al Dr. Sergio Hernández, director del programa de Posgrado del CIBNOR y a su equipo de trabajo, por todo el apoyo que me brindó durante estos años de mis estudios de doctorado.

Al Dr. Torkel Wadström y Dr. Ron J. Doyle, por sus interesantes comentarios sobre la tesis, y su amistad.

A la Dra. Thelma Castellanos, por todo su apoyo y palabras de aliento durante mi estancia aquí en el CIBNOR.

A Tony Guzman, Ma. Jesus Romero, Arturo Sierra, Ariel Cruz, por su asistencia técnica, apoyo y amistad.

Asi tambien a todo el grupo de trabajo de Patología Marina, por sus contribuciones útiles en el desarrollo de el presente trabajo.

A Carmen Rodríguez y Esteban Cruz, por los análisis histológicos.

A Adriana Greene y Teresa Medina, por su apoyo en el bioterio.

Al Dr. Ellis Glazier por sus comentarios y ediciones en los documentos en inglés.

A Aldo Vargas, Sergio Rosas y Gerardo Hernández, por su apoyo en todo el material fotográfico.

Asi mismo quisiera agradecer a mi familia por todo su apoyo no solo en estos años de estudio, sino en toda la vida, en especial a mi madre, que gracias a sus palabras de aliento, enseñanzas y amor, lograron darme la fuerza para alcanzar mis metas.

A Claudia, Alejandra y Fernanda, quienes sin su apoyo y amor no hubiese logrado terminar esta etapa de mi desarrollo tanto profesional, como personal.

LISTA DE ABREVIATURAS.

<b>APC</b>	- Células productoras de anticuerpos.
<b>BBCD</b>	- Medio de Brucella con ciclodextrinas.
<b>BBFCS</b>	- Medio de Brucella con suero fetal de ternera.
<b>CTB</b>	- Subunidad $\beta$ de la toxina del cólera.
<b>ELISA</b>	- Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas.
<b>ELISPOT</b>	- Análisis inmunoprecipitante ligado a enzimas.
<b>GAG</b>	- Glicosaminoglicano.
<b>GALT</b>	- Tejido linfoide asociado al intestino.
<b>HRP</b>	- Peroxidasa.
<b>HS</b>	- Sulfato de heparina.
<b>HSBP</b>	- Proteína enlazante del sulfato de heparina.
<b>Ig</b>	- Inmunoglobulina.
<b>kDa</b>	- Kilodalton.
<b>MGL</b>	- Capa mucoide.
<b>MW</b>	- Peso molecular.
<b>OMP</b>	- Proteína de membrana externa.
<b>PBS</b>	- Buffer de fosfatos salino.
<b>pI</b>	- Punto isoelectrico.
<b>pIgR</b>	- Receptor polimérico de inmunoglobulinas.
<b>PMN</b>	- Células polimorfonucleares.
<b>SDS-PAGE</b>	- Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante.

**Inmunidad sistémica y de mucosa inducida contra infecciones por  
*Helicobacter pylori* en ratones BALB/c**

**Por**

***Eduardo Ruiz-Bustos***

INDICE GENERAL.

	<b>Página.</b>
<b>PREFACIO</b>	i
<b>CONFORMACION DE COMITES</b>	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	iv
<b>LISTA DE TABLAS</b>	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vii
<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCION</b>	2
<b>1. El estómago y las úlceras duodenales</b>	2
<b>2. La Historia de <i>Helicobacter pylori</i></b>	4
<b>3. Factores de virulencia</b>	8
<b>3.1. Movilidad</b>	8
<b>3.2. Ureasa</b>	8
<b>3.3. Citotoxinas</b>	9
<b>3.4. Adhesinas</b>	9
<b>3.5. Proteasas, glicosidasas</b>	10
<b>4. Inmunidad de mucosas</b>	11
<b>5. La infección y la respuesta inmune</b>	13
<b>6. Adhesión y colonización de <i>Helicobacter pylori</i></b>	14
<b>7. Diagnóstico</b>	15
<b>8. Tratamiento</b>	17
<b>8.1. Medicamentos</b>	17
<b>8.2. Inmunizaciones</b>	18
<b>9. Desarrollo de vacunas</b>	20
<b>10. Investigación futura</b>	22
<b>PLAN GENERAL DE TRABAJO</b>	24

<b>RESULTADOS</b>	25
Proteínas enlazantes del sulfato de heparina	25
Inmunoestimulación del sistema inmune local de ratones BALB/c	27
Inmunoprotección de ratones BALB/c contra <i>H. pylori</i>	29
<b>DISCUSION GENERAL</b>	31
<b>CONCLUSIONES</b>	34
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	35
<b>APENDICE</b>	
Apéndice I	42
Apéndice II	60
Apéndice III	79

INDICE DE TABLAS.

Tabla I.	Factores relacionados con úlceras gástricas y duodenales.	3
Tabla II.	Enfermedades relacionadas a <i>H. pylori</i> .	6
Tabla III.	Mecanismos de defensa de mucosa mediada por IgA.	12
Tabla IV.	Tratamientos basados en antibióticos contra enfermedades asociadas a <i>H. pylori</i> .	17
Tabla V.	Secuencia de aminoácidos de tres HSBPs.	27
Tabla VI.	Coefficientes de correlación y niveles de probabilidad de la respuesta inmune de ratones BALB/c oralmente inmunizados con HSBP-CTB.	29

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Micrografía de <i>Helicobacter pylori</i> mostrando 4 a 6 flagelos unipolares.	4
Figura 2.	Corte histológico de la mucosa gástrica de un paciente con úlcera duodenal (x1000). Se ven múltiples células curvadas de <i>H. pylori</i> (A) así como leucocitos polimorfonucleares (B).	14
Figura 3.	Sección (x1000) mostrando leucocitos polimorfonucleares (P) invadiendo el cuello de una glándula de moco. En la glándula, pueden apreciarse algunas células de <i>H. pylori</i> (flecha) y eosinófilos (E).	14
Figura 4.	Resumen de la respuesta inmune inducida por los distintos inmunógenos estudiados. Se observa que la CTB induce la mayor respuesta inmune (Gráfica completa, Fig. 1, manuscrito I).	28
Figura 5.	Modelo animal (ratones BALB/c) utilizados en los protocolos de inmunización.	30

## RESUMEN.

A finales del siglo XX, uno de los mayores avances en gastroenterología ha sido la asociación de una infección bacteriana con las úlceras gástricas. Distintos estudios han jugado un papel importante en relacionar la infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) con algunas enfermedades gástricas. Hoy en día, se conoce que al menos la mitad de la población mundial se encuentra infectada con esta bacteria, siendo considerada en la actualidad como la principal causa de gastritis. Datos epidemiológicos sugieren que *H. pylori* es adquirida en la infancia y apoyan en gran medida una asociación entre la infección por *H. pylori* y el cáncer gástrico.

Para causar la enfermedad en el hombre, *H. pylori* utiliza un proceso complejo por medio del cual el microorganismo tiene que resistir primero la barrera ácida del estómago para poder llegar y penetrar la capa mucoide, adherirse al epitelio gástrico (colonización) y multiplicarse en la mucosa gástrica (persistencia). En última instancia, *H. pylori* induce inflamación y destrucción del tejido gástrico. Distintos factores de virulencia están implicados en los diferentes pasos del proceso infeccioso que están siendo determinados y caracterizados.

La adhesión bacteriana a la membrana gástrica debe ser un proceso dinámico para persistir en un epitelio de constante recambio. La importancia de la adherencia en cualquier proceso infeccioso localizado es bien conocida, haciendo de este factor de virulencia un posible blanco importante para el tratamiento terapéutico. El presente trabajo de investigación fue enfocado al estudio de un conjunto de proteínas de *H. pylori* con afinidad a compuestos de membrana gástrica como una estrategia para el desarrollo de vacunas contra *H. pylori*:

**1. Caracterización parcial de las proteínas enlazantes del sulfato de heparina (HSBP) de *H. pylori*.** El proteoglicano sulfato de heparina (HS) es el más común en las superficies celulares y en la matriz extracelular. Estudios recientes han insistido en la importancia de HS dentro del control de la adhesión celular a varias proteínas de la matriz extracelular (ECM). La presencia de HSBP en la superficie celular bacteriana se considera parte de la maquinaria de adhesión de *H. pylori*. Estas proteínas fueron aisladas y parcialmente caracterizadas del sobrenadante de cultivos líquidos, de la superficie celular y de proteínas de la membrana externa (Artículo I).

**2. Evaluación de la actividad inmunoestimulante de las HSBP.** La protección efectiva contra una infección por patógenos de mucosas requiere de respuestas inmunes, tanto locales como sistémicas, que pueden ser logradas mediante vacunas utilizando adyuvantes y acarreadores. Distintos modelos animales han sido propuestos para estudiar la patogénesis de la bacteria y diferentes tratamientos contra el patógeno. Ratones BALB/c fueron utilizados en nuestro estudio para determinar la respuesta inmunológica inducida por las HSBPs, junto a varios adyuvantes de mucosa (CTB, hLT) y acarreadores (Manuscrito II).

**3. Papel inmunoprotector de las HSBPs contra infecciones inducidas por *H. pylori* en ratones BALB/c.** Dado que se ha observado una respuesta inmune natural en pacientes infectados con *H. pylori* y que ésta no es eficaz en la eliminación de la bacteria, el conjugado HSBP-CTB fue evaluado como inmunoprotector contra la colonización del tracto gastrointestinal de ratones BALB/c mediante la infección experimental con una cepa de *H. pylori* adaptada al ratón (Artículo III).

## INTRODUCCION.

## 1. El estómago y las úlceras duodenales.

La úlcera péptica y sus manifestaciones son causa frecuente de consulta médica estimándose que, al menos el 50% de la población adulta en países industrializados, y más del 90% de habitantes en países en desarrollo, la padece alguna vez en su vida (Blaser, 1990; Blaser, 1992; Hone y Hackett, 1989; Peterson, 1991; Monath et al., 1998). Aunque esta inflamación crónica de estómago y/o duodeno no es una causa importante de mortalidad, sí ocasiona altos costos económicos en su atención (NIH, 1994). La úlcera duodenal es una enfermedad crónica recurrente con complicaciones que incluyen hemorragia, perforación y/o obstrucción en el tracto gastrointestinal; aún sin estas complicaciones, ocasiona importantes trastornos no solo fisiológicos sino emocionales en los pacientes que la padecen (Feldman, 1991).

A principios del siglo XX, la patogénesis de esta enfermedad era asociada a las condiciones de estrés y hábitos alimenticios de los pacientes (Tabla I). De tal forma, los tratamientos se veían enfocados a la hospitalización y descanso, así como a la prescripción de alimentos blandos especiales. Posteriormente, el siguiente factor implicado fue la secreción gástrica ácida, por lo que el tratamiento con antiácidos se generalizó con la persistencia, sin embargo, de la sintomatología (Blaser, 1990; 1992). Al identificarse que los receptores para histamina eran los principales mediadores de la secreción de ácido, el tratamiento se dirigió a bloquear estos receptores; las conclusiones sobre estos inhibidores demostraron que eran “seguros y efectivos”. El uso de cimetidina constituye una de las historias más famosas en cuanto al éxito económico de un fármaco, aunque no se logró erradicar la úlcera péptica que, como se ha anotado antes, persistió con su característica de recurrente (NIH, 1994). Después de estos inhibidores se han desarrollado una gran cantidad de fármacos con la intención de curar las úlceras pépticas y, sobre todo, evitar la recurrencia (Feldman, 1991; Lee, 1994).

En 1982, Robin Warren y Barry J. Marshall proporcionaron la primera evidencia de un nuevo factor patogénico importante en esta enfermedad (Blaser, 1990; Blaser, 1992). Ellos aislaron un organismo espiral productor de ureasa ubicado en la interfase entre las células de la superficie epitelial gástrica y en el recubrimiento mucoide (Mai et al., 1992; Saitoh et al., 1992). En los estudios iniciales, la presencia de este organismo correlacionó con la incidencia de gastritis antral y con úlceras gástricas y duodenales, en tanto que la erradicación de este patógeno eliminaba en forma efectiva la recurrencia de la enfermedad.

Estilo de vida	Entre tanto la evidencia científica combate la antigua creencia que el estrés y la dieta causan úlceras, diversos factores cotidianos continúan como sospechosos de jugar un papel en la incidencia de las úlceras gástricas y duodenales. Estos incluyen el fumar, alimentos y bebidas que contienen cafeína, alcohol, y el estrés emocional.
Fumar	Diversos estudios han demostrado que el fumar cigarrillos incrementa la posibilidad de desarrollar una úlcera. Este hábito disminuye la restauración de úlceras existentes y también contribuye su reincidencia.
Cafeína	El café, te, refrescos de cola y alimentos que contienen cafeína parecen estimular la secreción de ácido en el estómago, agravando el dolor de una úlcera existente. Sin embargo, la cantidad de la secreción de ácido después de tomar café descafeinado es la misma producida al tomar café regular. Así, la estimulación del ácido gástrico no puede atribuirse solamente a la cafeína.
Alcohol	Las investigaciones no han encontrado una asociación entre el consumo de alcohol y las úlceras pépticas. Sin embargo, las úlceras son mas comunes en personas que padecen cirrosis del hígado, una enfermedad generalmente asociada al consumo de alcohol.
Estrés	Pese a que el estrés emocional no es considerado ser causa de úlceras, personas con ellas frecuentemente reportan que el estrés incrementa el dolor. El estrés físico, sin embargo, incrementa el riesgo de desarrollar úlceras, particularmente en el estómago. Por ejemplo, personas con daños como quemaduras severas y personas sometidas a cirugías mayores, frecuentemente requieren tratamientos rigurosos para prevenir úlceras y complicaciones por esta misma causa.
Acido y pepsina	Los investigadores consideran que la inhabilidad del estómago de defenderse contra estos fuertes fluidos digestivos contribuye en la formación de úlceras. El estómago se defiende de estas secreciones de diversas maneras: Una es mediante la producción de moco, un recubrimiento lubricante que cubre el tejido. Otra, mediante la producción de iones bicarbonato; estos neutralizan y degradan los fluidos digestivos en sustancias menos dañinas al tejido gástrico. Finalmente, la circulación sanguínea del epitelio gástrico, la renovación celular y la reparación tisular, también ayudan a proteger el estómago.

Este microorganismo inicialmente recibió el nombre de *Campylobacter pylori*, sin embargo, en base a diferencias en ultraestructura, composición de ácidos grasos, quinonas respiratorias, modo de crecimiento, secuencia de ARN y enzimas que produce (ureasa, catalasa), se le ha asignado el nuevo nombre de *Helicobacter pylori* (Eaton y Krakowka, 1994; Ghiara et al., 1995).

Una relación epidemiológica preocupante entre la infección por *H. pylori* y malignidades gástricas ha sido reportado (Blaser et al., 1995; Weber et al., 1994). Tales estudios han apoyado la hipótesis de que *H. pylori* es el principal factor etiológico en la enfermedad úlcero-péptica y que el diagnóstico y erradicación del microorganismo son necesarios para el óptimo tratamiento.

Estudios epidemiológicos llevados a cabo en distintas localidades (urbanas y rurales) de nuestro país han revelado que, al menos un 66% de la población se encuentra infectada con la bacteria, siendo la edad el más grande factor de riesgo para adquirir la infección. En tal forma, se ha encontrado que para la edad de 1 año, el 20% se encuentra

infectado con la bacteria, llegando a ser de un 50% para la edad de 10 años (Torres et al., 1998). En este estudio no se observó diferencia en la prevalencia de *H. pylori* entre los habitantes de comunidades urbanas y rurales, jugando un papel igualmente importante el bajo grado de educación, nivel socioeconómico y viviendas numerosas en la prevalencia de la bacteria. Un segundo estudio llevado a cabo para determinar la relación entre la infección por *H. pylori* y el cáncer gástrico en la ciudad de México indica la presencia de la bacteria en 87.2% de los casos estudiados, calculando que con la erradicación de la infección en la población general la incidencia del cáncer gástrico podría reducirse hasta en un 26.6% (Lopez-Carrillo et al., 1997).

La sintomatología más común de la úlcera es un dolor ardiente en el abdomen. El dolor frecuentemente ocurre entre los alimentos y por las mañanas. Puede durar tan solo unos minutos, o incluso por varias horas y puede controlarse con la comida o la ingestión de antiácidos (Muñoz, 1995).

Los síntomas menos comunes incluyen náusea, vómito, pérdida de apetito y peso. El sangrado de las úlceras puede ocurrir en el estómago y/o en el duodeno. En ocasiones las personas no están conscientes de una úlcera sangrante debido a que la pérdida de sangre es lenta y ésta puede no ser obvia en el excremento. Estas personas pueden sentirse cansadas y débiles. Si el sangrado es profuso, la sangre aparecerá en el vómito o heces, impartiendo a estas últimas de un color oscuro (Muñoz, 1995).

## 2. La Historia de *Helicobacter pylori*.

La contribución de Barry J. Marshall y Robin Warren (1982) a la etiología de la úlcera gástrica fue el descubrimiento de un organismo espiral gram negativo en estrecha asociación con la presencia de gastritis antral, úlcera gástrica y duodenal (Marshall y Warren, 1984; Taylor y Blaser, 1991). Además, estos autores demostraron que al eliminarlo se disminuye la recurrencia de la sintomatología, lo que ha marcado el parteaguas en el tratamiento de la enfermedad considerándose actualmente a la úlcera péptica de etiología infecciosa (Marshall y Warren, 1984).



Fig. 1. Micrografía de *Helicobacter pylori* mostrando 4 a 6 flagelos unipolares.

Marshall y Warren llegaron a esta conclusión debido al hallazgo de que todos los pacientes con úlceras duodenales y el 80% de pacientes con úlceras gástricas tenían a la bacteria (Lee y Hazell, 1988; Taylor y Blaser, 1991). El 20% de las úlceras gástricas sin la presencia de *H. pylori* fueron de aquellos pacientes que habían sido sometidos a tratamientos con drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAIDs), tales como aspirina e ibuprofeno, que son causas comunes de úlceras gástricas. Pese a que sus evidencias parecían concluyentes, la teoría de Marshall y Warren fue fuertemente debatida y permaneció en disputa por mucho tiempo. El debate continuó incluso después de que Marshall y un colega llevaron a cabo un experimento en el cual se infectaron experimentalmente ellos mismos con *H. pylori* y desarrollaron gastritis (Lee 1994).

La evidencia asociando a *H. pylori* con el desarrollo de úlceras se acumuló en los siguientes 10 años con numerosos estudios que confirmaron su presencia en muchas personas con úlceras. Aún mas, investigadores de los Estados Unidos y Europa dieron a conocer que mediante el uso de antibióticos para eliminar a *H. pylori*, las úlceras eran curadas y se prevenía la recurrencia en un 90% de los pacientes (Taylor y Blaser, 1991).

Para investigar más a fondo estos hallazgos, los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos establecieron un departamento para estudiar de cerca la asociación entre *H. pylori* y la enfermedad úlcero-péptica. Durante la Conferencia en Febrero de 1994, dicho departamento concluyó que *H. pylori* juega un papel significativo en el desarrollo de úlceras y que los antibióticos junto con otros medicamentos pueden curar dicha enfermedad.

*Helicobacter pylori* sobrevive en el estómago debido a que produce en grandes cantidades ureasa (Collins, 1993; Eaton et al., 1981; Eaton y Krakowka, 1994; Ghiara et al., 1995; Labigne et al., 1991; Solnick et al., 1994), una enzima que neutraliza la acidéz estomacal permitiéndole resistir en un ámbito hostil. Debido a su forma, el modo en que se mueve y la presencia de lipasas, la bacteria puede penetrar la capa mucoide que cubre el epitelio gástrico. Una vez establecida, su metabolismo produce diversos compuestos que debilitan el moco protector haciendo a las células gástricas más susceptibles a los efectos nocivos del ácido y pepsina (Slomiany et al., 1987; Blaser, 1992). La bacteria tiene también la habilidad de adherirse al tejido gástrico en donde interfiere con los mecanismos de defensa del estómago, induciendo a la vez una inflamación local. Por razones no completamente comprendidas, *H. pylori* puede también sobreestimar la producción de ácido estomacal (Blaser 1990, 1992).

Un exceso de acidéz estomacal pueden causar irritación en el duodeno. En algunas personas, después de prolongados períodos de tiempo, esta inflamación resulta en la producción de células tipo gástricas, consecuencia denominada metaplasia gástroduodenal, iniciando los caminos oncogénicos hacia el cáncer gástrico. *H. pylori*

entonces ataca estas células induciendo mayor daño tisular e inflamación que resulta en el desarrollo de una úlcera (Blaser, 1990, 1992; Buck, 1990).

Después de una semana de infección con *H. pylori*, la mayor parte de las personas desarrollan gastritis, una inflamación del estómago (Tabla II). Sin embargo, hay aquellos que nunca desarrollan sintomatología o problemas relacionados con la infección. Los investigadores aún no tienen conocimiento de la diferencia entre los individuos que desarrollan o no los síntomas de la úlcera gástrica relacionados a la bacteria. Es probable que factores hereditarios o ambientales, aún no discernidos, sean la causa de esta diferencia. Alternativamente, los síntomas y las úlceras pueden resultar de la infección con cepas más virulentas. Estas preguntas sin respuesta son temas de intensa investigación (Blaser, 1990, 1992; Buck, 1990).

Tabla II. Enfermedades relacionadas a <i>H. pylori</i> (Marshall, 1995).	
Enfermedad ulcerosa duodenal	Las úlceras pépticas duodenales ocurren en la primera parte del intestino, una o dos pulgadas después del estómago. Se ha probado que eliminando a <i>Helicobacter pylori</i> muchos pacientes con úlceras duodenales pueden ser curados.
Úlceras gástricas	Estas úlceras tienen dos causas. La más común es la infección por <i>H. pylori</i> . Alrededor del 30% de las úlceras gástricas no son causadas por la bacteria sino por los efectos corrosivos de medicamentos como la aspirina.
Cáncer gástrico	Los cánceres del estómago (adenocarcinomas gástricos) son frecuentemente asociados con <i>H. pylori</i> (70-90%). En una revisión extensiva de los cánceres gástricos y <i>H. pylori</i> , el grupo de estudio Eurogast determinó un riesgo seis veces mayor de cáncer cuando la bacteria estaba presente, abarcando aproximadamente la mitad de todos los cánceres gástricos.
Dispepsia no ulcerosa	La asociación de <i>H. pylori</i> con la dispepsia crónica no ha sido corroborada. Sin embargo, en algunos pacientes una respuesta inmediata es observada cuando se emplean tratamientos anti- <i>H. pylori</i> .
Pacientes asintomáticos	Existen aquellos pacientes que están infectados con la bacteria, pero no desarrollan signos de infección. Las características de tales condiciones, está aún bajo estudio.
Síndromes poco usuales de <i>H. pylori</i>	Existen diversas condiciones que pudieran causar o ser agravadas por <i>H. pylori</i> : por ejemplo, el acné rosacea que es una urticaria epidérmica rojiza en el rostro que pudiera responder a los tratamientos para <i>H. pylori</i> . Los pacientes infectados presentan una incrementada permeabilidad de la mucosa gástrica, potencialmente expuesta a antígenos no procesados de los alimentos. Algunos padecimientos de la piel ocasionalmente desaparecen cuando se da tratamiento contra <i>H. pylori</i> .

Varios estudios han demostrado que la infección por *H. pylori* en los Estados Unidos varía con la edad, grupo étnico y clase socioeconómica. La bacteria es más común en adultos afro-americanos, hispanos y en grupos de bajo nivel socioeconómico (Taylor y Blaser, 1991). El microorganismo parece ser transmitido por la ruta fecal-oral (cuando las heces infectadas entran en contacto con manos, alimentos o agua). Muchos

individuos parecen ser infectados durante la niñez y su infección llega a durar de por vida (Buck, 1990).

*H. pylori* puede ser cultivada de las heces de algunas personas infectadas. Esto apoya la hipótesis de la transmisión fecal-oral al entrar en contacto con personas infectadas (Beckwith et al., 1997; Osaki et al., 1998). Además, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede detectar *H. pylori* en la placa dental en un 30% de las personas con infección gástrica. Esto, sin embargo, puede ser una fuente menos común de transmisión (Ferguson et al., 1993).

Se le considera a *H. pylori* como un patógeno debido a que su presencia es siempre asociada a la gastritis activa crónica y la erradicación de la bacteria es siempre precedida por el cese de la gastritis. Además, prácticamente todos los pacientes con la enfermedad ulcerosa duodenal tienen gastritis asociada a *H. pylori* y el reinicio de la úlcera es excepcional después de la erradicación. De tal suerte, la presencia de *H. pylori* parece ser necesaria para la producción de úlceras duodenales, con la excepción de úlceras causadas por drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAIDs), o por el síndrome Zollinger-Ellison (NIH consensus, 1994).

Por otra parte, la asociación de la infección con úlceras gástricas no es tan fuerte. Pese a que la infección por *H. pylori* está presente en el 80% de los pacientes con úlceras gástricas que no consumen NSAIDs, muchas personas infectadas no reportan ningún síntoma clínico. Esto puede ser debido a que son colonizados por cepas menos virulentas, o a otros cofactores del huésped y de la bacteria, que son requeridos para iniciar la enfermedad (Eaton et al., 1989). Adicionalmente, tres estudios prospectivos han demostrado que las personas infectadas por *H. pylori* presentan un incremento en el riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico no diferenciado. Sin embargo, la asociación de *H. pylori* con úlcera o cáncer gástrico puede haberse subestimado en estos estudios. Contrariamente, la gastritis atrófica que sigue a la infección prolongada provoca un nicho gástrico menos hospitalario para la bacteria, lo cual puede eliminar al *H. pylori* o hacerlo difícil de detectar. No obstante, la gastritis atrófica per se es considerada una lesión precancerosa que lleva a la carcinogénesis sin la presencia de *H. pylori* (Blaser et al., 1995).

*H. pylori* se multiplica con gran eficiencia en el ambiente hostil dentro del estómago pero sobrevive pobremente en el lumen gástrico. La bacteria, se encuentra principalmente donde el pH está entre 4 y 7, por ejemplo por debajo de la capa mucoide y en cercanía o incluso adherida a las células epiteliales gástricas (Chmiela et al., 1997; Clyne y Drumm, 1993; Kobayashi et al., 1993; Smoot et al., 1993).

### 3. Factores de virulencia.

#### 3.1. Movilidad.

Dos importantes factores de virulencia de *H. pylori* son su forma espiral y la movilidad proporcionada por la presencia de 4 a 6 flagelos unipolares (Hazell et al., 1986), que le hacen más resistente al lavado peristáltico del contenido gástrico, escapando a su vez de la acidez presente en el lumen gástrico y penetrando la capa mucoide para alcanzar, finalmente, la superficie del tejido gástrico (Eaton et al., 1989). En consecuencia la elevada movilidad, incluso en un ambiente viscoso, es una determinante virulenta para *H. pylori* (Mizote et al., 1997), observación que fue fortalecida por Eaton y asociados (1989), quienes reportaron que mutantes no móviles de la bacteria eran incapaces de colonizar la mucosa gástrica de cerdos pigmeos gnotobióticos.

#### 3.2. Ureasa.

*Helicobacter pylori* es una bacteria poco usual en lo que respecta a su habilidad de colonizar las células del huésped en un ambiente de elevada acidez. Dado que el portal de entrada al ambiente gástrico es mediante la ingestión oral, el organismo es constantemente sometido a pH extremos en el lado del lumen gástrico (pH ~ 2). La sobrevivencia de *H. pylori* en ambientes ácidos es probablemente debida a su habilidad de modificar su microambiente mediante la acción de la ureasa y la liberación de factores que inhiben la producción de ácido por células parietales (Tomb et al., 1997).

La producción de ureasa por *H. pylori* fue el primer factor de virulencia o colonización estudiado (Eaton et al., 1981; Evans et al., 1992). La producción de esta enzima, que es una característica compartida por todas las especies de *Helicobacter*, puede explicar su extraordinaria habilidad para sobrevivir en un ambiente previamente considerado estéril debido a la presencia de enzimas proteolíticas y el bajo pH de los contenidos gástricos. Además de que la neutralización del ácido beneficia a la bacteria, los iones hidróxido producidos son tóxicos a las células epiteliales gástricas in vivo, como ha sido indicado por experimentos in vitro (Eaton y Krakowka, 1994).

Nakamura (1998) demostró que la ureasa de *H. pylori* participa de forma importante en la movilidad quimiotáctica en un medio de alta viscosidad. La concentración de urea en el suero (5 mM) y los jugos gástricos (2 mM) de sujetos saludables no infectados se encuentran en el marco efectivo para atraer a *H. pylori* (Mizote et al., 1997). En dicho estudio, *H. pylori* mostró actividad quimiotáctica en respuesta a urea e iones bicarbonato, incluso en la ausencia de ureasa. Esto sugiere que la fuerza motora generada por los procesos metabólicos independientes de ureasa es

adecuada para desplazarse en un buffer, pero pudiera no ser suficiente para el movimiento en soluciones viscosas.

### 3.3. Citotoxinas.

El factor de virulencia de *H. pylori* que más ha atraído la atención durante los pasados años ha sido su citotoxina vacuolizante (producto del gene *vacA*) y una proteína asociada a la citotoxina (*cagA*). Recientemente, el genoma completo de *H. pylori* ha sido publicado (Tomb et al., 1997).

*VacA* es inicialmente traducida como una protoxina de 140 kDa, que subsecuentemente sufre procesamiento tanto N- como C-terminal para producir una toxina madura secretada de ~ 90 kDa (Forsyth et al., 1998), lo que induce la formación de vacuolas ácidas en las células epiteliales del huésped. Su presencia está asociada epidemiológicamente con el daño tisular y la enfermedad (de Bernard et al., 1997). La administración oral de *VacA* purificada a ratones produce daño de la mucosa gástrica (Phadnis et al., 1994; Strobel et al., 1998). Esta toxina exhibe la propiedad única de ser una proteína activada por, y resistente a, pH tan bajo como 1.5, una acidez que puede ser alcanzada en el lumen gástrico.

La administración intragástrica de la toxina a roedores causa algunos, pero no todos, de los daños epiteliales observados en las personas infectadas por *H. pylori*. Además, la producción de la citotoxina se encuentra altamente correlacionada con la producción de una proteína de alto peso molecular (120 a 128 kDa) denominada proteína asociada a citotoxina (*cagA*) que no es de por sí tóxica (Ghiara et al., 1995).

El gene *cagA*, pese a no ser una determinante de virulencia, se encuentra ubicado en un extremo de un islote de patogenicidad que contiene los genes que inducen la producción de interleucina 8 (IL-8) por las células epiteliales gástricas (Censini et al., 1996; Tummuru et al., 1995). El conjunto *cag* contiene los genes que codifican las proteínas que incrementan la virulencia de la cepa, por ejemplo, induciendo la producción de citocinas en el huésped (van Doorn et al., 1998).

### 3.4. Adhesinas.

La habilidad de muchas bacterias patogénicas de adherirse a las superficies epiteliales de sus huéspedes es considerada a ser un importante factor de virulencia.

Un número considerable de posibles adhesinas y receptores han sido reportados. Las hemaglutininas son uno de estos factores. El proceso de hemaglutinación ha sido correlacionado con la habilidad de la bacteria de unirse a los tejidos del huésped, debido a que los eritrocitos, así como las células epiteliales, comúnmente comparten estructuras glicoconjugadas similares (Chmiela et al., 1997; Lelwala-Guruge et al., 1992; O'Toole et

al., 1995). En algunos casos, la adhesión bacteriana predominante reconoce una estructura glicosilada presente en los eritrocitos y otros tejidos del huésped, como lo es para *E. coli* tipo P donde la colonización se encuentra generalmente restringida al tracto urogenital (Kukkonen et al., 1993; Westerlund et al., 1993).

Otras adhesinas en *H. pylori* han sido estudiadas, tal como las proteínas enlazantes de ácido siálico y N-acetilneuraminil-lactosa (Borén et al., 1993; Evans et al., 1989; Kobayashi et al., 1993; O'Toole et al., 1995). Chmiela (1997) ha reportado que la interacción entre el ácido siálico y las hemaglutininas bacterianas específicas a él, así como la interacción entre la heparina y las proteínas bacterianas enlazantes de heparina, son importantes para la fagocitosis no opsónica directa de *H. pylori* por macrófagos. La afinidad de *H. pylori* hacia los glicerolípidos gástricos ha sido previamente demostrada (Lingwood et al., 1989; Lingwood et al., 1993).

La interacción entre *H. pylori* y el sulfato de heparina ha sido previamente demostrada (Ascencio et al., 1993, 1995; Utt y Wadström, 1997). Debido a que la heparina, el sulfato de heparina y otros glicosaminoglicanos (GAGs), participan en la adhesión de algunos virus específicos y microorganismos patógenos a células eucariotas (Utt y Wadström, 1997), y de que dichos GAGs están presentes en las superficies celulares y en la matriz extracelular (Oksala et al., 1997), se considera que estas estructuras participan en la adhesión inicial de distintas bacterias a la mucosa gastrointestinal (Noel et al., 1994).

### 3.5. Proteasas, glicosidasas.

La integridad de la mucosa gástrica es importante para mantener el balance dinámico entre los factores agresivos y de defensa del estómago, de tal forma que la alteración de la función protectora del moco por su degradación excesiva da lugar a la etiología de la enfermedad úlcero-péptica (Slomiany et al., 1987). Varios estudios han identificado una proteasa secretada en lavados salinos de aislados clínicos de *H. pylori* cultivados exhibiendo una fuerte actividad proteolítica no solo hacia proteínas típicas tales como albúmina, sino también hacia glicoproteínas (mucinas) del moco gástrico (Baxter et al., 1989). Debido a que tales mucinas, proteolíticamente degradadas pierden su viscosidad normal y propiedades gelificantes, así como la habilidad de retardar la difusión del ión hidrógeno, la erosión de la capa mucoide por las enzimas proteolíticas de *H. pylori* conlleva a consecuencias dañinas para la integridad de la mucosa y comprometen el perímetro de defensa del tejido gástrico (Slomiany et al., 1987).

Diversos estudios sobre la inhibición de la actividad lítica de *H. pylori* por el subsalicilato de bismuto coloidal (pepto bismol) han sido también reportados. Sin embargo, algunos de ellos han sugerido que la cantidad de la enzima y los productos de la

digestión de la mucina no han sido detectados en pacientes sintomáticos en niveles que se esperarían indican patogenicidad (Smith et al., 1994).

#### 4. Inmunidad de mucosas.

La absorción de antígenos en el intestino es mediada principalmente por células M epiteliales especializadas, las cuales presentan los antígenos lumenales a tejidos linfoides organizados en las placas de Peyer para su procesamiento. Varias diferencias regionales ocurren a lo largo del intestino en el número de células M y la magnitud de la captura de antígenos por las placas de Peyer, así como en la población de células T y dendríticas. Las placas en la mucosa intestinal de murinos pueden jugar un papel en el procesamiento de antígenos pero probablemente son más importantes como tejidos linfoides donde los progenitores linfohematopoyéticos para células T y B son generados (Lamm M., 1997).

La superficie de la mucosa gastrointestinal representa la más grande barrera entre los sistemas internos de órganos y el ambiente. Como tal, frecuentemente se encuentra expuesta a una gran variedad de materia extraña, incluyendo microorganismos patógenos (Hone y Hackett, 1989). Las respuestas inmunes que ocurren en los tejidos linfoides asociados a la mucosa son cruciales en el mantenimiento de la integridad de tales superficies. El concepto de una red inmune de mucosas generalizada que enlaza los elementos linfoides de varios tejidos de mucosas con el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) ha sido propuesto. En este sistema los linfocitos B sensibilizados al antígeno, y especialmente de las placas de Peyer, entran a la circulación y preferentemente se ubican en la mucosa intestinal (Lamm M., 1997; Quiding et al., 1991). En seguida las células B pueden diferenciarse en células plasmáticas produciendo inmunoglobulinas secretorias (Quiding et al., 1991).

Una diferencia entre los compartimentos linfoides de las mucosas y los sistémicos es el tipo de inmunoglobulina que producen. Las células plasmáticas de la mucosa tienden a producir anticuerpos de la clase de inmunoglobulina A (IgA), mientras que los tejidos linfoides sistémicos impulsan la producción de inmunoglobulina G (IgG). Debido a la extensión del tejido linfoide asociado a la mucosa, la IgA es por mucho la clase de anticuerpo mayormente sintetizada por el cuerpo (Holmgren J., 1991); 50-100 mg/kg de peso corporal/día de IgA contra 30 mg/kg/día de IgG.

El segundo factor que cuenta por su predominancia en las secreciones de la mucosa es un mecanismo mediado por un receptor para transportar selectivamente a la IgA a través de las células epiteliales que se alinean en las membranas de la mucosa (Lamm M., 1997). Tal transporte es posible dado el enlace de la IgA dimérica al receptor de inmunoglobulinas polimérico (pIgR), que es una proteína transmembranal localizada

en la superficie vasolateral de las células epiteliales que contiene un dominio externo que reconoce a la IgA (Holmgren J., 1991; Lamm M., 1997).

Además, la resistencia de la IgA secretoria (sIgA) hacia las proteasas intestinales normales otorga a los anticuerpos de este isotipo un carácter único y bien adaptado para proteger la superficie mucosa intestinal. La función protectora principal de los anticuerpos sIgA (Orr et al., 1992) es la ‘exclusión inmune’ de patógenos bacterianos y virales, toxinas bacterianas y otras moléculas potencialmente dañinas (Tabla III). Esto permite que la presencia de la inmunoglobulina A sea el principal componente de las secreciones humanas y animales tales como saliva, calostro, fluidos bronquiales y secreciones intestinales (Hone y Hackett, 1989).

Tabla III. Mecanismos de la defensa de mucosas mediada por IgA (Lamm M., 1997) \*.

1	Proporciona una barrera inmune de exclusión en secreciones, contra microbios, toxinas y otros antígenos.
2	Reconoce adhesinas bacterianas tipo lectinas, bloqueando la adhesión bacteriana.
3	Efecto sinérgico con sustancias antimicrobianas no específicas en las secreciones.
4	Neutraliza virus dentro de las células epiteliales.
5	Excreta los antígenos del compartimento subepitelial, a través del epitelio, hacia las secreciones.
6	Promueve la fagocitosis.
7	Promueve la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.
8	Activa el complemento (camino alternativo).

\*Nota: El primer mecanismo está bien establecido, los demás se encuentran aún bajo estudio.

Una función interesante atribuida a la IgA es su propiedad anti-inflamatoria (Lamm M., 1997). Esto es debido a que la porción Fc de los anticuerpos ha evolucionado para mediar las funciones secundarias que entran en juego una vez que la porción Fab se ha combinado con el antígeno, como es el caso de la IgG. En el caso de la IgA, la porción Fc de la IgA polimérica es responsable de la unión con el pIgR para iniciar el mecanismo de transporte transepitelial, posiblemente el principal papel de esta porción.

Diferentes estudios han demostrado que la IgA no puede activar el camino clásico del complemento y es poco eficiente en activar el camino alternativo (Michetti et al., 1992). Como ejemplo, cuando la IgA y la IgG se unen a la misma bacteria, la IgA interfiere con la habilidad de la IgG de activar el complemento (Lamm M., 1997).

Pese a que IgA es ciertamente la principal inmunoglobulina en las mucosas, otros tipos de anticuerpos también interactúan con los antígenos en estos sitios. IgM, por ejemplo, comparte importantes características con IgA (polimérica, se une a pIgR), pero la principal diferencia es la mayor capacidad de IgM de activar el complemento. La

presencia de IgG en las secreciones de la mucosa está más relacionada con la inflamación local o daño epitelial y no con un mecanismo de transporte selectivo. El papel real de la IgG “de mucosa” está relacionado a la activación del complemento y reconocimiento de receptores en fagocitos, facilitando la fagocitosis (Lamm M., 1997).

#### 5. La infección y la respuesta inmune.

Uno de los aspectos más intrigantes de la infección gástrica con *H. pylori* es su persistencia a pesar de inducir una activa respuesta inmune tanto local, como sistémica (Czinn y Nedrud, 1991; Goodwin, 1993; Granberg et al., 1993; Granström et al., 1997; Guruge et al., 1990; Meijer et al., 1997). Esta respuesta es extremadamente compleja y varía entre los humanos infectados. La respuesta sistémica está caracterizada por un marcado incremento en IgG plasmática, la cual permanece presente por meses después que la infección ha sido curada. La respuesta local incluye la producción de IgA que se enlaza a los antígenos de superficie de *H. pylori* in vitro y recubre a la bacteria in vivo (Granström et al., 1997; Meijer et al., 1997).

Por otro lado, la infección es consistentemente asociada con una intensa respuesta inflamatoria y con la infiltración de células hacia la mucosa gástrica (Chmiela et al., 1997; Clyne y Drumm, 1993; Dytoc et al., 1993; Evans et al., 1989; Kobayashi et al., 1993; Sommer et al., 1998; Smoot et al., 1993). Aunque las células polimorfonucleares frecuentemente están presentes, muchas de las células en los infiltrados son mononucleares (Fox et al., 1993; Knipp et al., 1993; Peterson, 1991). Tanto células B como T están presentes y distintos estudios han indicado que la actividad asesina natural de linfocitos periféricos puede ser incrementada por *H. pylori*, posiblemente mediante la estimulación de la producción de interferón y otras citocinas (Bliss et al., 1998; Crowe et al., 1995; Sharma et al., 1995; Sommer et al., 1998). Así, el portar a largo plazo la infección puede relacionarse con la habilidad de la bacteria de influir en la respuesta por células T (Knipp et al., 1993). Algunas evidencias (Chen et al., 1997; Granström et al., 1997) también sugieren que esta infección puede espontáneamente desaparecer sin el uso de antibióticos.

La respuesta en la mucosa puede llegar a promover la colonización, como ha sido indicado por la observación en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) que tienden a tener una menor tasa de infección que los sujetos de la misma edad negativos para el virus de inmunodeficiencia humana. El último estudio también demostró que pacientes con SIDA tienen un distinto patrón de gastritis, caracterizado por mayores respuestas por células mononucleares, menos folículos linfoides y una mayor prevalencia de metaplasia intestinal. Sin embargo, la respuesta inmune también se ha considerado que previene la invasión de *H. pylori*, como ha sido sugerido por la

controvertida observación de la infección invasiva de *H. pylori* en un paciente con SIDA (McClure et al., 1992).

#### 6. Adhesión y colonización de *Helicobacter pylori*.

La mucosa gástrica se encuentra cubierta por una gruesa capa mucoide de gel (MGL) compuesta por dos tipos de mucinas: la mucina celular de la superficie mucoide y la mucina celular de la glándula mucoide. Esta capa, que es considerada ejerce un efecto protector en la mucosa gástrica manteniendo un gradiente de pH, de un valor ácido en el lumen a casi neutral en la superficie de la mucosa, forma una barrera de ion bicarbonato preservando estos iones alejados de las células y plasma (Fasano, 1996).

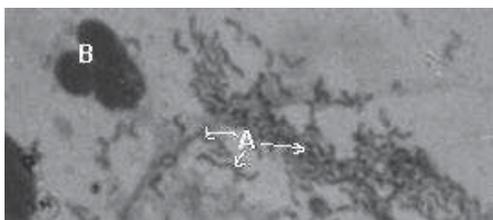


Fig. 2. Corte histológico de la mucosa gástrica de un paciente con úlcera duodenal (x1000). Se ven múltiples células curvadas de *H. pylori* (A) así como leucocitos polimorfonucleares (B) (Marshall, 1995).

Esta capa puede servir como un hábitat adecuado para *H. pylori* (Fig. 2). El organismo característicamente se adhiere a la superficie de las células mucoides y, pese a que la invasión intracelular por *H. pylori* es poco común, ha sido observado en la superficie de dichas células (Fig. 3), así como de células parietales y células 'chief' (Chmiela et al., 1997). Adicionalmente, grandes cantidades de *H. pylori* han sido encontradas por debajo de la capa mucoide. La capa de moco es un lugar indispensable para la colonización por *H. pylori* (Clyne y Drumm, 1993; Hazell et al., 1983) y la esterilización de este lugar debería considerarse suficiente para erradicar al microorganismo. En el estómago infectado con *H. pylori*, la estructura de la MGL se encuentra marcadamente desintegrada, pero la erradicación de la bacteria restaura la estructura a su forma normal.

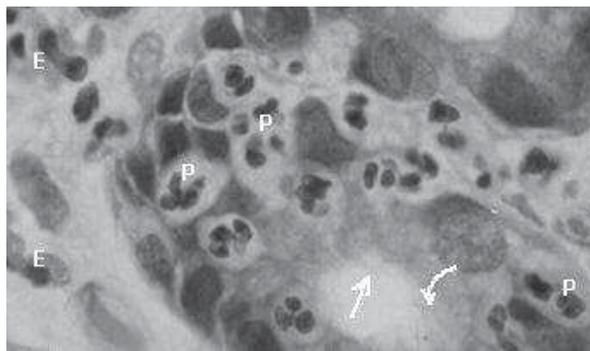


Fig. 3. Sección (x1000) mostrando leucocitos polimorfonucleares (P) invadiendo el cuello de una glándula de moco. En la glándula, pueden apreciarse algunas células de *H. pylori* (flecha) y algunos eosinófilos (E) también presentes. (Marshall, 1995).

En los inicios del estudio de *H. pylori* como agente causal de gastritis, fue observado que la bacteria se adhiere a las células epiteliales gástricas (Hazell et al., 1983; Slomiany et al., 1989; Smooth et al., 1993; Trust et al., 1991; Valkonen et al., 1993; Valkonen et al., 1994). Los exámenes histológicos de biopsias mostraron que la bacteria podía ser vista en la superficie de las células epiteliales gástricas y en la superficie luminal dentro de las criptas (Clyne y Drumm, 1993; Hazell et al., 1983; Hazell et al., 1986). La colonización se observó principalmente en el antro del estómago, sin presentar una distribución uniforme en su superficie y rara vez cerca de las células parietales en individuos no tratados. A partir de estas observaciones iniciales, muchos estudios histológicos se han llevado a cabo tanto de biopsias como de modelos in vitro (Clyne y Drumm, 1993; Chmiela et al., 1997; Kamisago et al., 1996; Kobayashi et al., 1993).

Estudios llevados a cabo sobre la distribución histológica de *H. pylori* con biopsias gástricas de pacientes infectados, demostraron que la adhesión de la bacteria presenta distintos grados de interacción (Borén et al., 1993; Cellini et al., 1994; Chmiela et al., 1997; Dytoc et al., 1993), pudiéndose encontrar débil o íntimamente adherida a la mucosa. En el primer caso, la superficie microviliar se encuentra predominantemente intacta en el sitio de la adherencia. Se ha observado que tal interacción está mediada por vellocidades que se encuentran en el espacio entre la bacteria y la membrana (Dytoc et al., 1993). Cuando se observa una adhesión íntima, usualmente ocurre un desfaseamiento del microvili y las dos membranas están firmemente en contacto (Chmiela et al., 1997; Dytoc et al., 1993).

#### 7. Diagnóstico.

La infección por *H. pylori* puede diagnosticarse después de cultivar especímenes de biopsias gástricas tomadas durante endoscopia, cosechando y aislando la bacteria (Hazell et al., 1989) en condiciones microaerofílicas (90% N<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, y 5% CO<sub>2</sub>) y caracterizando las enzimas (ureasa, catalasa y oxidasa) que produce (Ansorg et al., 1991; Archer et al., 1988). La visualización de la bacteria por microscopia de luz en filminas de cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina, gram, giemsa, o tinción de Warthin-Starry es también de gran beneficio ya que esto permite determinar el grado de inflamación inducida por *H. pylori*. Sin embargo, debido a que la colonización por *H. pylori* es focal, resultados negativos de biopsias no excluyen la posibilidad de infección en áreas no muestreadas. Así mismo, la identificación histológica requiere ser confirmada por microscopia electrónica de transmisión, dado que otros organismos espirales, como *Flexispira rappini*, pueden también estar presentes en el estómago de los humanos (Archer et al., 1988).

La infección puede también ser diagnosticada mediante la determinación de los títulos de inmunoglobulina G (IgG), o A (IgA), plasmática o salivar, mediante un ensayo inmunoabsorbente enzimático (Granberg et al., 1993; Granström et al., 1997; Guruge et al., 1990; Livingston et al., 1997; Meijer et al., 1997; Nilsson et al., 1997). Esta última técnica es específica, sensible y no invasiva, y se considera que refleja la inmunidad inducida por la infección con *H. pylori* (Best et al., 1994; Karavar et al., 1997; Luzzi et al., 1997; Oksanen et al., 1998).

Otras dos pruebas, que se basan en la producción de ureasa, son también empleadas para el diagnóstico de infección por *H. pylori*. Una es la prueba CLO (organismos tipo-Campylobacter) que se realiza colocando un espécimen de biopsia en un medio que contiene urea y un indicador sensible al pH que cambia de color con la presencia de los iones OH<sup>-</sup>. La segunda prueba es la de urea en el aliento (UBT) empleando urea marcada con <sup>14</sup>C o <sup>13</sup>C, donde después de su administración, el CO<sub>2</sub> marcado es exhalado y medido (Marchildon et al., 1996). Este método se basa en la presencia de ureasa en el estómago de los pacientes infectados con *H. pylori*. Pese a que la prueba UBT-<sup>14</sup>C es simple y adecuada, la protección de la radiación no es tan sencilla. En tanto, la prueba UBT-<sup>13</sup>C no presenta esta desventaja, pero requiere de espectrofotometría de masas para su detección (Chen et al., 1997).

Ninguna de estas pruebas es específica para *H. pylori*, dado que *G. hominis* (*H. heilmannii*), que también genera ureasa, igualmente da una reacción positiva. Por lo pronto y hasta que otros métodos específicos basados en la amplificación del rRNA 16S, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sean ampliamente disponibles (Chong et al., 1996), el diagnóstico de *H. pylori* deberá apoyarse en las características morfológicas.

Dentro de esto último, la PCR es un método prometedor para la detección de *Helicobacter pylori* en especímenes de biopsias gástricas (Clayton et al., 1992; Hammar et al., 1992; Monteiro et al., 1997; Valentine et al., 1991). Para el diagnóstico molecular de infecciones por *H. pylori*, distintas metodologías han sido propuestas. Por ejemplo, Furuta (1996) utilizó una PCR competitiva para la detección cuantitativa de *H. pylori* en el moco gástrico, empleando fragmentos de DNA sintéticos.

Otras técnicas basadas en el ácido nucleico, como el análisis de restricción de DNA genómico (Langenberg et al., 1986; Simor et al., 1990) y la hibridización por Southern blot con sondas de rRNA (Owe et al., 1994), han sido utilizadas para caracterizar los aislamientos clínicos de *H. pylori* de diferentes pacientes, pero los patrones producidos por estos métodos son complejos y difíciles de interpretar, particularmente para análisis a gran escala de aislamientos clínicos.

Labigne (1991) utilizó el análisis por PCR para la amplificación de un fragmento del gene ureC de *H. pylori* y ha demostrado que esta amplificación es específica para el género *Helicobacter*, y más precisamente para *Helicobacter pylori*.

Sin embargo, se continúa con una intensa investigación para el desarrollo de estrategias de detección de *H. pylori* que cumplan no solo con los requisitos de sensibilidad y especificidad, sino que sean pruebas no invasivas para disminuir en lo posible, el estrés psicológico y físico inducido en los pacientes por las pruebas invasivas.

## 8. Tratamiento.

### 8.1. Medicamentos.

Aunque *H. pylori* es sensible a muchas drogas antimicrobianas in vitro, es difícil erradicarla del estómago (Manetti et al., 1995). Esto puede deberse a la ruptura del antibiótico en el ácido gástrico, al recambio gástrico, y/o a la dificultad del antibiótico para penetrar la capa mucoide donde la bacteria reside. La resistencia de *H. pylori* a fármacos específicos, especialmente metronidazol, es también frecuente (Henriksen et al., 1997; Piccolomini et al., 1997; Wang et al., 1998). Por tanto, y en general, es aceptada la combinación de al menos dos, y posiblemente tres, agentes antimicrobianos para ser administrados por un mínimo de una semana (Tabla IV). El régimen que se ha encontrado más efectivo es el uso de amoxicilina (o tetraciclina) en conjunto con metronidazol y subsalicilato de bismuto, dos a cuatro veces al día por dos a tres semanas (Walsh y Peterson, 1995).

Económico \$600	Terapia triple por 14 días. Efectividad 80-90% (dependiendo en el nivel de resistencia a metronidazol). Ranitidina, amoxicilina y metronidazol.
Efectivo \$2,000	Amoxicilina, omeprazol y claritromicina, 10-14 días. Efectividad 85-95% (dependiendo en el nivel de resistencia a metronidazol y claritromicina).
Breve (7 días) \$1600	Metronidazol, omeprazol y claritromicina (MOC). Efectividad 85-95% (dependiendo en el nivel de resistencia a metronidazol y claritromicina). Muchos estudios logran el éxito con 7 días de terapia.
	Metronidazol, omeprazol y amoxicilina (MAC). 85-90% de éxito con 7 días de tratamiento en un gran estudio práctico.

El uso de un antibiótico en asociación con un agente antisecretor, como el antagonista del receptor de histamina, ha arrojado resultados negativos (Dubois, 1995). En contraste, la combinación de un inhibidor de la bomba de protones (antagonista de ATPasa  $H^+K^+$ ) con amoxicilina o macrolidos estables en ácido (claritromicina o roxitromicina), parecen más prometedores (Walsh y Peterson, 1995). Diversos estudios están siendo llevados a cabo para determinar la óptima dosis, duración de la terapia concomitante y efectividad, así como la cuestión económica de la aplicación de estos compuestos. Recientemente se ha demostrado que un tratamiento de al menos siete días de cualquier régimen es requerido para obtener una alta tasa de cura (90%), resultado que no se mejora significativamente si el tratamiento se prolonga hasta 10 días (Marshall, 1995).

Finalmente, la terapia tópica fue estudiada recientemente con resultados excelentes. Este tratamiento implica la administración por dos días de un agente mucolítico para disolver la capa mucoide y un inhibidor de la bomba de protones. En el tercer día un globo es introducido en la segunda porción del duodeno y una solución de pronasa, amoxicilina, metronidazol y subsalicilato de bismuto inyectada al estómago, en donde se deja por una hora. La presencia del globo duodenal previene el vaciamiento de los medicamentos y el agente mucolítico, asegurando una máxima eficiencia del tratamiento (Marshall, 1995).

El tratamiento de la infección por *H. pylori* en pacientes con enfermedad úlcero-péptica es hoy día una práctica aceptada en EUA y Europa (NIH, 1994) y es la base para la regulación de las combinaciones de medicamentos empleados. Sin embargo, la terapia antimicrobiana tiene un número inherente de limitaciones que pudieran vencerse con el uso de vacunas efectivas o una combinación de antibióticos y vacunas. En promedio, el fracaso del tratamiento primario ocurre en un 15% de pacientes tratados con antibióticos combinados con un componente antisecretor. El desacuerdo de los pacientes con los regímenes complejos de antibióticos y la resistencia a ellos en *H. pylori* (Monteiro et al., 1997), contribuyen a la falta de éxito en los tratamientos. En contraste a los antibióticos, la inmunidad inducida por vacunas no se relaciona con la generación de organismos resistentes o más virulentos, dado que los mecanismos inmunológicos son distintos al de los implicados en los tratamientos antimicrobianos. Las vacunas solas, o en asociación sinérgica con medicamentos, pudieran lograr una tasa de curación del 100% (Monath et al., 1998).

## 8.2. Inmunizaciones.

Diferentes antígenos bacterianos han sido estudiados en cuanto a su uso posible como componentes de vacunas, incluyendo a la ureasa (responsable de la tolerancia al

ácido, colonización y debilitamiento de la mucina), que también es uno de los más estudiados debido a su elevada producción por todas las especies de *Helicobacter* (Collins y D'Orazio, 1993; Tsuda et al., 1994). Utilizando urea recombinante y extractos crudos, la actividad terapéutica ha sido documentada en ratones con eficiencias del 50% al 94%. Cuando la vacuna y un régimen parcialmente efectivo de antibióticos fueron combinados, resultó en una mayor efectividad que el empleo por separado (Monath et al., 1998).

Otra estrategia es la posibilidad de inducir una respuesta inmune contra la movilidad bacteriana, la actividad catalasa (Czinn y Nedrud, 1991; Goodwin, 1993; Lee et al., 1993), así como para el bloqueo de otras proteínas relacionadas con el mecanismo de adhesión empleado por la bacteria (O'Toole et al., 1995; Piotrowski et al., 1991; Ringnér et al., 1992). Además, se han empleado toxinas bacterianas como vacunas previniendo de forma efectiva la infección con cepas virulentas de *H. pylori* (Manetti et al., 1995). Todos estos estudios han reportado un incremento en la habilidad del huésped de protegerse contra este patógeno, pero aún se tiene mucho trabajo por hacer. Por ejemplo, Pappo (1995) encontró una asociación entre la inmunización y la gastritis histológica en un modelo murino de *Helicobacter*, estudiando el resultado de un animal oralmente inmunizado con una vacuna de ureasa recombinante.

Las pruebas clínicas de la ureasa recombinante como tratamiento terapéutico iniciaron en 1994 (Monath et al., 1998). Estos estudios fueron llevados a cabo en voluntarios infectados sin manifestaciones de la enfermedad, debido a la preocupación de que en individuos con gastritis activa ésta pudiera agravarse al existir un incremento en el nivel de inflamación con la infección subsecuente o, incluso, enmascarar los efectos adversos inducidos por la vacuna. Este fenómeno fue también observado en ratones (Lee et al., 1997) con la cuantificación directa del efecto terapéutico en sujetos infectados presentando la mayor significancia clínica.

Un estudio clínico limitado fue llevado a cabo para demostrar la seguridad y tolerancia de la administración oral de la ureasa sin un adyuvante de mucosa (cuatro dosis de 60 mg cada una), sin presentarse un incremento en la respuesta inmune ni cambio en la densidad bacteriana, inflamación o daño a la mucosa. Por el contrario, la coadministración oral de la toxina termolábil de *E. coli* (hLT) con ureasa, resultó en un incremento en los números de células productoras de anticuerpos (APCs) IgA o IgG en las biopsias gástricas estudiadas. Los sujetos que recibieron esta vacuna experimentaron, en promedio, un gran decremento en la densidad bacteriana que aquellos que recibieron únicamente placebo (Monath et al., 1998).

Todo un convincente cuerpo de datos existe hoy día que apoya el potencial de una inmunización exitosa contra *H. pylori*. Sin embargo, los estudios sobre vacunas aún se

encuentran en una etapa preliminar de desarrollo clínico. Los mejores inmunógenos, la forma de presentación, el número de dosis necesarias, la edad óptima de inmunización, los beneficios esperados, los costos y otros factores implicados en el desarrollo de vacunas requieren estudios más a fondo (Monath et al., 1998).

Estos aspectos fueron estudiados en el presente trabajo, con la evaluación de un esquema de inmunización contra enfermedades gastroduodenales asociadas a *H. pylori* en un modelo animal, empleando una cepa del patógeno adaptada al roedor.

#### 9. Desarrollo de vacunas.

Aunque hoy en día se utilizan tratamientos antimicrobianos efectivos contra *Helicobacter pylori* para prevenir la recurrencia en pacientes con enfermedad ulcerosa duodenal activa o reciente, la habilidad de tratar no hace obvia la necesidad de estrategias preventivas (Millar y Pike, 1992). Ciertamente, muchas infecciones por *H. pylori* predisponen para el desarrollo de cáncer gástrico, y 20 a 30% de los casos de hemorragia gastrointestinal superior ocurre en individuos quienes han sido sometidos a infecciones a largo plazo, sin previa manifestación sintomatológica. Por esta razón, estos individuos no buscan la asistencia médica en tiempo para la intervención antimicrobiana (Monath et al., 1998). Por otro lado, la alta prevalencia de patógenos bacterianos resistentes a antibióticos y el surgimiento de pacientes inmunocomprometidos, han servido como estímulo para reconsiderar el uso de anticuerpos para combatir las infecciones clínicas (Lamm M., 1997).

La compleja patogénesis de esta infección (Blaser, 1990), por la presencia de antígenos de *H. pylori* compartidos con el huésped que generan un mecanismo de evasión inmune, demanda nuevas estrategias para el desarrollo de una formulación efectiva de vacuna. Es razonable asumir que más de un componente protector es necesario en una formulación de vacuna para inducir una respuesta protectora y que han sido descubiertos un número de antígenos además de la estudiada ureasa (Monath et al., 1998). El análisis de la secuencia del genoma completo de *H. pylori* por Tomb y colegas (1997), apoya los esfuerzos para el descubrimiento de antígenos, facilitando su detección e incluso, agilizando los mecanismos para su obtención y empleo para el desarrollo de un inmunógeno efectivo. Además de una composición del antígeno, una vacuna exitosa debe ser administrada al huésped en forma tal que induzca inmunidad protectora (terapéutica), particularmente en el sitio de la colonización bacteriana (mucosa gástrica). Las rutas orales de inmunización con un adyuvante de mucosa clásico ha proporcionado los mejores resultados, pero la actividad profiláctica continúa incompleta (Monath et al., 1998). Es necesario investigar los mecanismos de la inmunidad protectora inducida por las vacunas a una infección natural y sobre la función de las células T en esta respuesta.

Dichos estudios pueden proporcionar datos importantes que llevarán al desarrollo de métodos de inmunización novedosos y a pruebas mejores para estudiar la protección.

Todos los estudios preclínicos reportados a la fecha han demostrado cierta eficiencia en la vacunación contra la infección por *Helicobacter* empleando antígenos administrados a nivel de mucosa en conjunto con la toxina del cólera (CT) o hLT, como adyuvante de mucosa. Ninguna protección se logra cuando los antígenos son administrados sin tal adyuvante, incluso empleando dosis excesivas del mismo (Lee y Chen, 1994). CT no es aceptable como adyuvante en humanos debido a que produce diarrea a niveles de microgramos, pero hLT es menos nociva y ha sido empleada clínicamente (Monath et al., 1998). Una forma de evitar la reacción de toxinas nativas como adyuvantes es el uso de la subunidad  $\beta$  de la toxina del cólera (CTB) que no es tóxica, junto con una dosis baja de la toxina nativa. Se ha demostrado que tal combinación para la formulación de una vacuna, por ejemplo empleando un sonicado de *H. felis* como antígeno y un adyuvante, proporciona protección contra infecciones experimentales con *H. felis* en un modelo animal (Lee y Chen, 1994).

Así mismo, existe un incremento en el uso de la ruta oral para la administración de antígenos para la producción de inmunidad contra agentes infecciosos. Paradójicamente, la administración oral de antígenos puede también resultar en el desarrollo de tolerancia al tratamiento de varias enfermedades autoinmunes (Sun et al., 1996). Los factores que determinan el resultado en la inducción de inmunidad o tolerancia y los mecanismos responsables de tal resultado aún no están bien definidos. Evidencias sobre la comunicación y coordinación que ocurre entre las distintas mucosas (nasal, respiratoria, intestinal, urinaria y genital), están día a día siendo más persuasivas (Holmgren J., 1991) en la búsqueda de rutas alternativas de administración de diversos inmunógenos.

El éxito de la vacunación oral para poliomielitis, en conjunto con la mejor apreciación del tamaño y amplia distribución del tejido linfoide asociado a mucosas (Holmgren J., 1991) y la compartimentización de la respuesta por IgA, han renovado el interés en explotar el sistema inmune de mucosas para la vacunación contra las muchas infecciones que ocurren o se originan en las membranas de mucosas (Lamm M., 1997).

Muchos factores específicos pueden influir en la formación de inmunidad de mucosas a un antígeno en especial. En muchos casos, la mejor inmunización se obtiene mediante la aplicación repetida del antígeno (Holmgren J., 1991). Otro factor que influye en la respuesta a la inmunización es la experiencia del contacto previo al mismo antígeno en el sitio en estudio (Jackson et al., 1993). Por ejemplo, varios trabajos demostraron que la inmunización parenteral con cólera da origen a una respuesta mediada por la inmunoglobulina A secretoria (sIgA) en la leche materna en mujeres paquistaníes,

mientras que tal inmunización no indujo anticuerpos de mucosas en mujeres suecas quienes no habían estado en contacto con el organismo (Holmgren J., 1991).

Otra determinante importante, es la naturaleza del antígeno utilizado. Los inmunógenos efectivos no deben ser degradados en el ambiente de la mucosa, pero sí deben unirse y/o penetrar al epitelio facilitando su procesamiento (Toida et al., 1997). Para esto, la habilidad de la CTB y hLT de unirse fuertemente a los receptores de la superficie intestinal, junto con la habilidad de estas proteínas de resistir la degradación por las enzimas proteolíticas intestinales, ha creado mucho interés en el empleo de estas toxinas no solo como agentes inmunoproliféricos orales, sino también como acarreadores de otros antígenos relevantes en vacunas (Holmgren J., 1991).

Así mismo, existe gran interés en el desarrollo de nuevas y efectivas formas de "empacar" antígenos para la inmunización de mucosas. Los antígenos pueden ser administrados en aerosoles al tracto respiratorio y pueden ser aplicados oralmente dentro de microesferas biodegradables que penetran las células M para llegar al tejido linfoide asociado a mucosas con mayor eficiencia (Jones et al., 1996). Los antígenos para aplicación oral también han sido combinados con liposomas (Gregoriadis G., 1994; Guzman et al., 1993). Mediante la ingeniería genética, es posible desarrollar bacterias y virus atenuados que producen antígenos protectores o epítopes, ya sea del propio patógeno, u otros microorganismos (Jagusztyn et al., 1993; Lamm M., 1997).

A su vez pueden construirse bacterias atenuadas conservando la habilidad del patógeno original de colonizar la mucosa gástrica pero que tengan una habilidad de replicación limitada, incapaces de causar la enfermedad. (Lamm M., 1997).

También hay considerable interés en los adyuvantes que mejoran las respuestas inmunes en las mucosas y puedan ser clínicamente aceptables. Dos de los adyuvantes más prometedores estudiados hoy día son la toxina del cólera y la enterotoxina termolábil de *E. coli* (o sus subunidades B), que han probado ser altamente efectivas en los sistemas experimentales. (Czerkinsky et al., 1989; Holmgren J., 1991; Jagusztyn et al., 1993).

Diferentes estudios han también evaluado el papel de anticuerpos contra proteínas bacterianas con afinidad por constituyentes de la ECM; tal como las proteínas enlazantes de fibronectina y colágeno en infecciones experimentales con *Staphylococcus aureus* (Ciborowski et al., 1992; Rozalska y Wadström, 1994; Mamo et al., 1994), probando ser promotoras contra infecciones por *S. aureus*, previniendo la adhesión inicial de la bacteria a varios tejidos que producen estos receptores (fibronectina y colágeno).

#### 10. Investigación futura.

Desde hace mucho se ha reconocido que muchas infecciones implican a las membranas de mucosas como portal de entrada, o como el foco de la enfermedad.

También es conocido que, hablando en general, los anticuerpos son altamente efectivos contra patógenos extracelulares y por tanto, deben ser capaces de prevenir infecciones con gran eficiencia. Mayores evidencias sobre el papel de IgA como el principal anticuerpo de mucosa y sobre los caminos naturales y requerimientos para su producción, en conjunto con el rápido progreso en el desarrollo de nuevos vectores y adyuvantes para estimular la producción de anticuerpos en las mucosas, deberá hacer posible la creación de una nueva generación de vacunas (Lamm M., 1997).

Los pasados 12 años han sido testigos de un extenso progreso en la investigación sobre *H. pylori* como la causa de gastritis activa crónica, enfermedad ulcero-duodenal, y cáncer gástrico (Blaser, 1990, 1992; Blaser et al., 1995; Weber et al., 1994). Esto ha sido debido principalmente a la colaboración de muchos gastroenterólogos, patólogos, genetistas moleculares, bacteriólogos e inmunólogos. Sin embargo, nuestro entendimiento de como *H. pylori* coloniza y causa la enfermedad dista de ser completa y esta comprensión se verá beneficiada por estudios llevados a cabo en animales que pueden ser experimentalmente infectados con *H. pylori*. Además, no hay disponibilidad de un tratamiento fácilmente administrado para la erradicación de esta bacteria en todos los pacientes, aunque un mejor conocimiento de su fisiología podrá llevar al desarrollo de uno.

Estudios en animales que no son infectados naturalmente por *H. pylori* sugiere candidatos posibles para estudio de vacunas. Evaluaciones en proceso en primates no humanos están explorando la posibilidad de inmunizar huéspedes que pueden ser infectados de forma natural con este organismo (Engstrand, 1995). Pese a que la eliminación de la enfermedad úlcero-péptica y ciertas formas de cáncer gástrico, requerirán esfuerzos extensos y coordinados de las autoridades de salud pública, esta meta parece encontrarse al alcance.

## PLAN GENERAL DEL PRESENTE ESTUDIO.

El objetivo general del presente trabajo fue el desarrollo de una estrategia para bloquear la adhesión de *Helicobacter pylori* a la membrana gastrointestinal del modelo animal BALB/c, como una medida de prevención y control de la enfermedad inducida por este microorganismo en humanos.

Para ello se consideraron diversas estrategias, seleccionándose la obtención de una vacuna como medida profiláctica efectiva. Dicha obtención consideró las propiedades inmunológicas de los componentes de la bacteria que participan en la adhesión del microorganismo al epitelio gastrointestinal como primer evento en la infección. Para ello se propuso la obtención de un conjugado de los componentes con la toxina del cólera para promover una respuesta inmune mediada por la producción de inmunoglobulinas A como mecanismo de protección de la infección.

Se emplearon las siguientes estrategias:

(i) La caracterización bioquímica parcial de proteínas de la superficie celular de *H. pylori* que pueden estar asociadas con el proceso infeccioso. En esta etapa del estudio se seleccionaron las proteínas que presentan afinidad por el proteoglicano sulfato de heparina (HSBPs). Se considera que dichas proteínas están relacionadas con el mecanismo de adhesión que emplea la bacteria para unirse al tracto gastrointestinal del huésped. El contar con un mejor conocimiento de estas proteínas nos proporcionará mejores herramientas para el diseño experimental de vacunas contra este patógeno (artículo I).

(ii) El desarrollo de una estrategia de inmunización oral contra la gastritis asociada a *H. pylori*, utilizando una vacuna preparada con las HSBP en conjunto con adyuvantes, para estimular el sistema inmune asociado al tejido gastrointestinal con el fin de prevenir la colonización por el organismo y la degradación del tejido (estómago e intestino) en ratones experimentalmente infectados (artículos II y III).

---

## RESULTADOS.

**Nota:** Los detalles de la metodología y las figuras mencionadas, aparecen en los trabajos publicados referidos con números romanos.

**Proteínas enlazantes de sulfato de heparina (HSBPs).** Las proteínas contenidas en los sobrenadantes de los cultivos líquidos, fueron precipitadas empleando distintas concentraciones de sulfato de amonio (0-40%, 40-60%, 60-80%, y 80-100%). Estas fracciones fueron extensivamente dializadas contra bicarbonato de amonio, y sometidas a estudios por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) así como a ensayos de transferencia. Así mismo, y dada la posibilidad de que estas proteínas fuesen de origen sérico provenientes del medio de cultivo comúnmente utilizado (BBFCS), se empleó un medio de cultivo libre de suero de extracto de brucella, suplementado con ciclodextrinas (BBCD) para confirmar si las proteínas eran producidas y excretadas por *H. pylori* (Olivieri et al., 1993).

### *1) Análisis Electroforéticos.*

Los perfiles de SDS-PAGE dieron como resultado una gran variedad de proteínas en las fracciones al 0-40% y 40-60% (**Anexo I**, Fig. 1A), incluyendo la presencia de péptidos propios de la base de brucella; por otro lado en la fracción 80-100%, no se observó una obtención de proteínas significativa. Sin embargo, en la fracción al 60-80% se detectó la presencia predominantemente de proteínas de alta masa molecular, por lo que fueron sujeto de mayor estudio, dada la menor variabilidad antigénica para los objetivos del presente trabajo, así como también en base a evidencias previas donde se demostró que proteínas de alta masa molecular presentaban la mayor afinidad hacia el sulfato de heparina (Ascencio et al., 1993 y 1994).

Dentro de esta fracción (60-80%), se observaron bandas de proteínas de 71.5, 66.2, 54.4, 47.2, y 14.4 kDa de origen bacteriano, en base a la comparación en los dos sistemas de cultivo empleado (**Anexo I**, Fig. 1A).

Así mismo y en virtud de la función adhesiva de estas proteínas, se determinaron los perfiles electroforéticos de proteínas asociadas, débil (**Anexo I**, Fig. 3A) o íntimamente (**Anexo I**, Fig. 4A), a la membrana celular (extracciones con agua y glicina ácida, así como OMPs). Dentro de estas fracciones, se determinó la presencia de proteínas con masas de 71.5, 66.2, 47.2, 44.3 kDa principalmente.

### 2) *Análisis de Transferencia.*

Los ensayos de transferencia de las proteínas fraccionadas secuencialmente con sulfato de amonio, mostró el perfil de la Fig. 1B (**Anexo I**). Empleándose sulfato de heparina marcado con peroxidasa (HRP-HS) como sonda, en la fracción 60-80% se demostró la presencia de cinco proteínas principales con actividad enlazante del sulfato de heparina (HSBPs) con masas de 71.5, 66.2, 54.4, 47.2 y 31.0 kDa. Comparando los perfiles de SDS-PAGE y los ensayos de transferencias de las proteínas de ambos cultivos líquidos (BBFCS y BBGD), se observó que las tres principales HSBPs correspondientes a 71.5, 66.2 y 54.4 kDa se encontraron en ambos medios (**Anexo I**, Fig. 1B).

Así mismo, dentro de las proteínas asociadas débilmente a la membrana y extraídas con agua y/o urea, se encontró la presencia de las HSBP de 71.5 y 66.2 kDa que también aparecen en el medio de cultivo (**Anexo I**, Fig. 3) y además la presencia de HSBPs de 44.3, 40.1 y 26 kDa. Por otro lado, dentro de las proteínas de la membrana externa (OMP) obtenidas por disrupción se encontró que forman parte integral de la membrana las HSBPs de 66.2, 51.2, 47.2, 34.2, 29.8, y 20.4 kDa (**Anexo I**, Fig. 4)

### 3) *Cromatografía.*

La fracción 60-80% del medio de cultivo en BBFCS fue analizado utilizando un procedimiento cromatográfico descrito por Evans (1992) con algunas modificaciones (**Anexo I**), con la finalidad de obtener una fracción purificada de las HSBPs, e incluso, intentar obtener purificaciones de estas proteínas. Sin embargo, se observó que todas las HSBPs fueron eluidas en la misma fracción (**Anexo I**, Fig 2), por lo que de esta forma, se obtuvo una fracción que contenía solamente proteínas con afinidad por el sulfato de heparina.

### 4) *Isoelectroenfoco.*

Análisis para determinar el punto isoeléctrico (pI) y ensayos de transferencia de las proteínas obtenidas (con una saturación con sulfato de amonio al 60-80%) del cultivo en BBGD mostró dos bandas principales con afinidad al sulfato de heparina a 5.0 y 5.4 de pI. Así mismo, se observó una tercera banda con un pI de 5.2 (**Anexo I**, Fig. 5). Estas proteínas fueron correlacionadas con las masas moleculares y se encontró que la proteína de 66.2 kDa correspondía a la de 5.4 de pI, y que la proteína de 71.5 kDa, a un pI de 5.0.

### 5) *Secuenciación de aminoácidos.*

Como última parte de esta caracterización bioquímica parcial de las HSBPs de *H. pylori*, la secuencia de aminoácidos fue determinada, obteniéndose la información mostrada en la Tabla V.

La secuencia aminoterminal de la HSBP de 71.5 kDa/pI 5.0 (HSBP50) no mostró homología con otras proteínas enlazantes de heparina reportadas, ni con otras proteínas conocidas para *H. pylori*, mientras que por otro lado, la HSBP de 66.2 kDa/pI 5.4 (HSBP54) presentó homología con una chaperonina de *E. coli* y con la hemoglobina equina. Una tercera HSBP fue aislada de la fracción OMP de las células de *H. pylori* (OMP-HSBP). Análisis de SDS-PAGE y transferencia revelaron que la OMP-HSBP tiene una masa molecular de 47.2 kDa, y la secuencia de aminoácidos de un péptido interno (Tabla V) no presentó homología con las HSBPs extracelulares de *H. pylori* ni con otras HSBP microbianas.

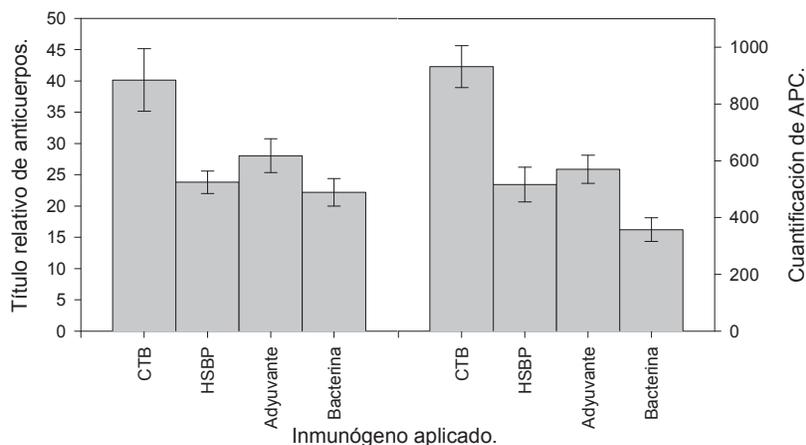
TABLA V. Secuencia de aminoácidos de tres HSBPs.	
Etiqueta de HSBP.	Secuencia <sup>a</sup> .
HSBP50 .....	V-P-E-R-A-V-R-A-H-T-
HSBP54 .....	V-H-L-P-A-D-K-T-N-V-
OMP-HSBP <sup>b</sup> .....	-Q-V-I-T-Y-V-E-G-K-W-

<sup>a</sup> Se emplea el código de aminoácidos alfabético [x-y].  
<sup>b</sup> Información de un péptido interno de la HSBP-OMP de 47.2 kDa.

#### Inmunoestimulación del sistema inmune intestinal de ratones BALB/c.

Debido a que la inhibición de la adhesión bacteriana a células cancerosas gástricas es favorecida por la adición de heparina y sulfato de heparina (Kamisago et al., 1996) a los cultivos de tejido, trabajamos sobre la hipótesis de que la inmunización oral de HSBPs, en conjunto con adyuvantes de mucosas, induciría una respuesta inmune anti-HSBP que le permitiría al huésped prevenir la adhesión de la bacteria a la mucosa gástrica.

Con esto en mente, distintos adyuvantes de mucosa fueron evaluados para estimular el sistema inmune asociado al intestino con una respuesta anti-HSBP empleando un conjunto de HSBPs formado por proteínas correspondientes a 71.5, 66.2, 54.4 y 47.2 kDa obtenidas por precipitación con sulfato de amonio (fracción 60-80). Los adyuvantes estudiados incluyeron la subunidad  $\beta$  de la toxina del cólera (CTB), la toxina termolábil de *E. coli* hLT (Jagusztyn et al., 1993), los muramil dipéptidos MDP y GMDP. Se emplearon también microesferas de látex y liposomas como acarreadores (Gregoriadis, 1994; Guzmán et al., 1993). La respuesta inmune fué determinada por ELISA (títulos de anticuerpos) y por ELISPOT (cuenta de células productoras de anticuerpo).



**Fig. 4.** Resumen de la respuesta inmune inducida por los distintos inmunógenos estudiados. Se observa que la CTB induce la mayor respuesta inmune (Gráfica completa, **Anexo II**, Fig. 2).

Los resultados indican que la respuesta inmune humoral se expresa como un incremento significativo en el título de anticuerpos anti-HSBP en los ratones BALB/c inmunizados oralmente con la fracción 60-80% de las HSBPs covalentemente unidas a la CTB (**Anexo II**, Fig. 2), el cual fue muy superior al resto de los adyuvantes y acarreadores estudiados (hLT, muramil dipéptidos, microesferas de látex, o liposomas), y a la administración de las HSBPs solas ( $P < 0.05$ ).

Esta respuesta se vio caracterizada por la presencia de títulos de IgA particularmente elevados en las secreciones gástricas de aquellos animales inmunizados oralmente con el inmunógeno HSBP-CTB (**Anexo II**, Fig. 2). En este caso también la respuesta de IgG fue significativamente superior en el suero de los ratones inmunizados con el mismo adyuvante (**Anexo II**, Fig. 2).

Por otro lado, la respuesta inmune por las células productoras de anticuerpos (APC), fué evidenciada por la presencia de APC anti-HSBP del isotipo IgA (**Anexo II**, Fig. 3) en la mucosa gástrica. De igual forma, las cuentas de células productoras de anticuerpos del isotipo IgG se vieron incrementadas en el número de células productoras de IgG en la sangre de los ratones inmunizados (**Anexo II**, Fig 3).

Ninguno de los inmunógenos oralmente administrados a los ratones BALB/c mostraron tendencia a inducir daño epitelial, sea en el estómago o la superficie intestinal, como ha sido reportado previamente para otras preparaciones de vacunas.

El análisis de correlación ( $r > 0.89$ ) de las distintas respuestas causadas por el inmunógeno HSBP-CTB, mostró resultados interesantes entre las cuentas de APC sistémicas (IgG en células sanguíneas) y los títulos de inmunoglobulinas en la mucosa

(IgG) (Tabla VI). Las cuentas de células productoras de anticuerpos (APC) de sangre y los títulos de anticuerpos de mucosa (principalmente anti-HSBP de los isotipos IgG e IgM), se incrementaron similarmente ( $r \sim 0.9$ ).

**Tabla VI.** Coeficientes de correlación y niveles de probabilidad de respuestas inmunes de ratones BALB/c oralmente inmunizados con HSBP-CTB.

Células	Anticuerpos	<i>r</i>	<i>P</i>
IgG en sangre	IgG en intestino	0.99	0.0000
IgG en sangre	IgM en intestino	0.93	0.02
IgG en sangre	IgA en suero	-0.89	0.04
IgM en sangre	IgG en intestino	0.89	0.04
IgM en sangre	IgM en intestino	0.99	0.0000
IgA en intestino	IgG en bilis	-0.99	0.0000
IgA en bazo	IgA en bilis	0.98	0.0000
IgG en bazo	IgA en bilis	0.98	0.0000
IgM en bazo	IgM en bilis	1	0.0000

#### **Inmunoprotección de ratones BALB/c contra la colonización por *H. pylori*.**

Pese a que la presencia de anticuerpos anti-*H. pylori* ha sido descrita en los sueros de pacientes infectados, esta respuesta no es efectiva en la eliminación o prevención de exposiciones al patógeno (Czinn y Nedrud, 1991; Goodwin, 1993; Granberg et al., 1993; Granström et al., 1997; Meijer et al., 1997). Ya hemos comentado que la administración oral del conjugado HSBP-CTB a ratones BALB/c induce una respuesta inmune significativa, tanto a nivel local, como sistémico. Finalmente, decidimos estudiar si tal respuesta era en realidad capaz de prevenir la adhesión bacteriana a la mucosa gástrica de ratones BALB/c inmunizados (Fig. 5). Para evaluar esto se empleó una cepa de *H. pylori* adaptada al ratón (Engstrand, 1995; Lee et al., 1997) que demostró una efectiva afinidad hacia la mucosa intestinal de ratones BALB/c infectados oralmente con dicha cepa. Este modelo ha sido empleado para la evaluación de los mecanismos de adhesión bacteriano, así como en el estudio de distintos tratamientos contra el patógeno (Ghiara et al., 1995; Lee et al., 1997; Tsuda et al., 1994). Además, la cepa de *H. pylori* adaptada al ratón (cepa Sidney SS1) se sabe que se adhiere a la mucosa gástrica de ratones BALB/c y que dicha asociación puede persistir por años (Lee et al., 1997). Así, este modelo ha demostrado ser útil para la evaluación de la inmunidad protectora inducida por la administración de la HSBP-CTB.

Como se detalla en el **Anexo III**, los ratones BALB/c fueron inmunizados con 20 µg de HSBP (Fracción F80 obtenida del cultivo en BBFCS) covalentemente acoplado a la subunidad β de la toxina del cólera (CTB) y posteriormente retados con 500 µL de una suspensión de la bacteria adaptada ( $10^9$  células/mL). Grupos de 15 animales fueron sacrificados en los días 20, 40 y 60, siendo el estómago e intestino extraídos y analizados por distintos ensayos para determinar la presencia de *H. pylori*.



**Figura 5.** Modelo animal (ratones BALB/c) utilizados en los protocolos de inmunización.

La cepa adaptada al ratón de *H. pylori* mostró habilidad de colonizar la mucosa gástrica de este roedor, determinado por la prueba de ureasa (Neiger et al., 1998), así como por estudios microbiológicos e histológicos. La bacteria se encontró en las criptas del microvello intestinal, en asociación a las células productoras de moco (**Anexo III**, Fig. 1). Aunque no fue evidente daño histológico, la bacteria continuó presente 60 días después de la infección experimental en aquellos ratones no inmunizados. Resultados similares han sido previamente reportados por Cellini (1994), quien no observó alteraciones en la integridad de la mucosa gástrica de ratones BALB/c infectados con el patógeno humano adaptado a la mucosa del ratón. Así pues, en aquellos animales oralmente inmunizados con nuestro inmunógeno (HSBP-CTB), la bacteria no estuvo presente en 42 (93%) de los 45 animales estudiados (**Anexo III**, Tabla 1), sin señales de perturbaciones histológicas.

Finalmente, para confirmar el diagnóstico, la presencia de *H. pylori* fue determinada por análisis de PCR de extractos de DNA del tejido intestinal, utilizando “primers” específicos para la subunidad C de la enzima ureasa, *UreC* (Monteiro et al., 1997) de *H. pylori* (**Anexo III**, Fig. 2). Los resultados vertieron bases más sólidas para la estimación de la protección (97% de los animales inmunizados no contenían a la bacteria) inducida por la vacuna.

## DISCUSION GENERAL.

Como sabemos, el factor clave en la patogénesis de cualquier infección bacteriana es la adhesión de dicho microorganismo a su tejido blanco en el huésped, por tanto el conocimiento de este proceso y las condiciones que favorecen dicha adhesión son importantes (Blumberg et al., 1988; Dytok et al., 1993). Diversos receptores en el epitelio gastrointestinal han sido propuestos para funcionar como blancos de adhesión de *H. pylori*. Estos incluyen a compuestos tales como los sulfogalactosilcerámidos y las proteínas de la matriz extracelular (ECM) del tejido gastrointestinal. La evidencia actual indica que la interacción bacteria-ECM está basada en un reconocimiento molecular específico (Borén et al., 1994; Doig et al., 1992, 1994; Dytok et al., 1993). *Helicobacter pylori* es capaz de reconocer componentes de la membrana basal *in vitro*, incluyendo lamininas, sulfato de heparina, vitronectina, mucina salivar y colágeno tipo IV (Ascencio et al., 1993; 1995).

Recientemente, el papel de diversos compuestos sulfatados en la adhesión de *H. pylori* a la línea celular Kato III ha sido demostrado. Este proceso puede ser inhibido por la adición de heparina al sistema de ensayo (Ascencio et al., 1993, 1995; Guzman-Murillo, 1997; Ljungh et al., 1996; Utt y Wadström 1997). El hecho de que *H. pylori* posea moléculas de adhesión capaces de reconocer glicoconjugados sulfatados en el huésped (Ascencio et al., 1993, 1995; Ljungh et al., 1996) dio origen al presente estudio.

El proteoglicano sulfato de heparina está implicado como molécula de adhesión dentro de la organización de la matriz extracelular encontrada en la superficie de tejidos, incluyendo el epitelio gástrico (Ascencio et al., 1995; Desai et al., 1993; Frevert et al., 1993; Liang et al., 1994; Lindahl et al., 1994; Love et al., 1993). La presencia de HSBPs en la superficie celular de *H. pylori* forma parte del mecanismo de adhesión de la bacteria a la ECM y, por tanto, la posibilidad de bloquear la interacción entre estas proteínas y el tejido gastrointestinal, como una alternativa atractiva para el desarrollo de una protección inmunológica contra el patógeno gastrointestinal fue estudiada en este trabajo.

En este contexto, distintas proteínas de *H. pylori* con afinidad por el proteoglicano sulfato de heparina fueron identificadas y designadas como proteínas enlazantes de sulfato de heparina (HSBP por sus siglas en inglés, **Anexo I**). Tres principales HSBPs (71.5, 66.2 y 47.2 kDa) fueron parcialmente caracterizadas.

Aún mas, ensayos por isoelectroenfoque demostraron que el punto isoelectrico (pI) de estas HSBPs es de carácter ácido, lo que puede apoyar la expresión y permanencia de estas proteínas en el ambiente ácido del tracto gastrointestinal. Fue

también interesante encontrar que las HSBPs de 66.2 y 47.2 kDa estuvieron presentes tanto en las fracciones extracelulares como en la fracción OMP estudiadas (**Anexo I**).

Otra evidencia de la participación de las HSBPs en la adhesión bacteriana ha sido demostrada por otros trabajos de investigación (datos no publicados), en donde como resultado de la preincubación de cultivos celulares de células gástricas con estas proteínas, se observó un significativo decremento en la adhesión bacteriana, comparado con el grupo de control. De la misma forma, los mismos trabajos demostraron que la exposición de células de *H. pylori* a anticuerpos anti-HSBP, arrojó los mismos resultados.

Con toda esta evidencia, el siguiente objetivo fué la determinación del papel que tales proteínas desempeñan en la respuesta inmune para proteger a nuestro modelo animal contra infecciones experimentales por *H. pylori*.

Los resultados que reportamos aquí, concuerdan con aquellos obtenidos por otros grupos de investigación (Ala'alden et al., 1995; Engstrand, 1995; Forrest, 1992; Goodwin, 1993; Jagusztyn et al., 1993; Lee y Chen, 1994) en el sentido de la capacidad de inducir una respuesta inmune a nivel de mucosas, empleando un adyuvante de mucosa. Sin embargo, estos estudios emplearon antígenos y adyuvantes diversos y no fueron enfocados a la inducción de una respuesta anti-adhesiva. Por otro lado, nuestra estrategia demuestra ventajas sobre otros ensayos de inmunización. Por ejemplo, cerdos inmunizados oralmente con muramil dipéptidos como adyuvantes no exhibieron protección contra la infección. Aún más, cuando los animales inmunizados fueron retados con la bacteria, éstos desarrollaron la enfermedad de una forma más severa que los animales no vacunados (Fox et al., 1993). El modelo de ratón empleado en el presente estudio, es ampliamente aceptado para los ensayos de los mecanismos de adhesión de distintas bacterias, incluyendo *H. pylori* (Cellini et al., 1994; Lee et al., 1997).

Trabajos anteriores han demostrado que la inmunización entérica con un antígeno bacteriano puede ser efectivamente eficientada mediante el acoplamiento del antígeno a la subunidad  $\beta$  de la toxina del cólera (CTB). Por ejemplo los antígenos I/II de *S. mutans* administrados a ratones en conjunto con la CTB, indujeron un incremento significativo en la respuesta inmune (Czerkinsky et al., 1989; Katz et al., 1993; Toida et al., 1997).

En nuestro estudio, la administración oral de las HSBPs solas no demostró inducir una respuesta inmune significativa. Por otro lado, el empleo de distintos adyuvantes y agentes acarreadores resultó en un incremento en la respuesta inmune observada. De todos ellos el empleo de la CTB covalentemente acoplada a las HSBPs indujo la mayor respuesta inmune en comparación con el resto de los grupos estudiados.

Esta respuesta está caracterizada por la presencia de una respuesta inmune sistémica de IgG en el torrente sanguíneo de los ratones inmunizados, así como por el incremento en las células productoras de anticuerpo (APC) del isotipo IgA en el epitelio

gastrointestinal del roedor. Esta última respuesta es la más relevante para nuestro objetivo, dado que las propiedades de la IgA la hacen capaz de resistir el ambiente gastrointestinal y adherirse a los antígenos.

Aún más, con la presencia de IgA en las secreciones biliares surge la posibilidad del recubrimiento de células de *H. pylori* al pasar al tracto intestinal, que puede prevenir que la bacteria se adhiera a la mucosa. Finalmente, la presencia de IgG asociada al establecimiento de memoria inmunológica, permite el desarrollo de habilidad de una respuesta inmune secundaria contra infecciones futuras por *H. pylori*.

Contra cualquier infección patológica, una protección efectiva es resultado de la respuesta inmune. Sin embargo, Engstrand (1995) y Goodwin (1993) demostraron que la presencia de anticuerpos anti-*H. pylori* (principalmente IgG sistémica) no es suficiente para erradicar o prevenir la enfermedad (Engstrand, 1995; Goodwin, 1993). Otros autores han observado distintas respuestas reportadas como inmunidad nociva que se traducen en alteraciones de la integridad de la mucosa (Cellini et al., 1994; Pappo et al., 1995). En nuestro estudio, se logró obtener una protección efectiva contra la adhesión de *H. pylori* en ausencia de daños epiteliales. La elevada proporción de animales inmunizados que no fueron infectados por la bacteria en su tracto gastrointestinal (~90%), indica la prevención exitosa de la adhesión bacteriana al tracto gastrointestinal del modelo animal empleado.

## CONCLUSIONES.

- *Helicobacter pylori* produce diversas proteínas con afinidad por el proteoglicano sulfato de heparina (HSBPs).
- Entre estas proteínas, dos presumiblemente extracelulares (71.5 y 66.2 kDa) con afinidad por el proteoglicano sulfato de heparina (HSBPs), fueron evidenciadas mediante los análisis electroforéticos y de transferencia. Una tercera HSBP, con una masa molecular de 47.2 kDa, fue encontrada en mayor proporción en la fracción de la membrana externa (HSBP-OMP).
- La administración oral de las tres HSBPs mencionadas en el punto anterior covalentemente conjugadas con la CTB a ratones BALB/c, incrementó significativamente la respuesta inmune tanto local, como sistémica.
- La respuesta se caracterizó por la presencia de anticuerpos IgA en la secreción intestinal y extractos biliares, y por un incremento en el número de células productoras de anticuerpo (APC) en la mucosa intestinal. Así mismo, se detectó una respuesta inmune sistémica con la presencia de anticuerpos séricos IgG que reconocían las HSBPs.
- La respuesta inmunológica inducida por la administración oral del inmunógeno, no presentó efectos adversos evidentes en la integridad de la mucosa gastrointestinal, como se ha reportado para otros protocolos de inmunización estudiados.
- La administración oral del conjugado HSBP-CTB demostró efectividad en la prevención de la adhesión de *H. pylori* a ratones BALB/c, con una reducción en la presencia de la bacteria de un 90% a un 10%, comparado con animales no vacunados.
- HSBP-CTB se propone como un candidato para la prevención de la adhesión de *H. pylori* al epitelio gástrico, como una posible estrategia para prevenir enfermedades infecciosas gastrointestinales asociadas a *Helicobacter pylori*.

## BIBLIOGRAFIA.

1. **Ala'aldeen D. A. A., Stevenson P., Griffiths E., Gorringer A. R., Irons L. I., Robinson A., Hyde S., y Borriello S. P.** 1994. Immune responses in humans and animals to meningococcal transferrin-binding proteins: Implications for vaccine design. *Infect. Immun.* **62**: 2984-2990.
2. **Ansorg R., Von Recklinghausen G., Pomarius R., y Schmid E. N.** 1991. Evaluation of techniques for isolation, subcultivation, and preservation of *H. pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 51-53.
3. **Archer J. R., Romero S., Ritchie A. E., et al.** 1988. Characterization of an unclassified microaerophilic bacterium associated with gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* **26**:101-105.
4. **Ascencio F., Fransson L. A., y Wadström T.** 1993. Affinity of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* for the N-sulphated glycosaminoglycan heparan sulfate. *J. Med. Microbiol.* **38**: 240-244.
5. **Ascencio F., Hansson H., Larm O., Wadström T.** 1995. *Helicobacter pylori* interacts with heparin and heparin-dependent growth factors. *FEMS.* **558**: 1-8.
6. **Baxter A., Campbell C. J., Cox D. M., Grinham C. J., y Pendlebury J. E.** 1989. Proteolytic activities of human *Campylobacter pylori* and ferret gastric campylobacter-like organism. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1**: 1-7.
7. **Beckwith C. S., Franklin C. L., Hook R. R., Besch-Williford C. L., y Riley L. K.** 1997. Fecal PCR assay for diagnosis of *Helicobacter* infection in laboratory rodents. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1620-1623.
8. **Best L. M., Veldhuyzen van Zanten S. J. O., Sherman P. M., y Bezanson G. S.** 1994. Serological detection of *Helicobacter pylori* antibodies in children and their parents. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1193-1196.
9. **Blaser M. J.** 1990. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J. Infect. Dis.* **161**: 626-633.
10. **Blaser M. J.** 1992. Hypotheses on the pathogenesis of natural history of *Helicobacter pylori*- induced inflammation. *Gastroenterology.* **102**: 720-727.
11. **Blaser M. J., Perez-Perez G.I., Kleanthous H., Cover T. L., Peek R. M., Chyou P. H., Stemmermann G. N., y Nomura A.** 1995. Infection with *H. pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* **55**: 2111-2115.
12. **Bliss C. M., Golenbock D. T., Keates S., Linevsky J. K., y Kelly C. P.** 1998. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes. *Infect. Immun.* **66**: 5357-5363.
13. **Blumberg E. A., Hatcher V. B., y Lowy F. D.** 1988. Acidic fibroblast growth factor modulates *Staphylococcus aureus* adherence to human endothelial cells. *Infect. Immun.* **56**: 1470-1474.
14. **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.* **262**: 1892-1895.
15. **Borén T. S., Normark S., y Falk P.** 1994. *Helicobacter pylori*: molecular basis for host-recognition and bacterial adherence. *Trends. Microbiol.* **2**: 221-228.
16. **Buck G. E.** 1990. *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 1-12.
17. **Cellini L., Allocati N., Angelucci D., Iezzi T., Di-Campli E., Marzio L., y Dainelli B.** 1994. Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable *in vitro* reverts in mice. *Microbiol. Immunol.* **38**: 843-850.
18. **Censini S., et al.** 1996. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type1-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 14648-14653.
19. **Chen T., Chang F., y Lee S.** 1997. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Comparison and correlation between enzyme-linked immunosorbent assay and rapid serological test results. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 184-186.
20. **Chmiela M., Lawnik M., Czkwianianc E., Rechcinski T., Planeta-Malecka I., Wadström T., y Rudnicka W.** 1997. Attachment of *Helicobacter pylori* strains to human epithelial cells. *J. Phis. Pharmacol.* **48**: 393-404.
21. **Chmiela M., Paziak-Domanska B., Ljungh A., Wadström T., y Rudnicka W.** 1996. The proliferation of human T lymphocytes stimulated by *H. pylori* antigens. *Immunobiol.* **195**: 199-208.
22. **Chong S. K. F., Lou Q., Fitzgerald J. F., y Lee C.** 1996. Evaluation of 16S rRNA gene PCR with primers Hp1 and Hp2 for detection of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2728-2730.
23. **Ciborowski P., Flock J.-I., y Wadström T.** 1992. Immunological response to a *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein. *J. Med. Microbiol.* **37**:376-381.

24. Clayton C.L., Kleanthous H., Coates P. J., Morgan D.D., y Tabaqchali S. 1992. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 192-200.
25. Clyne M., y Drumm B. 1993. Adherence of *Helicobacter pylori* to primary human gastrointestinal cells. *Infect. Immun.* **61**: 4051-4057.
26. Collins C. M., y D'Orazio S. E. F. 1993. Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **9**: 907-913.
27. Crowe S. E., Alvarez L., Dytoc M., Hunt R. H., Muller M., Sherman P., Patel J., Jin Y., y Ernst P. B. 1995. *Gastroenterol.* **108**: 65-74.
28. Czerkinsky C., Russell M. W., Lycke N., Lindblad M., y Holmgren J. 1989. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin  $\beta$  subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect. Immun.* **57**: 1072-1077.
29. Czinn, S.J., y Nedrud J.G. 1991. Oral immunization against *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **59**: 2359-2363.
30. De Bernard M., Arico B., Papini E., Rizzuto R., Grandi G., Rappuoli R., y Montecucco C. 1997. *Helicobacter pylori* toxin VacA induces vacuole formation by acting in the cell cytosol. *Mol. Microbiol.* **26**: 665-674.
31. Derclaye I., Delor I., Van Bouchaute M., Moureau P., Wauters G., y Cornelis G. R. 1989. Identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* by gel electrophoresis of the outer membrane proteins. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1072-1076.
32. Desai U. R., Wang H-M., Ampofo S. A., y Linhardt R. J. 1993. Oligosaccharide composition of heparin and low-molecular-weight heparins by capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* **213**: 120-127.
33. Doig P., Austin J. W., Kostrzynska M., y Trust T. J. 1992. Production of a conserved adhesin by the human gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **174**: 2539-2547.
34. Doig P., y Trust T. J. 1994. Identification of surface-exposed outer membrane antigens of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **62**: 4526-4533.
35. Dubois A. 1995. Spiral bacteria in the human stomach: The gastric *Helicobacters*. *Emerging Infectious Diseases* **3**: 79-83
36. Dytoc M., Gold M., Louie M., Huesca M., Fedorko L., Crowe S., Lingwood C., Brunton J., y Sherman P. 1993. Comparison of *Helicobacter pylori* and attaching-effacing *Escherichia coli* adhesion to eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **61**: 448-456.
37. Eaton K. A., Brooks C. L., Morgan D. R., y Krakowka S. 1981. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *H. pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* **59**: 2470-2475.
38. Eaton K. A., y Krakowka S. 1994. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **62**: 3604-3607.
39. Eaton K. A., Morgan D. L., y Krakowka S. 1989. *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* **57**: 1119-1125.
40. Engstrand L. 1995. Animal Models of *Helicobacter* Infection in Immunological and Vaccine Research. Department of Clinical Microbiol., Uppsala, Sweden.
41. Evans D. G., Evans D. J. Jr., y Graham D. Y. 1989. Receptor-mediated adherence of *Campylobacter pylori* to mouse Y-1 adrenal cell monolayers. *Infect. Immun.* **57**: 2272-2278.
42. Evans D. J., Evans D. G., Engstrand L., y Graham D. Y. 1992. Urease-associated heat shock protein of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **60**: 2125-2127.
43. Fasano A. 1996. Cellular microbiology: How enteric pathogens socialize with their intestinal host. *ASM News.* **63**: 259-265.
44. Feldman M. 1991. *Helicobacter pylori* and the etiology of duodenal ulcer: Necessary but not sufficient. *Am. J. Med.* **91**: 563-565.
45. Ferguson D. A., Li Ch., Patel N. R., Mayberry W. R., Chi D. S., y Thomas E. 1993. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2802-2804.
46. Ferrero R. L., Kansau I. N., y Labigne A. 1997. Virulence factors produced by *H. pylori*. IN: The immunobiology of *H. pylori*. From pathogenesis to prevention. P. B. Ernst, P. Michetti, and P. D. Smith eds. Lippincott-Raven publishers. pp. 29-45.
47. Forrest B. D., 1992. Indirect measurement of intestinal immune responses to an orally administered attenuated bacterial vaccine. *Infect. Immun.* **60**: 2023-2029.
48. Forsyth M. H., Atherton J. C., Blaser M. J., y Cover T. L. 1998. Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect. Immun.* **66**: 3088-3094.

49. Fox J. G., Blanco M., Murphy J. C., Taylor N. S., Lee A., Kabok Z., y Pappo J. 1993. Local and systemic immune responses in murine *Helicobacter felis* active chronic gastritis. *Infect. Immun.* **61**: 2309-2315.
50. Frevert U., Sinnis P., Cerami C., Shreffler W., Takacs B., y Nussenzweig V. 1993. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J. Exp. Med.* **177**: 1287-1298.
51. Furuta T., Kaneko E., Suzuki M., Arai H., y Futami H. 1996. Quantitative study of *Helicobacter pylori* in gastric mucus by competitive PCR using synthetic DNA fragments. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2421-2425.
52. Ghiara P., Marchetti M., Blaser M. J., Tummuru M. K. R., Cover T.L., Segal E.D., Tompkins L. S., y Rappuoli R. 1995. Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in a mouse model of disease. **63**: 4154-4160.
53. Goodwin C. S. 1993. The possibility of a vaccine against *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Gastroenterol. & Hepatology (Editorial)*. **5**: 9-12.
54. Granberg C., Mansikka A., Lehtonen O., Kukari H., Grönfors R., Nurmi H., Rähä I., Stahlberg M.-R., y Leino R. 1993. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by using pyloriset EIA-G and EIA-A for detection of serum immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1450-1453.
55. Granström M., Tindberg Y., y Blennow M. 1997. Seroepidemiology of *H. pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 468-470.
56. Gregoriadis G. 1994. Liposomes as immunoadjuvants and vaccine carriers: Antigen entrapment. *Immunomethods*. **4**: 210-216.
57. Guruge J. L., Schalen C., Nilsson I., Ljungh A., Tyszkiewicz T., Wikander M., y Wadström T. 1990. Detection of antibodies to *H. pylori* cell surface antigens. *Scand. J. Infect. Dis.* **22**: 457-465.
58. Guzman C. A., Molinari G., Fountain M. W., Rohde M., Timmis K. N., Walker M. J. 1993. Antibody responses in the serum and respiratory tract of mice following oral vaccination with liposomes coated with filamentous hemagglutinin and Pertussis toxoid. *Infect. Immun.* **61**: 573-579.
59. Guzman-Murillo, M.A. 1997. Efecto de polisacáridos sulfatados de microalgas en adhesión de bacterias patógenas a líneas celulares humanas y de peces. MSc. Thesis. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California Sur México. 86p.
60. Hammar M., Tyszkiewicz T., Wadström T., y O'Toole P.W. 1992. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 54-58.
61. Hazell S. L., Lee A., Brady L., y Hennessy W. 1986. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intracellular spaces and adaption to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J. Infect. Dis.* **153**: 658-663.
62. Hazell S. L., Markesich D. C., Evans D. J., Evans D. G., Graham D. Y. 1989. Influence of media supplements on growth and survival of *C. pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**: 597-602.
63. Henriksen T. H., Brorson O., Schøyen R., Thoresen T., y Lia A. 1997. A simple method for determining metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1424-1426.
64. Holmgren J. 1991. Mucosal immunity and vaccination. *FEMS Microbiol. Immun.* **89**: 1-10.
65. Hone D., y Hackett D. 1989. Vaccination against enteric bacterial diseases. *Review Infect. Dis.* **11**: 853-877.
66. Jackson R. J., Fukihashi K., Xu-Amano J., Kiyono H., Elson C. O. y McGhee J. R. 1993. Optimizing oral vaccines: Induction of systemic and mucosal B-cell antibody responses to tetanus toxoid by use of cholera toxin as an adjuvant. *Infect. Immun.* **61**: 4272-4279.
67. Jaguszyn-Krynicka E. K., Clark-Curtiss J. E., y Curtiss III R. 1993. *Escherichia coli* heat-labile toxin subunit B fusions with *Streptococcus sobrinus* antigens expressed by *Salmonella typhimurium* oral vaccine strains: Importance of the linker for antigenicity and biological activities of the hybrid proteins. *Infect. Immun.* **61**: 1004-1015.
68. Jones D. H., McBride B. W., Thornton C., O'Hagan D. T., Robinson A., y Farrar G. H. 1996. Orally administered microencapsulated *Bordetella pertussis* fimbriae protect mice from *B. pertussis* respiratory infections. *Infect. Immun.* **64**: 489-494.
69. Kamisago S., Iwamori M., Tai T., Mitamura K., Yazaki Y., y Sugano K. 1996. Role of sulfatides in adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric cancer cells. *Infect. Immun.* **64**: 624-628.

70. Karavar S., Karch H., Frosch M., Burghardt W., y Gross U. 1997. Use of serum-specific immunoglobulins A and G for detection of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic gastritis by immunoblot analysis. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 3058-3061.
71. Katz J., Harmon C. C., Buckner G. P., Richardson G. J., Rusell M. W., y Michalek S. M. 1993. Protective salivary immunoglobulin A responses against *Streptococcus mutans* infection after intranasal immunization with *S. mutans* antigen I/II coupled to the B subunit of cholera toxin. *Infect. Immun.* **61**: 1964-1971.
72. Knipp U., Birkholz S., Kaup W., y Opferkuch W. 1993. Immune suppressive effects of *Helicobacter pylori* on human peripheral blood mononuclear cells. *Med. Microbiol. Immunol.* **182**: 63-76.
73. Kobayashi Y., Okazaki K., y Murakami K. 1993. Adhesion of *H. pylori* to gastric epithelial cells in primary cultures obtained from stomachs of various animals. *Infect. Immun.* **61**: 4058-4063.
74. Kukkonen M., Raunio T., Virkola R., Lähteenmäki K., Mäkelä P. H., Kleem P., Ciegg S., y Korhonen T. K. 1993. Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type I fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin. *Mol. Microbiol.* **7**: 229-237.
75. Labigne A., Cussac V., y Courcoux P. 1991. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J. Bacteriol.* **173**: 1920-1931.
76. Lamm M. E. 1997. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**: 311-340.
77. Langenberg W., Rauws E. A. J., Widjojokusumo A., Tytgat G. N. J., y Zanen H. C. 1986. Identification of *Campylobacter pyloridis* isolates by restriction endonuclease DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* **24**: 414-417.
78. Lee A. 1994. Future research in peptic ulcer disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **29** Suppl 205: 51-58.
79. Lee A. y Chen M. 1994. Successful immunization against gastric infection with *Helicobacter* species: Use of a cholera toxin  $\beta$ -subunit-whole-cell vaccine. *Infect. Immun.* **62**: 3594-3597.
80. Lee A., Fox J., y Hazell S. 1993. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: A perspective (minireview). *Infect. Immun.* **61**: 1601-1610.
81. Lee A., y Hazell S. L. 1988. *Campylobacter pylori* in health and disease: An ecological perspective. *Micro. Ecol. Health Dis.* **1**: 1-16.
82. Lee A., O'Rourke J., de Ungria M. C., Robertson B., Daskalopoulos G., y Dixon M. F. 1997. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection-introducing the Sydney strain. *Gastroenterology.* **112**: 1386-1397.
83. Lelwala-Guruge J., Ljungh A., y Wadström T. 1992. Hemagglutination patterns of *H. pylori*: frequency of sialic acid-specific and non-sialic acid-specific haemagglutinins. *APMIS*; **100**: 908-913.
84. Liang O. D., Flock J-I., y Wadström T. 1994. Evidence that the heparin-binding consensus sequence of vitronectin is recognized by *Staphylococcus aureus*. **116**: 457-463.
85. Lindahl U., Lidholt K., Spillmann D., y Kjellén L. 1994. More to "heparin" than anticoagulation. *Thrombosis Res.* **75**: 1-32.
86. Lingwood C. A., Law H., Pellizzari A., Sherman P., Drumm B. 1989. Gastric glycerolipid as a receptor for *Campylobacter pylori*. *Lancet*: 238-241.
87. Lingwood C. A., Wasty G., Han H., y Huesca M. 1993. Receptor affinity purification of a lipid-binding adhesin from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **61**: 2474-2478.
88. Livingston R. S., Riley L. K., Steffen E. K., Besch-Williford C. L., Hook R. R., y Franklin C. L. 1997. Serodiagnosis of *Helicobacter hepaticus* infection in mice by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1236-1238.
89. Ljungh Å., Moran A. P., y Wadström T. 1996. Interactions of bacterial adhesins with extracellular matrix and plasma proteins: pathogenic implications and therapeutic possibilities. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **16**: 117-126.
90. Lopez-Carrillo L., Fernandez-Ortega C., Robles-Diaz G., Rascon-Pacheco R. A., Ramirez-Iglesias T. 1997. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in México. A challenge for prevention and population control. *Rev. Gastroenterol. Mex.* **62**: 22-28.
91. López-Vidal Y., Rangel-Frausto M. S., y Calva J. J. 1998. Resistencia a antimicrobianos de *Helicobacter pylori* en un centro de referencia infectológico. *Rev. Invest. Clin.* **50**: 19-24.
92. Love C., Esko J. D., y Mosser D. M. 1993. Heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. *J. Cell. Bio.* **123**: 759-766.

93. **Luzza F., Oderda G., Maletta M., Imeneo M., Mesuraca L., Chioboli E., Lerro P., Guandalini S., y Pallone F.** 1997. Salivary immunoglobulin G assay to diagnose *Helicobacter pylori* infection in children. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 3358-3360.
94. **Mai U. E. H., Perez-Perez G. I., Allen J. B., Wahl S. M., Blaser M. J., y Smith P. D.,** 1992. Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. *J. Experimental Medicine.* **175**: 517-525.
95. **Mamo W., Jonsson P., Flock J.-I., Lindberg M., Müller H.-P., Wadström T., y Nelson L.** 1994. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with *S. aureus*. *Vaccine.* **12**: 988-992.
96. **Manetti R., Massari P., Burrone D., De Bernard M., Marchini A., Olivieri R., Papini E., Montecucco C., Rappuoli R., y Telford J. L.** 1995. *Helicobacter pylori* cytotoxin: Importance of native conformation for induction of neutralizing antibodies. **63**: 4476-4480.
97. **Marchildon P. A., Ciota L. M., Zamaniyan F. Z., Peacock J. S., y Graham D. Y.** 1996. Evaluation of three commercial enzyme immunoassays compared with the <sup>13</sup>C urea breath test for detection of *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1147-1152.
98. **Marshall B. J.** 1995. The *Helicobacter* foundation web site. [www.helico.com](http://www.helico.com).
99. **Marshall B. J., y Warren J. R.** 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* **I**: 1311-1314.
100. **McClure M. O., Moore J. P., Blanc D. F., Scotting P., Cook G. M. W., Keynes R. J., Weber J. N., Davies D., y Weiss R. A.** 1992. Investigations into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV infection in vitro. *AIDS Res. Human Retroviruses.* **8**: 19-26.
101. **McQueen C. E., Boedeker E. C., Le M., Hamada Y., y Brown W. R.** 1992. Mucosal immune response to RDEC-1 infection: Study of lamina propria antibody-producing cells and biliary antibody. *Infect. Immun.* **60**: 206-212.
102. **Meijer B. C., Thijs J. C., Kleibeuker J. H., Van Zwet A. A., y Berrelkamp R. J. P.** 1997. Evaluation of eight enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin G against *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 292-294.
103. **Michetti P., Mahan M. J., Slauch J. M., Mecalanos J. J., y Neutra M. R.** 1992. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **60**: 1786-1792.
104. **Millar M. R., y Pike J.** 1992. Bactericidal activity of antimicrobial agents against slowly growing *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **36**: 185-187.
105. **Mizote T., Yoshiyama H., y Nakazawa T.** 1997. Urease-independent chemotactic response of *Helicobacter pylori* to urea, urease inhibitors, and sodium bicarbonate. *Infect. Immun.* **65**: 1519-1521.
106. **Monath T. P., Lee C. K., Ermak T. H., Myers G. A., Weltzin R. A., Giannasca P. J., Thomas W. D., Soman G., Bhagat H., Ackerman S. A., y Kleanthous H. K.** 1998. The search for vaccines against *Helicobacter pylori*. *Infect. Med.* **8**: 534-546.
107. **Monteiro L., Cabrita J., y Mégraud F.** 1997. Evaluation of performances of three DNA enzyme immunoassays for detection of *Helicobacter pylori* PCR products from biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2931-2936.
108. **Muñoz A.** 1995. La úlcera péptica: Estrés o infección?. *Gastroenterología.* **32**: 6-13.
109. **NIH Consensus Development Conference Statement.** 1994. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease-interim draft statement. NIH Consensus Statement Online 1994 Jan 7-9.
110. **Neiger R., Dieterich C., Burnens A., Waldvogel A., Corthésy-Theulaz I., Halter F., Lauterburg B., y Schmassmann A.** 1998. Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 634-637.
111. **Nguyen T., Brunson D., Crespi J.** 1992. DNA damage and mutations in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 3030-3039.
112. **Nilsson I., Ljungh A., Aleijung P., y Wadström T.** 1997. Immunoblot assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 427-432.
113. **Noel G. J., Love D. C., y Mosser D. M.** 1994. High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate bacterial adhesion to cellular proteoglycans. *Infect. Immun.* **62**: 4028-4033.
114. **Oksala O., Salo T., Tammi R., Häkkinen L., Jalkanen M., Inki P., y Larjava H.** 1995. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J. Histochem. Cytochem.* **43**: 125-135.

115. Oksanen A., Veijola L., Sipponen P., Schauman K., y Rautelin H. 1998. Evaluation of pyloriset screen, a rapid whole blood diagnostic test for *H. pylori* infection. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 955-957.
116. Olivieri R., Bugnoli M., Armellini D., Blanciardi S., Rappuoli R., Bayeli P. F., Abate L., Esposito E., De Gregorio L., Aziz J., Basagni C., y Figura N. 1993. Growth of *Helicobacter pylori* in media containing cyclodextrins. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 160-162.
117. Orr N., Robin G., Lowell G., y Cohen D. 1992. Presence of specific immunoglobulin A-secreting cells in peripheral blood after natural infection with *Shigella sonnei*. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2165-2168.
118. Osaki T., Taguchi H., Yamaguchi H., y Kamiya S. 1998. Detection of *Helicobacter pylori* in fecal samples of gnotobiotic mice infected with *H. pylori* by an immunomagnetic-bead separation technique. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 321-323.
119. O'Toole P. W., Janzon L., Doig P., Huang I., Kostrzynska M., y Trust T. J. 1995. The putative neuraminylactose-binding hemagglutinin HpA of *Helicobacter pylori* CCUG 17874 is a lipoprotein. *Infect. Immun.* **59**: 6049-6057.
120. Owen R. J., Bickley J., Hurtado A., Fraser A., y Pounder R. E. 1994. Comparison of PCR-based restriction length polymorphism analysis of urease genes with rRNA gene profiling for monitoring *Helicobacter pylori* infections in patients on triple therapy. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1203-1210.
121. Pappo J., W. D. Thomas, Jr., Z. Kabok, N. S. Taylor, J. C. Murphy, y J. G. Fox. 1995. Effect of oral immunization with recombinant urease on murine *Helicobacter felis* gastritis. *Infect. Immun.* **63**: 1246-1252.
122. Peterson W. L., 1991. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *New Eng. J. Medicine.* **324**: 1043-1048.
123. Phadis S. H., Ilver D., Janzon L., Normark S., y Westblom T. U. 1994. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **62**: 1557-1565.
124. Piccolomini R., Di Bonaventura G., Catamo G., Carbone F., y Neri M. 1997. Comparative evaluation of the E test, agar dilution, and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobial agents. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1842-1846.
125. Piotrowski J., Slomiany A., Murty V. L. N., Fekete Z., y Slomiany B. L. 1991. Inhibition of *Helicobacter pylori* colonization by sulfated gastric mucin. *Biochemistry International.* **24**: 749-756.
126. Quiding M., Nordström I., Kilander A., Andersson G., Hanson L., Holmgren J., y Czerkinsky C. 1991. Intestinal immune responses in humans. *J. Clin. Invest.* **88**: 143-148.
127. Ringnér M., Paulsson M., y Wadström T. 1992. Vitronectin binding by *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Immun.* **00**: 1-6.
128. Rozalska B., y Wadström T. 1994. Role of antibodies against fibronectin-, collagen-binding proteins and alphatoxin in experimental *Staphylococcus aureus* peritonitis and septicaemia in neutropenic mice. *Zbl. Bakt.* **281**: 495-501.
129. Saitoh T., Sugano K., Natomi H., Zhao W., Ocuzumi K., Iwamori M., y Yazaki Y. 1992. Glycosphingolipid receptors in human gastric mucosa for *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **4**: S49-S53.
130. Sharma S. A., Tummuru M. R., Miller G. G., y Blaser M. J. 1995. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect. Immun.* **63**: 1681-1687.
131. Simor A. E., Shames B., Drumm B., Sherman P., Low D. E., y Penner J. L. 1990. Typing of *Campylobacter pylori* by bacterial DNA restriction endonuclease analysis and determination of plasmid profile. *J. Clin. Microbiol.* **28**
132. Slomiany B. L., Bilski J., Sarosiek J., Murty V. L. N., Dworkin B., VanHorn K., Zielenski J., y Slomiany A. 1987. *Campylobacter pyloridis* degrades mucin and undermines gastric mucosal integrity. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1**: 307-314.
133. Slomiany B. L., Piotrowski J., Samanta A., Vanhorn K., Murty V. L. N., y Slomiany A. 1989. *Campylobacter pylori* colonization factor shows specificity for lactosylceramide sulfate and GM<sub>3</sub> ganglioside. *Biochem Int.* **19**: 929-936.
134. Smith A. W., Chahal B., y French G. L. 1994. The human gastric pathogen *H. pylori* has a gene encoding an enzyme first classified as a mucinase in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **13**: 153-160.
135. Smoot D. T., Resau J. H., Naab T., Desbordes B. C., Gilliam T., Bull-Henry K., Curry S. B., Nidiry J., Sewchand N. J., Mills-Robertson K., Frontin K., Abebe E., Dillon M., Chippendale G. R., Phelps P. C., Scott V. F., y Mobley H. L. T. 1993. Adherence of *Helicobacter pylori* to cultured human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* **61**: 350-355.

136. **Solnick J. V., O'Rourke J., Lee A., Tompkins L. S.** 1993. Molecular analysis of urease genes from a newly identified uncultured species of *Helicobacter*. *J. Infect. Dis.* **168**:379-83.
137. **Sommer F., Faller G., Konturek P., Kirchner T., Hahn E. G., Zeus J., Röllinghoff M., y Lohoff M.** 1998. Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4<sup>+</sup> lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. *Infect. Immun.* **66**: 5543-5546.
138. **Strobel S., Bereswill S., Balig P., Allgaier P., Sonntag H., y Kist M.** 1998. Identification and analysis of a new *vacA* genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient groups in Germany. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1285-1289.
139. **Sun J., Rask C., Olsson T., Holmgren J., y Czerkinsky C.** 1996. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by feeding myelin basic protein conjugated to cholera toxin B subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 7196-7201.
140. **Taylor D. N., y Blaser M. J.** 1991. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiologic Reviews.* **13**: 42-59.
141. **Toida N., Hajishengallis G., Wu H., y Russell M. W.** 1997. Oral immunization with the saliva-binding region of *Streptococcus mutans* AgI/II genetically coupled to the cholera toxin B subunit elicits T-helper-cell responses in gut-associated lymphoid tissues. *Infect. Immun.* **65**: 909-915.
142. **Tomb J. F., White O., Kervage A. R., Clayton R. A., Sutton G. G., Fleischmann R. D., Ketchum K. A., Klenk H. P., et al.** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* **388**: 539-547.
143. **Torres J., Leal-Herrera Y., Perez-Perez G., Gomez A., Camorlinga-Ponce M., Cedillo-Rivera R., Tappya-Conyer R., y Muñoz O.** 1998. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J. Infect. Dis.* **4**: 1089-1094.
144. **Tummuru M. K. R., Sharma S. A., y Blaser M. J.** 1995. *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **18**: 867-876.
145. **Trust T. J., Doig P., Emödy L., Kienle Z., Wadström T., y O'Toole P.** 1991. High-affinity binding of the basement membrane proteins collagen type IV and laminin to the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **59**: 4398-4404.
146. **Tsuda M., Karita M., Morshed M. G., Okita K., y Nakazawa T.** 1994. A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect. Immun.* **62**: 3586-3589.
147. **Utt M. y Wadström T.** 1997. Identification of heparan sulphate binding surface proteins of *Helicobacter pylori*: inhibition of heparan sulphate binding with sulphated carbohydrate polymers. *J. Med. Microbiol.* **46**: 541-546.
148. **Valentine J. L., Arthur R. R., Mobley H. L. T., y Dick J. D.** 1991. Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 689-695.
149. **Valkonen K. H., Ringnér M., Ljungh Å., y Wadström T.** 1993. High-affinity binding of laminin by *Helicobacter pylori*: Evidence for a lectin-like interaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **7**: 29-38.
150. **Valkonen K. H., Wadström T., y Moran A. P.** 1994. Interaction of lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* with basement membrane protein laminin. *Infect. Immun.* **62**: 3640-3648.
151. **Van der Ende A., Pan Z.-J., Bart A., Van der Hulst R. W. M., Feller M., Xiao S.-D., Tytgat G. N. J., y Dankert J.** 1998. *CagA*-positive *Helicobacter pylori* populations in China and The Netherlands are distinct. *Infect. Immun.* **66**: 1822-1826.
152. **Van Doorn L., Figueiredo C., Sanna R., Pena S., Midolo P., Ng E. K. W., Atherton J. C., Blaser M. J., y Quint W. G. V.** 1998. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2597-2603.
153. **Walsh J. H., y Peterson W. L.** 1995. Drug therapy: The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. *N. Eng. J. Med.* **333**: 984-991.
154. **Wang G., Jiang Q., y Taylor D. E.** 1998. Genotypic characterization of clarithromycin-resistant and -susceptible *Helicobacter pylori* strains from the same patient demonstrates existence of two unrelated isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2730-2731.
155. **Weber D.M., Dimopoulos M. A., Anandu D. P., Pugh W. C., y Steinbach G.** 1994. Regression of gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue with antibiotic therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* **107**: 1835-1838.
156. **Westerlund B., y Korhoen T. K.** 1993. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* **9**: 687-694.