

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACION DE LA EXPRESION *IN VIVO* E  
*IN VITRO* DE LOS RECEPTORES TLR-4 Y -5  
DURANTE LA INFECCION POR *Helicobacter pylori*

Por

FRANCISCO JAVIER MORENO GUTIERREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación en

Microbiología Médica

JUNIO 2006

TM

Z6658

FM

2006

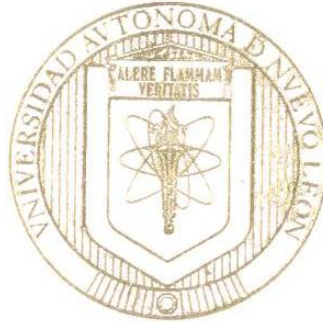
.M67



1020154545

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACION DE LA EXPRESION *IN VIVO* E  
*IN VITRO* DE LOS RECEPTORES TLR-4 Y -5  
DURANTE LA INFECCION POR *Helicobacter pylori*

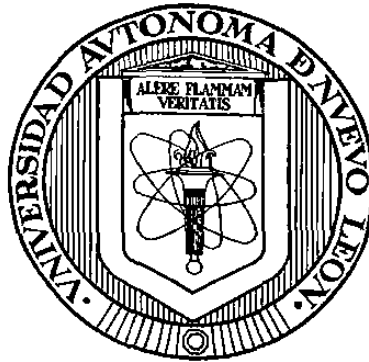
Por

FRANCISCO JAVIER MORENO GUTIERREZ  
Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación en  
Microbiología Médica

JUNIO 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN *IN VIVO* E *IN VITRO* DE LOS RECEPTORES

TLR-4 Y -5 DURANTE LA INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori*

Por

FRANCISCO JAVIER MORENO GUTIERREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación en

Microbiología Médica

JUNIO 2006

1022208



FONDO  
TESIS



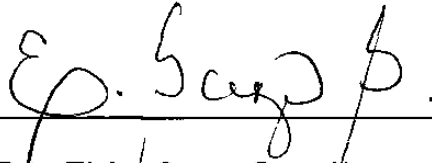
TM  
Z6658  
FM  
2006  
.M67

30-IV-07  
M200

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN *IN VIVO* E *IN VITRO* DE LOS RECEPTORES

TLR-4 Y -5 DURANTE LA INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori*

Aprobación de la tesis



---

Dra. Elvira Garza González

Director



---

Dr. Francisco J. Bosques Padilla

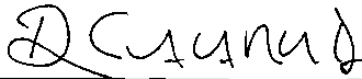
Co-director



---

Dr. Rolando Tijerina Menchaca

Co-director



---

Dr. Dionicio A. Galarza Delgado

Subdirector de estudios de posgrado

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Elvira Garza Director de mi tesis. Así como al Dr. Francisco Bosques y al Dr. Rolando Tijerina por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. y al Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio Gonzalez", por permitirme el uso de sus equipos y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio. Al Doctor Guillermo Pérez por su aportación en el estudio *in vitro* con la línea celular

A todo el personal del Departamento de Microbiología y del C.R.C.E.I., especialmente a Ivón, Sandra, Lucy, Alma, Susana, Juany, Nora, Sr. Francisco, Carlos y Angelitos.

A todo el personal del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario, en especial a Gerardo, Oralia, Janeth, al Dr. Giassi, Dr. Galván y al Dr. García



## DEDICATORIAS

A Dios por darme la oportunidad de vivir, aprender y de tener siempre la necesidad de buscar el poder ayudar al prójimo.

A mi Madre que con su ejemplo de sacrificio y humildad me ha enseñado que el éxito en la vida depende de uno mismo.

A mis hermanos, David y Josué, por su apoyo incondicional, sus consejos y su cariño.

A mis amigos, Ara, Lily, Magali, Katy, Elva, Magalita, Aleli, Juny, Carlos, Alan, Leo, Alain.

A Sandra Verónica y a la Dra. Gloria por sus consejos y amistad.

## Sitio de estudio

El presente trabajo se realizó en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina.

## Lista de tablas

	Páginas
Tabla 1A Resultados de los estudios endoscópicos e histológicos y clasificación final.	32
Tabla 1B Resultados de los estudios endoscópicos e histológicos y clasificación final.	33
Tabla 2 Distribución de la infección por <i>H. pylori</i> de acuerdo a los hallazgos endoscópicos-histológicos.	34
Tabla 3 Resultados de pruebas diagnósticas obtenidas en los pacientes incluidos en los ensayos <i>in vivo</i> .	35
Tabla 4 Distribución de la expresión <i>in vivo</i> de <i>TLR-4</i> y <i>-5</i> de acuerdo a la infección por <i>H. pylori</i> y la clasificación endoscópico-histológica.	36
Tabla 5 Distribución del genotipo de <i>H. pylori</i> , expresión de <i>TLR-4</i> y <i>-5 in vivo</i> y su correlación con los hallazgos endoscópicos-histológicos.	40
Tabla 6 Distribución del genotipo de <i>H. pylori</i> , expresión de <i>TLR-4</i> y <i>-5 in vitro</i> y su correlación con los hallazgos endoscópicos-histológicos.	41

## Lista de Figuras

		Página
Figura 1	Historia natural de la infección por <i>H. pylori</i> .	7
Figura 2	Estrategia general que se siguió para el cumplimiento de los objetivos trazados en esta tesis.	17
Figura 3	Hallazgos endoscópico-histológicos en los pacientes estudiados.	31
Figura 4	Ejemplo de productos amplificados de <i>TLR-4</i> por PCR y retrotranscripción a partir de ARN.	37
Figura 5	Ejemplo de productos amplificados de <i>TLR-5</i> por PCR y retrotranscripción a partir de ARN.	37
Figura 6	Ejemplo de la genotipificación de <i>vacA</i> .	38
Figura 7	Ejemplo de la genotipificación de <i>cagA</i>	39

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
<i>cagA</i>	Gen asociado a la citotoxina
cm	Centímetros
° C	Grados Celsius
DS	Desviación estandar
dNTP's	Desoxinucleótidos
EDTA	Etilendiaminotetracetato
g	Gravedades
h	Hora
IL	Interleucina
mg	Miligramos
min	Minutos
<i>rpm</i>	<i>Revoluciones por minuto</i>
ml	Mililitros
mM	Milimoles
mA	Miliamper
MIC	Metaplasia intestinal completa
nm	Nanómetros
ng	Nanogramos
p	Probabilidad
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de iones hidrógeno
PRU	Prueba rápida de ureasa
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	Ultravioleta
<i>vacA</i>	Citotoxina formadora de vacuolas

$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{m}$	Micrometros
$\mu\text{g}$	Microgramos

## Resumen

Francisco J. Moreno Gutiérrez

Fecha de graduación: 2006

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León

**Título de la investigación:** Determinación de la expresión *in vivo* e *in vitro* de los receptores TLR -4 y -5 durante la infección por *Helicobacter pylori*.

**Número de páginas:** Candidato a la Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Médica

**Área de estudio:** Microbiología Médica

**Propósito y Método de estudio:** *Helicobacter pylori* es una bacteria asociada a diferentes presentaciones gástricas. Para explicar la diversidad de éstas, se han estudiado algunos genes de virulencia, tales como *cagA* y *vacA*, además de factores del hospedero como variaciones genéticas en los receptores Toll-like.

En este estudio se determinó la expresión *in vivo* e *in vitro* de los receptores TLR -4 y -5 durante la infección por *Helicobacter pylori* y su relación con la virulencia de la cepa y las diversas presentaciones clínicas.

Para los estudios *in vivo*, se estudiaron 40 pacientes con síndrome dispéptico que fueron sometidos a una endoscopia. Se les determinó la infección por *H. pylori* y a las cepas recuperadas, se les determinó el genotipo de *cagA* y *vacA*. Finalmente se determinó la expresión de *TLR-4* y *-5* en las biopsias obtenidas.

Para los estudios *in vitro*, se incluyeron 24 cepas del cepario del CRECEI. Se determinó la expresión de *TLR-4* y *-5* luego de enfrentar los cultivos a las células AGS

**Conclusiones:** En este estudio se concluyó que los receptores *TLR-4* y *-5* se expresan en presencia y ausencia de *H. pylori*. No se encontró asociación entre la expresión de los receptores TLR -4 y -5 y el genotipo *cagA* y *vacA* de *H. pylori*, tanto en los estudios *in vivo* como en los estudios *in vitro*. Se encontró una mayor expresión del receptor *TLR-5* en pacientes con presentaciones clínicas severas relacionadas con la infección por *H. pylori*.

---

Dra. Elvira Garza González  
Director

---

Dr. Francisco Bosques Padilla

---

Dr. Rolando Tijerina Menchaca

1.	<b>INTRODUCCIÓN</b>	Página
1.1.	Antecedentes históricos	1
1.2.	Características de <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.3.	Transmisión de <i>H. pylori</i>	2
1.4.	Prevalencia de la infección por <i>H. pylori</i>	3
1.5	Patologías gástricas relacionadas con <i>H. pylori</i>	3
	1.5.1 Gastritis	3
	1.5.2 Enfermedad úlcero péptica	5
	1.5.3 Cáncer gástrico	5
1.6.	Historia natural de la infección por <i>H. pylori</i>	6
1.7.	Factores de <i>H. pylori</i> asociados a su supervivencia y/o virulencia	7
	1.7.1 Citotoxina CagA	8
	1.7.2 Citotoxina VacA	9
1.8.	Factores del hospedero asociados a la variación en la respuesta a la infección por <i>H. pylori</i>	9
	1.8.1 IL-1 beta	10
	1.8.2 Receptores TLR	10
1.9.	Justificación	12
2.	<b>OBJETIVOS</b>	13
2.1	Objetivo general	13
2.2	Objetivos específicos	13
3.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	15
3.1.	Estrategia general	15
3.2.	Criterios de inclusión	18
3.3.	Endoscopia gástrica superior	18
3.4.	Aislamiento de <i>H. pylori</i> mediante el cultivo de biopsias gástricas	19
3.5.	Prueba rápida de ureasa	20
3.6.	Análisis histológico	20



3.7.	Clasificación de los pacientes de estudio en infectados y no infectados	21
3.8.	Tamaño de la muestra	21
3.9.	Genotipificación del gen <i>cagA</i> y <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i>	21
	3.9.1 Extracción de ADN de cepas de <i>H. pylori</i>	21
	3.9.2 Amplificación del gen <i>cagA</i>	23
	3.9.3 Amplificación del gen <i>vacA</i>	23
3.10.	Expresión de <i>TLR-4</i> y <i>-5 in vivo</i>	24
	3.10.1 Extracción de ARN a partir de biopsias gástricas	24
	3.10.2 Cultivo celular	25
	3.10.3 Conservación de línea celular AGS	26
	3.10.4 Infección de <i>H. pylori in vitro</i>	27
	3.10.5 Extracción de ARN de cultivo celular	28
	3.10.6 Determinación de la expresión de los receptores TLR-4 y -5, mediante la técnica de retrotranscripción	28
	3.10.7 Detección de productos de PCR, documentación e interpretación del gel	29
3.11	Análisis estadístico	30
4.	<b>RESULTADOS</b>	31
4.1	Expresión de <i>TLR-4</i> y <i>-5 in vivo</i>	31
	4.1.1 Población estudiada	31
	4.1.2 Diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i>	34
	4.1.3 Distribución de la expresión de <i>TLR-4</i> y <i>-5 in vivo</i> de acuerdo a la infección por <i>H. pylori</i>	36
	4.1.4 Distribución del genotipo de <i>H. pylori</i> en las cepas aisladas, correlación con expresión <i>in vivo</i> de los receptores TLR-4 y -5	38
4.2	Expresión de <i>H. pylori</i> enfrentadas a células AGS <i>in vivo</i>	41
5	<b>DISCUSIÓN</b>	43
6	<b>CONCLUSIONES</b>	46
	<b>APENDICES</b>	47



# I INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes históricos

La primera vez que se describió la presencia de la bacteria *Helicobacter sp.*, en estómago de vertebrados fue hace más de un siglo en 1892 por el patólogo italiano Guilio Bizzozero, quien describió la presencia de bacterias en espiral, gram negativas, en estómago de perros (23).

Los médicos australianos Marshall y Warren llevaron a cabo por primera vez el aislamiento y cultivo de *Helicobacter* en 1982 a partir de muestras de mucosa gástrica de pacientes con úlcera y gastritis utilizando condiciones de cultivo de la bacteria *Campylobacter* (2).

Desde 1989, se le considera a *Helicobacter pylori*, como la especie tipo de un nuevo género llamado *Helicobacter*, en el que existen al menos otras 19 especies (33).

La implicación de *H. pylori* en la gastritis crónica activa y su asociación con la úlcera gastroduodenal, ha convertido a *H. pylori* en uno de los microorganismos de mayor interés en patología humana (2).

## 1.2 Características de *H. pylori*

*H. pylori* es un bacilo Gram negativo que presenta forma de espiral cuando se encuentra infectando la mucosa gástrica, con forma de bacilo curvo en cultivos artificiales y en cultivos viejos presenta formas cocoides. Tiene un tamaño de 2.5-5  $\mu\text{m}$  de largo por 0.5-1.0  $\mu\text{m}$  de ancho, posee de 4 a 6 flagelos unipolares y es microaerofílico. Para su cultivo *in*

*vitro*, necesita una atmósfera húmeda a 37° C, una concentración de CO<sub>2</sub> del 5 %, es ureasa, catalasa y oxidasa positivo (2, 26, 32).

El pH óptimo de crecimiento es alrededor de 7, este pH es favorecido por la producción de una enzima, la ureasa, la cual produce NH<sub>3</sub> a partir de la urea del jugo gástrico en el estómago, siendo el cambio del pH parte esencial para el establecimiento de la infección en el estómago por *H. pylori* (2).

Entre los factores de riesgo para la adquisición de la infección por la bacteria se encuentran un bajo nivel socioeconómico, el hacinamiento, la falta de agua potable y la edad.

Se ha reportado que la infección por *H. pylori* se adquiere en la infancia antes de los diez años (26).

### **1.3 Transmisión de *H. pylori***

La vía de transmisión más frecuente es la fecal–oral la cual es al parecer la más importante, debido a que se ha logrado aislar la bacteria en heces de niños pequeños, infectados con la bacteria. La contaminación de agua con heces también puede ser una fuente de infección.

La vía iatrogénica es la vía de transmisión menos común y se lleva a cabo cuando el endoscopio está en contacto con la mucosa gástrica de un paciente infectado y es utilizado en otro paciente no infectado con la bacteria, sin haberse desinfectado el equipo adecuadamente.

La tercera vía de transmisión descrita es la vía oral–oral, esta vía de transmisión ha sido descrita en mujeres africanas, que tienen como costumbre masticar la comida con la que después alimentan a sus infantes. Aunque *H. pylori* esta presente en estómago de casi la mitad de la población mundial, actualmente no se sabe con claridad cómo se lleva acabo la transmisión (2).

#### **1.4 Prevalencia de la infección por *H. pylori***

*H. pylori* coloniza el 50% de la población mundial adulta y se ha encontrado que la prevalencia de la infección por esta bacteria es diferente en las distintas poblaciones del mundo. En países en vías de desarrollo, se ha reportado una prevalencia de la infección del 70 al 90 % y en países desarrollados la prevalencia es del 25 al 50 % (2).

Se ha reportado que en la Ciudad de México la prevalencia de la infección es alrededor del 66 % y en el noreste de México se reportó una prevalencia de la infección por *H. pylori* de 67.8 % (37).

#### **1.5 Patologías gástricas relacionadas con *H. pylori***

Todos los pacientes infectados con *H. pylori* desarrollan una gastritis crónica, condición que es usualmente asintomática (2).

### 1.5.1 Gastritis

La infección por *H. pylori* representa la causa fundamental de la gastritis crónica (inespecífica, no autoinmune). Se ha estimado que aproximadamente la mitad de la población mundial presenta algún grado de inflamación gástrica asociada al microorganismo (5).

La clasificación de gastritis crónica más utilizada es la de clasificación histológica de Sydney, la cual se basa en tres parámetros: a) la etiología b) la cronología y topografía, afectación predominante de cuerpo, de antro o pangastritis y c) la morfología, que incluye cinco variables cuantificables, como inflamación, actividad, atrofia, metaplasia intestinal y densidad de *H. pylori*, así como otras no cuantificables (5). A partir de 1994, se ha adoptado la denominada clasificación de Sydney actualizada (Tabla 2), para la clasificación las diferentes patologías gástricas.

*H. pylori* es el agente causal de la gastritis crónica no autoinmune, pero al parecer otros factores ambientales contribuyen, puesto que en áreas con la misma prevalencia de infección se ha descrito una tasa de gastritis muy diferente, sobre todo atrófica multifocal (5).

El infiltrado neutrofílico, que da nombre a la gastritis crónica activa, representa un fenómeno prácticamente universal en las gastritis causadas por *H. pylori*. La gastritis asociada a la infección puede progresar, en algunos casos, hacia la atrofia gástrica (5).

*H. pylori* reside en la capa de moco gástrico adyacente a la superficie de las células epiteliales, en ocasiones penetra en las células epiteliales o entre ellas.

En el estómago, *H. pylori* coloniza fondo, cuerpo y antro, y se encuentra en 70-95 % de los pacientes que padecen gastritis crónica activa, es decir, incremento de los neutrófilos de la mucosa y las células redondas. La gastritis histológica se presenta sólo en la parte distal del estómago, y cuando se erradica *H. pylori*, la lesión se resuelve (5).

### **1.5.2 Enfermedad úlcero péptica**

Las úlceras pépticas se definen como defectos de la mucosa gastrointestinal que se extienden por la lámina muscular de la mucosa y que persisten como consecuencia de la actividad ácido péptica del jugo gástrico, la enfermedad ulcero péptica comprende las úlceras gástrica y duodenal (5).

La mayor parte de las úlceras gástricas se presenta en el epitelio gástrico que no produce ácido, o bien, cerca de su unión con la mucosa oxíntica productora de ácido (cuerpo y fondo), ya que la mucosa no productora de ácido es inherentemente más susceptible a la ulceración péptica, la gastritis crónica secundaria a infección por *H. pylori* causa atrofia de la mucosa oxíntica, desarrollo posterior de metaplasia intestinal y extensión del epitelio de tipo no productor de ácido hacia el estómago proximal (cuerpo y fondo) son úlceras secundarias a gastritis crónica y atrofia gástrica relacionadas con infección por *H. pylori*, y se denominan úlceras tipo I (5).

### **1.5.3 Cáncer gástrico**

En 1994 el Instituto de Salud de los Estados Unidos definió a *H. pylori* como agente causal de úlcera péptica.

Además, múltiples estudios han demostrado una asociación entre la infección de *H. pylori* en la infancia y el desarrollo de carcinoma gástrico, lo que permitió que la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud declarara en el año de 1994 a *H. pylori* como carcinógeno humano tipo I (2) esto es, con potencial neoplásico probado (24).

#### **1.6 Historia natural de la infección por *Helicobacter pylori*.**

La infección por *H. pylori* es usualmente adquirida en la infancia. La gastritis crónica se desarrolla en personas que están infectadas persistentemente, de las cuales el 80-90 % no presentaran sintomatología, el probable curso clínico es sumamente variable y depende de los factores de la bacteria y el hospedero (figura 1).

La bacteria infecta la región del antro en el estómago y produce una inflamación predominantemente antral, que provoca una hipersecreción de gastrina, y estímulo en el cuerpo a secretar ácido, lo cual produce hipergastrinemia. Ésta última aumenta el riesgo al desarrollo de úlcera duodenal.

Si *H. pylori* infecta todo el estómago produce inflamación y atrofia llamada pangastritis, lo que provoca una supresión de la producción de ácido en el cuerpo que ocasiona una hipoclorhidria, la cual está relacionada al aumento en el riesgo a desarrollar úlcera gástrica y cáncer (4).



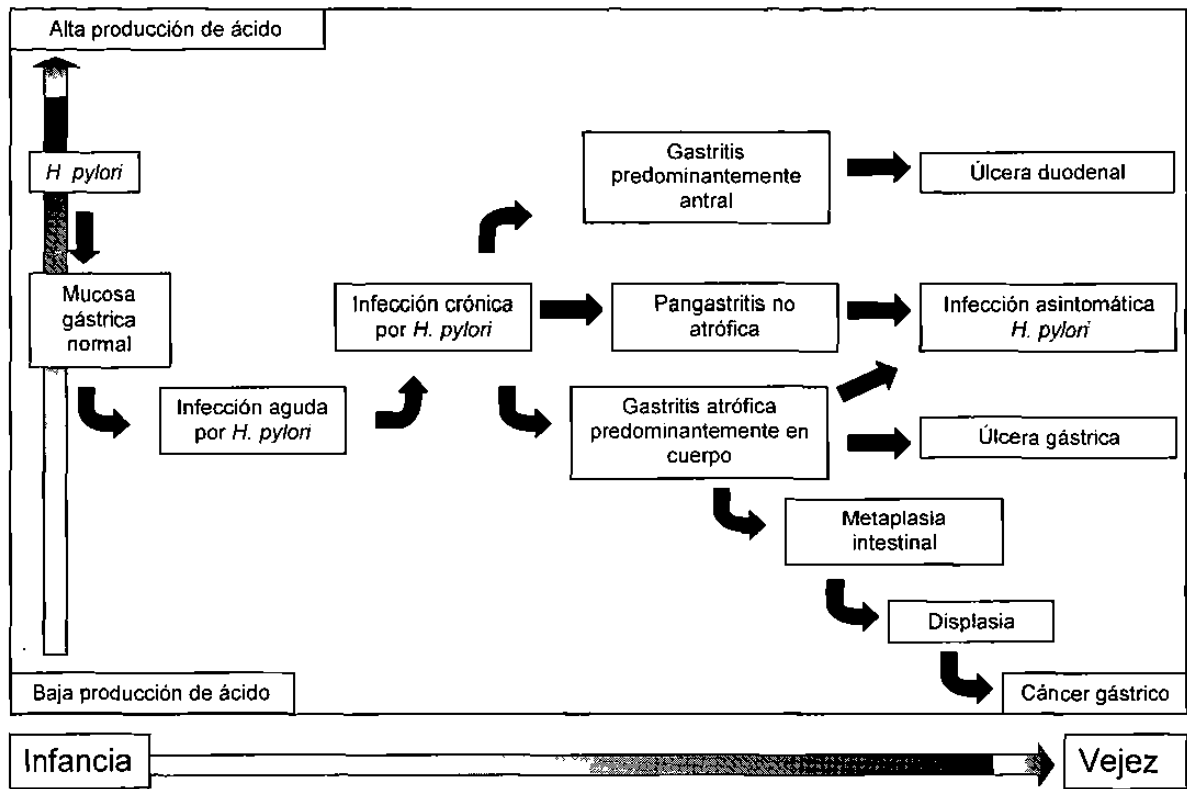


Figura 1. Historia natural de la infección por *H. pylori* (35).

Todos los individuos infectados con la bacteria desarrollan una inflamación gástrica crónica que frecuentemente es asintomática (2), se ha reportado que la infección por esta bacteria se asocia al 90-100 % de los casos de úlcera duodenal y el 70-90 % de los casos de úlcera gástrica, así como también, al riesgo a desarrollar cáncer gástrico distal (5).

### 1.7 Factores de *H. pylori* asociados a su supervivencia y/o virulencia

Hasta ahora no se ha descrito un factor único bacteriano y/o del hospedero que explique de manera contundente la diversidad en las presentaciones gástricas relacionadas con la infección por *H. pylori*.

De los factores de la bacteria que han sido asociados a su virulencia /o supervivencia se encuentran: la estructura en espiral y su movilidad (2), varios tipos de adhesinas, como las proteínas de membrana externa (OMP's) : SabA, BabA, y HopQ, el dietilftalato, la protein fosfolipasa A de membrana externa(OMPLA), la proteína de membrana 1; HP-MP1, la ureasa, la proteína producida por el gen asociado a la citotoxina (CagA) y la citotoxina formadora de vacuolas A ( VacA) (25).

### **1.7.1 Citotoxina CagA**

La citotoxina CagA es traducida a partir del gen *cagA* el cual se encuentra en la isla de patogenicidad Cag-PAI de *H. pylori*. La secreción de CagA ocurre dentro de las células del hospedero por medio de un sistema de secreción tipo IV. La proteína es activada mediante la fosforilación en residuos de tirosina 972 cercanos al COOH-terminal de CagA, una vez activada, la proteína fosforilada se ha asociado a re-arreglos en la estructura del citoesqueleto de actina dentro de la célula del hospedero, además de la secreción de interleucina 8 (IL-8) inducida por la unión del aparato de secreción tipo IV a un receptor celular, el cual ha sido descrito como un inductor importante de la producción de citocinas proinflamatorias y de la activación de monocitos.

La proteína CagA es fosforilada por la proteína SRC con la cual forma un complejo, CagA fosforilada se une y activa a la enzima SHP2, que es descrita como la primer fosfatasa con actividad de oncoproteína en humanos (16).

Las cepas de *H. pylori cagA* (+) con un sistema de secreción tipo IV intacto están asociadas a una mayor activación de receptores del factor de crecimiento epidermal de células epiteliales en comparación con cepas *cagA* (-) (4).

La infección por *H. pylori vacA s1/cagA+* está asociada a degeneración epitelial, mayor inflamación en la mucosa gástrica y un mayor riesgo a desarrollar úlcera péptica y cáncer gástrico (17, 28, 31, 39).

### **1.7.2 Citotoxina VacA**

La citotoxina formadora de vacuolas A es traducida a partir del gen *vacA* de *H. pylori*, el cual tiene dos sitios polimórficos, uno en la región señal, del cual se han descrito los alelos s1 y s2 y otro en la región media donde se han descrito los alelos m1 y m2 (4).

El genotipo *vacA* s1 está asociado con carcinoma gástrico, úlcera duodenal, úlcera gástrica (1, 10, 12).

## **1.8 Factores del hospedero asociados a la variación en la respuesta a la infección por *H. pylori***

De los factores del hospedero que han sido asociados a la variación en la respuesta a la infección por *H. pylori* se han reportado, la proteína surfactante D, fosfolipasa citosólica A2, vía Fas, el interferón  $\gamma$ , genotipos de Interleucina-8, genotipos de Interleucina-1B y los receptores similares a Toll (TLR, por sus siglas en ingles) (25).

Los genotipos de *IL-1B* y los receptores TLR, son los factores del hospedero que han sido estudiados, por su participación en los procesos inflamatorios y de reconocimiento de la bacteria.

### **1.8.1 Interleucina 1 beta**

La IL-1 beta forma parte de una familia de citocinas proinflamatorias, actúa como un inhibidor de la secreción ácido gástrica, se ha descrito un polimorfismo bialélico en la posición -31 del gen *IL-1B* que se ha asociado a una mayor producción de la interleucina y mayor riesgo de hipoclorhidria. El alelo *IL-1B-31\*C* se ha asociado al desarrollo de cáncer gástrico en poblaciones asiáticas, caucásicas, portuguesas y mexicanas (7, 8, 10, 13, 18, 31).

### **1.8.2 Receptores TLR**

Los receptores TLR, son proteínas transmembrana de la célula, que actúan como un componente clave del sistema inmune innato, los cuales reconocen componentes microbianos.

En 1988 Hashimoto, describió el gen Toll en *Drosophila* (15) y en 1996 Lemaitre reportó que el receptor Toll en *Drosophila*, participa en la respuesta inmune innata (21), a su vez Medzhitov en 1997 describió un receptor homólogo del Toll de *Drosophila* en mamíferos,

que está asociado a la defensa del hospedero, designado como receptor similar a Toll o TLR (29).

El dominio intracitoplásmico del receptor Toll y del receptor para IL-1 en mamíferos es similar, por lo que se habla de un dominio Toll / receptor IL-1, denominado dominio TIR.

El dominio TIR desencadena la activación del factor de transcripción NF-kappa B responsable de múltiples eventos inmunes e inflamatorios (9).

Se ha descrito hasta ahora 10 receptores TLR de los cuales los receptores que han sido asociados al reconocimiento de *H. pylori* son el TLR 4 y 5, el receptor TLR-4 fue el primer receptor descrito y esta asociado al reconocimiento de lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas como *H. pylori*, el receptor TLR 5 está asociado al reconocimiento de flagelina (17, 20, 38).

Algunos estudios han mostrado que *H. pylori* ATCC 26695, (*vacA* s1, *cagA* +), induce la activación *in vitro* del NF- $\kappa$ b por la vía de reconocimiento *TLR-2* y *TLR-5* y no *TLR-4*, Otros estudios han mostrado que la producción de citocinas en todos los tipos celulares es dependiente de CagA y esta activación es independiente de TLR-4.

Al parecer, *H. pylori* activa la expresión de *TLR-4* en células de epitelio gástrico, por lo cual *TLR-4* puede servir como un receptor específico de unión a *H. pylori* (3, 11, 34).

## 1.9 Justificación

Hasta ahora, no se ha descrito un factor, bacteriano o del hospedero que explique de manera contundente la diversidad en las patologías gástricas. Se ha descrito que cepas de *H. pylori* con el genotipo *cagA* +/ *vacA* s1 se encuentran asociadas a una mayor virulencia de la cepa, mas estos estudios no han comprobado si el genotipo de la cepa de *H. pylori* y su reconocimiento por los receptores TLR -4 y -5 tengan un papel importante en los diversos procesos inflamatorios de las diferentes patologías gástricas.

No existen estudios *in vivo* de *H. pylori* de la asociación de los factores de virulencia de la bacteria, con el reconocimiento por los receptores TLR-4 y -5 y su relación con las diferentes patologías gástricas.

## CAPÍTULO 2

### Objetivos

#### 2.1 Objetivo general

Determinar la expresión *in vivo* e *in vitro* de los receptores TLR -4 y -5 durante la infección por *Helicobacter pylori* y su relación con la virulencia de la cepa y las diversas presentaciones clínicas.

#### 2.2 Objetivos específicos

Etapa 1: Estudio *in vivo*

1. Seleccionar pacientes de estudio de acuerdo a criterios de inclusión.
2. Realizar el cultivo y la prueba rápida de ureasa, para la detección de *H. pylori*.
3. Clasificar los pacientes de estudio como infectados o no por el resultado del análisis histológico, el cultivo y la prueba rápida de ureasa.
4. Determinar el genotipo de *cagA*, *vacA* en las cepas de *H. pylori* cultivadas y subtipificar *cagA*.
5. Determinar la expresión génica de los receptores TLR -4 y -5, a partir de biopsias de la región antral de pacientes infectados por *H. pylori*.

Etapa 2: Estudios *in vitro*

6. Obtener 24 cultivos de cepas de *H. pylori*: Aisladas de pacientes con úlcera gástrica, úlcera duodenal, cáncer gástrico, metaplasia intestinal y gastritis atrófica y gastritis (4 cepas de c/u).

7. Genotipificar *cagA*, *vacA* en las cepas del objetivo 6 y subtipificar *cagA*.
8. Enfrentar las cepas de *H. pylori* del objetivo 6 al cultivo celular AGS y determinar la expresión génica de los receptores TLR-4 y -5.
9. Correlacionar la expresión *in vitro* e *in vivo* de receptores TLR-4 y -5 infección-virulencia de la cepa-patología gástrica.



## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Estrategia general

Para determinar la expresión *in vivo* e *in vitro* de los receptores TLR-4 y -5 durante la infección por *H. pylori* y su relación con la virulencia de la cepa y las diversas presentaciones clínicas, seguimos la estrategia general que se muestra en la figura 2.

Primero se determinó la expresión de TLR -4 y -5, *in vivo*, para lo cual se llevó a cabo la selección de pacientes de acuerdo a criterios de inclusión, se realizó el procedimiento de endoscopia gástrica superior y la toma de biopsias en el servicio de gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, se llevó a cabo además el análisis de biopsias en el laboratorio de patología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, y a partir de biopsias gástricas se llevó a cabo la extracción de ARN, la prueba rápida de la ureasa y el cultivo.

Se determinó el genotipo *vacA* y *cagA* de las cepas de *H. pylori* aisladas de las biopsias de los pacientes, y se determinó la expresión de los receptores TLR -4 y -5, por retrotranscripción a partir del ARN extraído.

Se seleccionaron 24 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con los siguientes diagnósticos: cáncer gástrico, úlcera gástrica, úlcera duodenal, metaplasia intestinal incompleta, gastritis atrófica y gastritis, se realizó la genotipificación de *vacA* y *cagA* de dichas cepas.

Para determinar la expresión de los receptores TLR en células AGS, se enfrentaron las cepas de *H. pylori* a líneas celulares AGS, se realizó la extracción de ARN y se determinó expresión de los receptores *TLR* -4 y -5. Finalmente se determinó la correlación de la expresión *in vitro* e *in vivo* de los receptores TLR -4 y -5 con la infección por *H. pylori*-la virulencia de la cepa-y las distintas patologías gástricas.

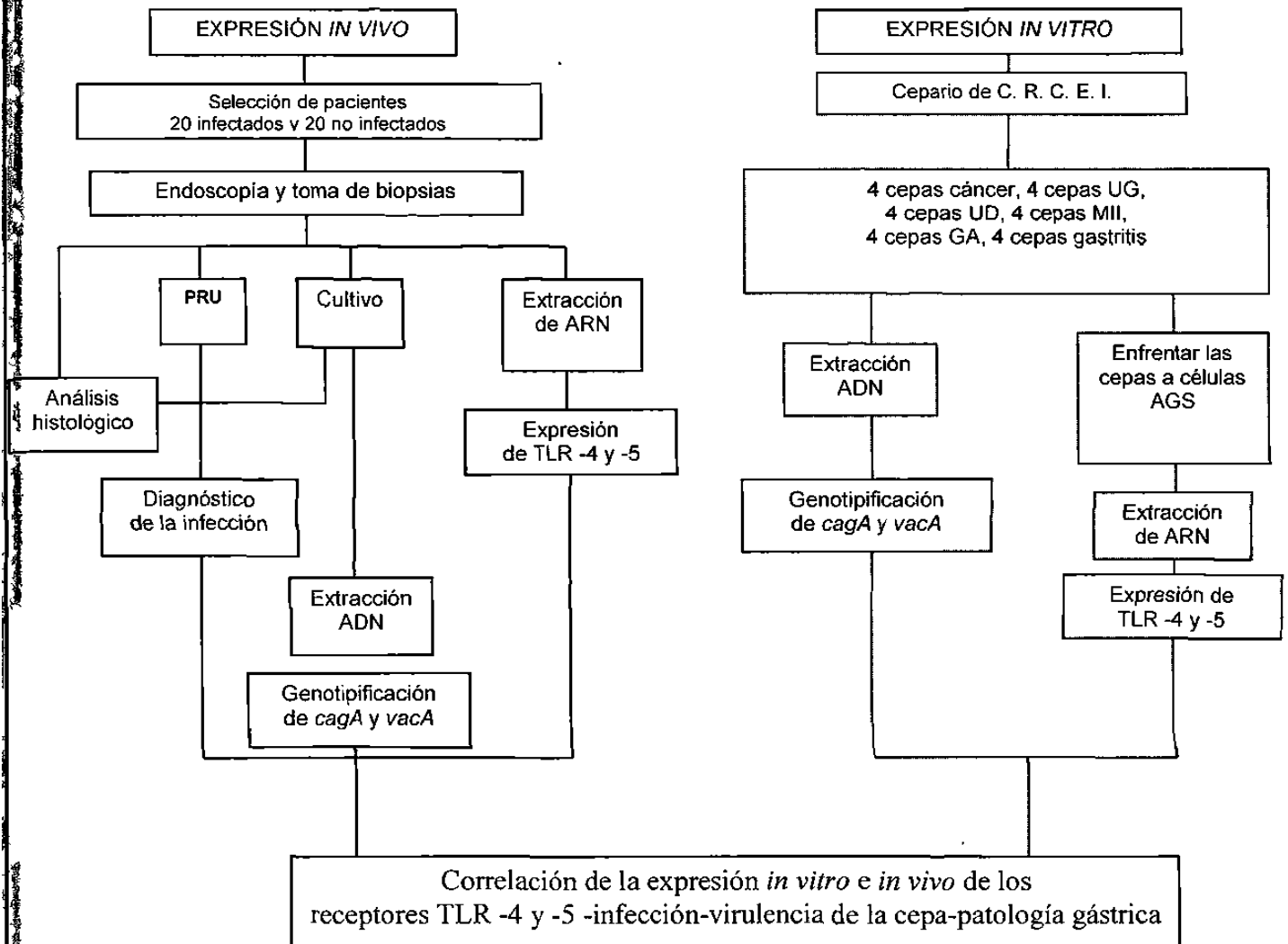


Figura 2. Estrategia general que se siguió para el cumplimiento de los objetivos trazados en esta tesis.

### **3.2 Criterios de inclusión**

La selección de pacientes se llevó a cabo mediante los criterios siguientes: pacientes que acudieron a consulta al Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León y con indicación de endoscopia superior, que aceptaron participar en el estudio previa firma de consentimiento informado, sin antibiótico y/o inhibidores de bomba de protones en un periodo no menor a 15 días antes de la toma de biopsias y sin contraindicación para la toma de biopsias.

### **3.3 Endoscopia gástrica superior**

El procedimiento endoscópico se llevó a cabo por parte del servicio de gastroenterología del Hospital Universitario, “Dr. José Eleuterio González” de la U.A.N.L.

El estudio se realizó con un endoscopio de la marca Pentax Precision Instrument Corporation, el cual fue previamente desinfectado con formaldehído por 30 minutos.

Los pacientes fueron sedados por vía intravenosa con dormicum y nubain/dosis respuesta, y se utilizó un anestésico local en la laringe, aunque algunas veces se utilizaron también propofol y fentanes/dosis respuesta.

El procedimiento endoscópico se inició revisando el esófago, estómago, primera y segunda región del duodeno, para la obtención de las biopsias gástricas se utilizaron unas pinzas Hércules y se tomaron un total de 18 biopsias gástricas de la siguiente manera, 8 biopsias

de la región del antro, 8 de la región del cuerpo, 2 de incisura angular. Las biopsias que se mandaron analizar al laboratorio de patología del Hospital Universitario fueron 2 de antro, 2 de cuerpo y 2 de incisura angular, se colectaron en frascos con formol. Se utilizaron 2 biopsias de antro y 2 de cuerpo para extracción de ARN colocándose en un vial con 25 µl de una solución de trizol-inhibidor de ARNasas (RNase Qbiogene, Madison WI, U.S.A.) y en un contenedor a -20 ° C para conservar el ARN. 2 biopsias de antro y 2 de cuerpo se colocaron en medio de transporte Stuart para ser utilizadas en el aislamiento de *H. pylori* y 2 biopsias de cuerpo y 2 biopsias de antro fueron utilizadas para la PRU, éstas se colocaron directamente en el vial y se incubaron a 37 ° C por 24 horas antes de su lectura. Una vez tomadas las biopsias del estómago de los pacientes, se procedió a pintar el estómago con azul de metileno para observar si había zonas de probable metaplasia intestinal y en caso de alguna zona sospechosa se procedió a la toma de biopsias.

#### **3.4 Aislamiento de *H. pylori* mediante el cultivo de biopsias gástricas**

Las biopsias fueron transportadas en medio Stuart en refrigeración, una vez en el laboratorio las biopsias se homogenizaron por maceración con un aplicador de madera estéril. Una biopsia de la región antral y una de cuerpo del estómago por separado en 1 ml de caldo nutritivo con glicerol al 15 %, después se sembró la solución por goteo en medio agar sangre al 10% y se incubó por un máximo de 10 días, con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 ° C.

Se les realizó la tinción Gram y las pruebas oxidasa, catalasa y ureasa a las colonias con la morfología característica de *H. pylori*. Las colonias que daban las tres pruebas positivas y

se observaban bacilos Gram negativos, fueron aisladas en agar sangre al 10 %, e incubadas en las mismas condiciones de crecimiento previamente descritas.

Una vez puras e identificadas las cepas de *H. pylori* se conservó un cultivo joven en caldo nutritivo con glicerol al 15 % a -70 ° C.

### **3.5 Prueba rápida de ureasa**

Se analizaron biopsias de la región antral y del cuerpo para la prueba rápida de ureasa, no comercial validada. Las biopsias se colocaron en viales separados y se incubaron por 24 horas a 37 °C.

Se consideró una PRU positiva la que en 24 horas o antes provocó un viraje en el color del indicador, lo que indicaría un cambio de pH del medio. Un cambio de color de naranja translucido a rojo intenso o púrpura fueron considerado positivos.

### **3.6 Análisis histológico**

Las biopsias de la región de antro, cuerpo e incisura angular del estómago, que se tomaron durante la endoscopía gástrica superior se enviaron al laboratorio de patología del Hospital Universitario de la U.A.N.L. para su análisis.

Una vez en el laboratorio, las biopsias se embebieron en parafina y se realizaron cortes finos con un ultramicrotomo, se tiñeron con la técnica de hematoxilina- eosina, se evaluó el tejido por parte de un medico especializado en patología por medio de microscopía de luz

con un aumento de 40 X, en el caso de no encontrar microorganismos, se utilizó el objetivo de inmersión 100 X.

### **3.7 Clasificación de los pacientes de estudio en infectados y no infectados**

Para determinar el diagnóstico de la infección, se utilizaron los resultados de la prueba rápida de la ureasa, el cultivo y el análisis histopatológico.

De acuerdo al resultado de estas pruebas, los pacientes se consideraron infectados con *H. pylori* si al menos dos pruebas diagnósticas fueron positivas. Los pacientes que dieron una o ninguna prueba positiva se consideraron no infectados por *H. pylori*.

### **3.8 Tamaño de la muestra**

Se incluyeron un total de 40 pacientes, 20 pacientes con diagnóstico de infectados con *H. pylori* y 20 pacientes con diagnóstico de no infectados con *H. pylori*.

### **3.9 Genotipificación de *cagA* y *vacA***

#### **3.9.1 Extracción de ADN de cepas de *H. pylori***

Se extrajo el ADN de cepas jóvenes de 48 horas de crecimiento, por el método fenol-cloroformo. Se obtuvo un cultivo de *H. pylori* de 48 horas, se colocó a un vial que contenía 700  $\mu\text{l}$  de una solución de Tris-HCL 100 mM (Promega Co. Madison WI. U.S.A.) y se añadieron 150  $\mu\text{g}$  de lisozima (AMRESCO Solon Ind. Ohio U.S.A.) y se incubó a 37 °C por 60 minutos en baño maría.

Transcurrido el tiempo, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de TE1X (Tris-HCL 10 mM y EDTA 1 mM (Productos Químicos Monterrey, N.L. México), pH 8.0 con dodecil sulfato de sodio (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo) al 1 % y 6  $\mu\text{l}$  de proteinasa K (Sigma Chemical Co.) de una concentración 10 mg/ml e incubó a 55° C por 60 minutos a baño maría.

El ADN se extrajo agregando 500  $\mu\text{l}$  de fenol saturado, 100  $\mu\text{l}$  de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico), 200  $\mu\text{l}$  de TE1X, mezclando por inversión cada vez que se añadía un reactivo y una agitación final de 5 minutos por inversión.

La muestra se centrifugó a 14,000 rpm., por 8 minutos. A partir de la fase acuosa se precipitó el ADN con 2.33 volúmenes de etanol al 98 %, a -20°C por 24 horas.

Después se separó el ADN por centrifugación a 10,000 rpm por 5 minutos y se resuspendió el ADN en 50  $\mu\text{l}$  de TE1X.

Se dejó en refrigeración por 24 horas antes de cuantificarse por fluorescencia a 460 nm y finalmente se ajustó a una concentración de 100 ng/ $\mu\text{l}$  con TE1X.

Para la cuantificación de ADN se utilizó el reactivo bisbenzimidida DNA intercalador (Hoechst 33258), el cual al intercalarse con el ADN se excita a 350 nm de la región U.V. y emite en la región azul a 450 nm.



La determinación se realizó con 2 ml del reactivo Hoechst 33258 y 2 µl de ADN, se homogenizó y se tomó lectura en el equipo espectrofotómetro TBS 380 (Turner Biosystems, Sunnyvale CA, U.S.A.).

### **3.9.2 Amplificación del gen *cagA***

Para la detección del gen *cagA* se emplearon los iniciadores descritos por Rugge y colaboradores en 1999: F 5'-ATA ATG CTA AAT TAG AAT TAG ACA ACT TGA GCG A-3' y R 5'-AGA AAC AAA AGC AAT ACG ATC ATT C-3'. La mezcla de reacción que se utilizó fue de 25 µl la cual contenía, 2.5 µl de buffer 10X, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 17.25 µl de dd H<sub>2</sub>O, 0.25 µl de Taq polimerasa (Biolase Red DNA polimerase Bioline, M.A. U.S.A.), la concentración final dNTP's fue de 0.2 mM de cada uno, cada primer tuvo una concentración final de 0.3 µM y 100 ng de ADN. Las condiciones de amplificación de la PCR que se utilizaron fueron 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 55°C por 30 s, extensión a 72°C por 30 s, y por último un ciclo para extensión final a 72°C por 3 min, se utilizó un equipo termociclador modelo PX2 Thermal cycler (Termo Electrón Corporation, MA. U.S.A.)

### **3.9.3 Amplificación del gen *vacA***

Se utilizaron los iniciadores reportados por Van Doorn-Figueiredo y colaboradores en 1998 : F 5'-ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC-3' y R 5'-CCT GAR ACC GTT CCT ACA

GC-3'. Se utilizó una mezcla de reacción con un volumen total de 25  $\mu$ l que contenía, 2.5  $\mu$ l de buffer, 1.5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  50 mM, 17.25  $\mu$ l de dd  $H_2O$ , 0.25  $\mu$ l de Taq polimerasa (Biolase Red DNA polimerase Bioline, M.A. U.S.A.), la concentración final dNTP's fue de 0.2 mM de cada uno, cada primer tuvo una concentración final de 0.3  $\mu$ M y 100 ng de ADN. Las condiciones de amplificación de la PCR que se utilizaron fueron 35 ciclos cada uno consistió de una desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 55°C por 30 s, extensión a 72°C por 30 s, y por último un ciclo para extensión final a 72°C por 3 min.

### **3.10 Expresión de TLR-4 y 5 *in vivo***

#### **3.10.1 Extracción de ARN a partir de biopsias gástricas**

Se llevó a cabo la homogenización de la biopsia con un equipo homogenizador de tejidos (Wheaton Overhead Stirrer, Wheaton Instruments).

Se colocó la biopsia en el tubo de homogenización y se le añadió 1 ml de reactivo TRIzol (Invitrogen CA, U.S.A) y una vez obteniendo una solución homogénea, se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml de capacidad se colocó en hielo por 5 minutos. Después, se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo y se mezcló con vortex por 15 segundos, se centrifugó la muestra 15 minutos a 12000 rpm y se tomó la fase acuosa, se le agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol para precipitar el ARN. Se incubó en hielo por 10 min y después se centrifugó a 12000 rpm. Se obtuvo una pastilla la cual se lavo con 1 ml de etanol al 75%, se removió

el sobrenadante y se reconstituyó con 50  $\mu$ l de agua con DEPC 0.1 %. Se incubó en baño de agua a 60 ° C por 10 minutos, se conservó la muestra a -70 ° C hasta su utilización.

### 3.10.2 Cultivo celular

Se llevó a cabo la producción de células AGS. Para obtener el volumen de células necesario para enfrentarlas a las diferentes cepas de *H. pylori*, se utilizó la técnica de transferencia o propagación de líneas celulares adherentes formadoras de monocapa de un cultivo base a otro. Este procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar (EACI Enviroco, Environmental Air Control Inc.), la cual se desinfectó con solución de hipoclorito de sodio al 1% y luz ultravioleta por 1 hora. Antes de cada transfección se lavó todo el material con una solución de SDS al 1%, se seleccionaron las botellas con crecimiento confluyente. Se les eliminó el medio de cultivo, se agregó 1 ml de tripsina (HyQ Trypsin 0.05 % 1x, HyClone UTA, U.S.A.) previamente calentada a 37° C, por cada cm<sup>2</sup> de monocapa, se dejó 1 hora en incubación a 37° C, hasta que se observó al microscopio que las células estuvieran desprendidas del sustrato.

Las células despegadas se colectaron en tubos Falcon y se inactivó la tripsina añadiendo 1.5 ml de medio completo (medio RPMI 1640(GIBCO Invitrogen Corporation), suero fetal bovino al 10 % ( Biomedica CA, U.S.A.) y 50 µg de gentamicina (garamicina G.U. Shering-Plough México D.F. ), por cada ml de tripsina utilizado, se centrifugó a 1000 rpm por 3 min, el sobrenadante con tripsina se eliminó y el botón de células obtenido se lavó con una solución de PBS 1X, centrifugando nuevamente a las mismas condiciones.

El botón se resuspendió suavemente en 1 ml de medio completo por cada 10 cm<sup>2</sup> de monocapa, de esta suspensión de células se tomó alícuotas de 0.5 ml y se transfirieron a botellas de 25 cm<sup>2</sup>, y se les agregó 7.5 ml de medio completo. Se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5 % por 48-72 horas o hasta observar confluencia en los

frascos. Cuando no se observaba confluencia y el medio estaba agotado, se llevaba a cabo cambio de medio completo, el cual era incubado a 37° C, antes de añadirse al cultivo celular.

### **3.10.3 Conservación de línea celular AGS**

A partir de botellas confluentes se llevó a cabo el procedimiento de tripsinización y lavado de células previamente descrito, una vez obtenido el botón de células se le añadió medio completo a razón de 1 ml / 10 cm<sup>2</sup> de monocapa, se resuspendió mediante agitación suave y se añadió medio completo con dimetilsulfóxido como crioprotector a una concentración final del 10 %. Se agitó suavemente y se dividió en alícuotas de 1 ml por vial de plástico (Nunc). Los viales se colocaron en refrigeración a 4°C por 1 hr, posteriormente a -20°C por 2 hr, para finalmente conservarse a -70 ° C, hasta su utilización.

### **3.10.4 Infección de *H. pylori in vitro***

Todas las cepas de la bacteria fueron cultivos de 24 h en agar sangre 10%, CO<sub>2</sub> 10% a 37 °C, se obtuvo la biomasa con un hisopo de algodón y se suspendió en solución salina 0.85%, se ajustó al tubo #1 de McFarland (0.5% de turbidez estándar, Remel, Lenexa KS, U.S.A.), equivalente a 1.5 X 10<sup>8</sup> bacterias/ml.

Para la infección del cultivo celular, se agregaron 2 ml de la suspensión de bacterias a cada frasco de 25cm<sup>2</sup> (cultivo confluyente, equivalente a 2.8 X 10<sup>6</sup> células).

*H. pylori* fue agregada al cultivo de células AGS en relación de 100:1, la infección se continuo por 24 h a 37 °C y 10% CO<sub>2</sub>.

### **3.10.5 Extracción de ARN de cultivo celular**

A un cultivo celular se agregó 1 ml de reactivo TRIzol (Invitrogen CA, U.S.A) por cada 10 cm<sup>2</sup> de monocapa de células AGS y se incubó a 37°C hasta observar al microscopio lisis celular de la mayoría de las células. Se tomó la solución homogénea y se colocó en viales éppendorf. Se añadieron 200 µl de cloroformo por cada ml de TRIzol utilizado, se mezcló por vortex 15 segundos y se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos. Se tomó la fase acuosa y se precipitó con 500 µl de isoprpanol por cada ml de TRIzol utilizado.

La pastilla que se obtuvo se lavó con etanol al 75%, se secó a temperatura ambiente y se añadieron 30 µl de agua con DEPC al 0,1 % y 0.5 µl de inhibidor de rnasas (aseERASE Qbiogene Inc.).

Por último se determinó la calidad y concentración del ARN mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm y se conservó la muestra a -70°C hasta su utilización en la retrotranscripción.

### **3.10.6 Determinación de la expresión de los receptores TLR -4 y -5 mediante la técnica de retrotranscripción**

Se utilizó el estuche comercial MasterAmp High Fidelity RT-PCR Kit (Epicentre Technologies, Wisconsin U.S.A.), para lo cual se utilizó una mezcla de reacción de 12.5 µl

compuesta por el premix 1 que contenía 2.5 µl de agua estéril libre de nucleasas, 0.625 µl de buffer 20X, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1.25 µl de enhancer 10 X con Betaina, 0.25 µl de MnSO<sub>4</sub> 25 mM, 0.125 µl de MMLV retrotranscriptasa plus 5U/ µl y el premix 2 con 3 µl de agua, 2 µl de dNTP's 2.5 mM, 0.375 µl primer F y 0.375 µl de primer R y 2 µl de ARN. Se mezclaron 6.25 µl de cada premix y se llevó a cabo la retrotranscripción y amplificación con las siguientes condiciones: un ciclo de 60°C por 30 min, un ciclo de desnaturalización 94°C por 1min, 40 ciclos de desnaturalización 95° C por 30 s, alineamiento 57°C por 30 s, extensión 72°C por 30 s, y un ciclo de extensión final 72°C por 5 min.

Se utilizó un termociclador modelo PX2 Thermal cycler (Termo Electrón Corporation, MA. U.S.A.), se llevó a cabo la detección y análisis de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con tinción por bromuro de etidio.

### **3.10.7 Detección de productos de PCR, documentación e interpretación de los geles**

La detección de todos los productos se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, preparado con buffer TBE 0.5 X, al cual se le añadió 10 µl de bromuro de etidio (10 mg / ml) por cada 100 ml de agarosa al 1%, se corrió el gel en una cámara de electroforesis (Termo EC Maxicell Primo EC340) a 10 mA / cm.

El revelado se llevó a cabo en un fotodocumentador UVP BioImaging System Epichemi<sup>3</sup> Darkroom a 365 nm. Se utilizó además el software Labworks image Acquisition and Analysis Software, UVP BioImaging Systems, version 4.5 (Media Cybernetics Inc. C.A. U.S.A. 2003) para la obtención y análisis de la imagen.





### **3.11 Análisis estadístico.**

Se determinó si existían diferencias significativas entre las frecuencia mediante la prueba t de Student, la prueba de Chi-cuadrada ( $\chi^2$ ) o la prueba exacta de Fisher de dos colas de acuerdo al tamaño de la muestra. Una probabilidad (p) < 0.05 se consideró estadísticamente significativa. Se empleó el Software Epi-Info 2000 (versión 1.0.5; Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.).

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

#### 4.1 Expresión de TLR-4 y -5 *in vivo*.

##### 4.1.1 Población estudiada.

Se estudiaron en total 40 pacientes (F:M= 25:15; rango de 14 a 81 años, media de 58.3). El 70 % de los pacientes presentaron gastritis (Figura 3). El resto de los pacientes presentaron gastritis atrófica, metaplasia intestinal o úlcera péptica. Los resultados detallados se muestran en las tablas 2A y 2B.

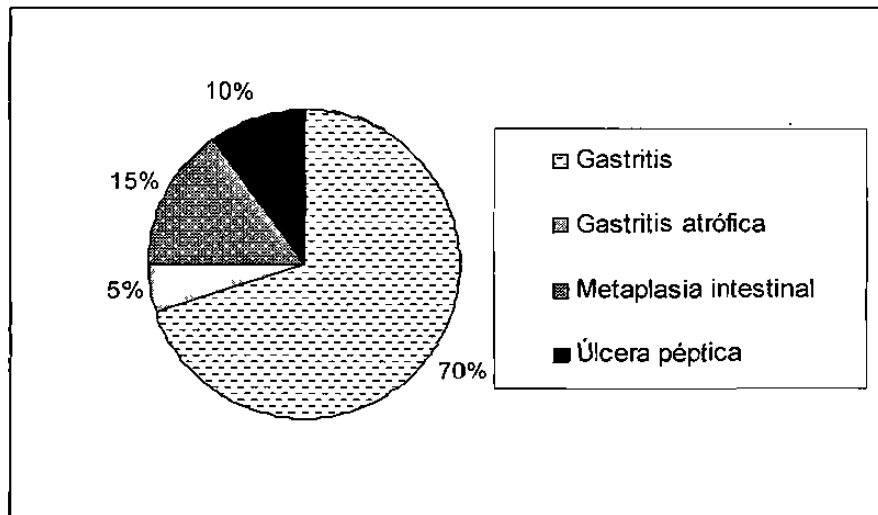


Figura 3. Distribución de los diferentes hallazgos endoscópico-histológicos (N=40).

	Diagnóstico histológico	Diagnóstico endoscópico	Clasificación final
1	Gastritis crónica activa y química	Gastritis eritematosa	Gastritis
2	Gastritis crónica activa	Gastritis	Gastritis crónica
3	Gastritis crónica activa y folicular	Gastritis antral erosiva	Gastritis crónica
4	Gastritis química y atrofia leve	Gastritis atrófica	Gastritis atrófica
5	Gastritis crónica activa	Gastritis	Gastritis
6	Gastritis crónica leve	Gastritis antral	Gastritis crónica
7	Gastritis crónica activa, MIC	Úlcera gástrica	Úlcera gástrica
8	Gastritis crónica activa y folicular	Gastritis eritematosa	Gastritis
9	Gastritis crónica activa	Gastritis antral eritematosa	Gastritis crónica
10	Gastritis crónica activa y química	Gastritis antral folicular	Gastritis crónica
11	Gastritis crónica activa	Gastritis eritematosa	Gastritis
12	Gastritis crónica y química, MIC	Gastritis antral eritematosa	Gastritis crónica
13	Gastritis crónica y astral	Gastritis eritematosa	Gastritis
14	Gastritis química	Gastritis eritematosa	Gastritis
15	Gastritis crónica y química	Gastritis antral eritematosa	Gastritis crónica
16	Gastritis crónica activa, MIC	Gastritis eritematosa	MIC
17	Gastritis crónica activa y química	Gastritis en cuerpo gástrico	gastritis crónica
18	Gastritis crónica activa, MIC	Gastritis atrófica antral	MIC
19	Gastritis y atrofia severa	Gastritis atrófica en fondo	gastritis atrófica
20	Gastritis crónica activa y química	Gastritis eritematosa	gastritis crónica

Tabla 1A. Resultados de los estudios endoscópicos e histológicos y clasificación final.

	Diagnóstico histológico	Diagnóstico endoscópico	Clasificación final
21	Gastritis, MIC	Gastritis atrófica	MIC
22	Gastritis crónica	Gastritis antral, atrofia en fondo	Gastritis crónica
23	Gastritis crónica	Gastritis atrófica en fondo	Gastritis crónica
24	Gastritis química	Gastritis eritematosa	Gastritis
25	Gastritis crónica	Gastritis atrófica	Gastritis crónica
26	Gastritis crónica	Úlcera prepilórica	Úlcera gástrica
27	Gastritis química	Gastritis	Gastritis
28	Gastritis crónica	Gastritis antral erosiva	Gastritis crónica
29	Gastritis crónica	Gastritis antral erosiva	Gastritis crónica
30	Gastritis crónica	Gastritis eritematosa	Gastritis
31	Gastritis crónica	Gastritis eritematosa	Gastritis
32	Gastritis crónica	Úlcera prepilórica	Úlcera gástrica
33	Gastritis crónica	Gastritis eritematosa	Gastritis
34	Gastritis crónica	Gastritis antral eritematosa	Gastritis crónica
35	Gastritis crónica	Gastritis eritematosa	Gastritis crónica
36	Gastritis crónica	Gastritis eritematosa	Gastritis
37	Gastritis crónica	Gastritis eritematosa	Gastritis
38	Gastritis crónica	Úlcera duodenal	Úlcera duodenal
39	Gastritis, MIC	Gastritis atrófica, MIC	MIC
40	Gastritis, MIC	Gastritis	MIC

Tabla 1B. Resultados de los estudios endoscópicos e histológicos y clasificación final.

#### 4.1.2 Diagnóstico de la infección por *H. pylori*

Para determinar el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, se realizó el análisis histopatológico de las biopsias gástricas, la prueba rápida de ureasa y el cultivo. Se consideró a un paciente como infectado con *H. pylori*, si dos o más pruebas diagnósticas fueron positivas. De acuerdo con los resultados, el 57.5 % (n= 23) de los pacientes estaban infectados con *H. pylori*. (F:M=14:9, 22-81 años, media = 53.8 ± 20.3) (Tablas 3).

Entre los pacientes infectados con *H. pylori*, la gastritis crónica fue la presentación clínica más frecuente (73.9%). Interesantemente, no se encontró correlación entre la infección por *H. pylori* y el desarrollo de gastritis (p=1), lo cual sugiere que al menos en la población estudiada, existen otras causas de la gastritis histológicamente demostrada independientes de *H. pylori* (Tabla 4).

<i>H. pylori</i>	Gastritis n (%)	Gastritis atrófica n (%)	MIC n (%)	Úlcera péptica n (%)
Positivo (n=23)	17 (73.9)	0 (0)	4 (17.4)	2 (8.7)
Negativo (n=17)	12 (70.6)	2 (11.8)	1 (5.9)	2 (11.89)

Tabla 2. Distribución de la infección por *H. pylori* de acuerdo a los hallazgos endoscópicos-histológicos.

	Prueba rápida de ureasa		Cultivo		Histología	Clasificación
	Antro	Cuerpo	Antro	Cuerpo		
1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Infectado
2	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Infectado
3	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Infectado
4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	No infectado
5	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Infectado
6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No infectado
7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	No infectado
8	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Infectado
9	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Infectado
10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	No infectado
11	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Infectado
12	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Infectado
13	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Infectado
14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	No infectado
15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	No infectado
16	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Infectado
17	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Infectado
18	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Infectado
19	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No infectado
20	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Infectado
21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No infectado
22	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	No infectado
23	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	No infectado
24	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Infectado
25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	No infectado
26	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Infectado
27	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No infectado
28	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Infectado
29	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	No infectado
30	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	No infectado
31	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	No infectado
32	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Infectado
33	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Infectado
34	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	No infectado
35	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Infectado
36	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Infectado
37	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Infectado
38	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	No infectado
39	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Infectado
40	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Infectado

Tabla 3. Resultados de pruebas diagnósticas obtenidas en los pacientes incluidos en los ensayos *in vivo*.

**4.1.3 Distribución de la expresión de *TLR -4* y *-5 in vivo* de acuerdo a la infección por *H. pylori***

Se determinó la expresión de *TLR-4* y *-5* tanto en pacientes infectados como no infectados con *H. pylori* y respecto a *TLR-4*, se encontró que en el 76.5% de los pacientes no infectados hubo expresión de *TLR-4* y en el 74.1 % de los infectados ( $p=1$ ).

En el 82.6% de los pacientes infectados hubo expresión de *TLR-5* y en el 94.1% de los pacientes no infectados ( $p=0.37$ ). Como puede apreciarse por los valores de  $p$  obtenidos, no se encontraron diferencias en la expresión de *TLR-4* y *-5* entre pacientes infectados y no infectados con *H. pylori*.

Algunos ejemplos del análisis de expresión de *TLR-4* y *-5* se muestran en las figuras 4 y 5.

Diagnóstico	No infectado (n=17)		Infectados (n=23)	
	TLR-4 n (%)	TLR-5 n (%)	TLR-4 n (%)	TLR-5 n (%)
Gastritis	9 (53)	11 (65)	12 (52)	13 (56)
Metaplasia intestinal completa	0 (0)	1 (6)	4 (17)	4 (17)
Úlcera péptica	3 (18)	3 (18)	1 (4)	2 (9)
Gastritis atrófica	1 (6)	1 (6)	0 (0)	0 (0)

Tabla 4. Distribución de la expresión *in vivo* del *TLR-4* y *-5* de acuerdo a la infección por *H. pylori* y la clasificación endoscópico-histológica.

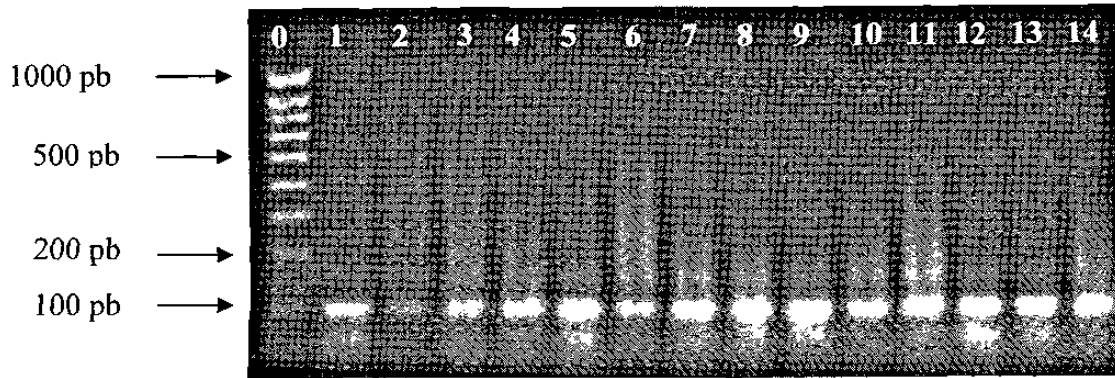


Figura 4. Ejemplo de productos amplificados por PCR y retrotranscripción a partir de ARN, Carril 0: marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 1 al 14: expresión de *TLR-4* (100 pb).

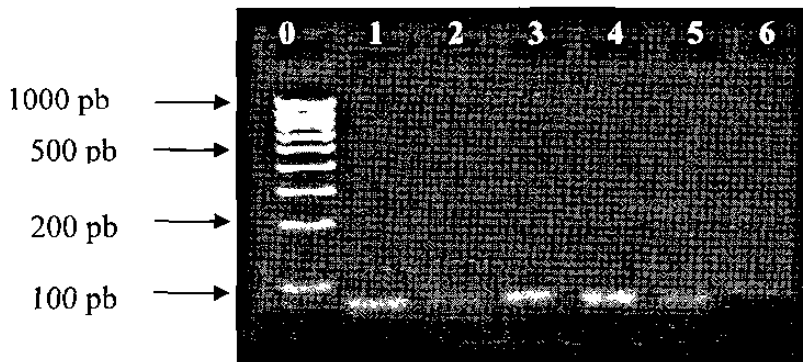


Figura 5. Ejemplo de productos amplificados por PCR y retrotranscripción a partir de ARN, Carril 0: marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 1 al 6: expresión de *TLR-5* (85 pb).



#### 4.1.4 Distribución del genotipo de *H. pylori* en las cepas aisladas, correlación con expresión *in vivo* de los receptores *TLR -4* y *-5*.

De todos los pacientes estudiados, se aislaron 20 cepas de *H. pylori* de 20 pacientes.

Algunos ejemplos de las tipificaciones de *vacA*, *cagA* se muestran en las figuras 6 y 7.

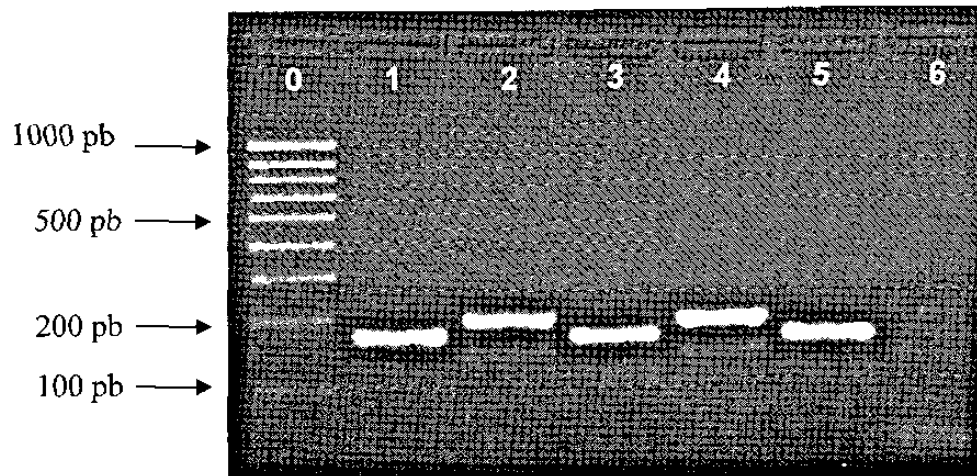


Figura 6. Ejemplo de la genotipificación de *vacA*. Carril 0: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 1, 3 y 5: *vacA* s1 (176 pb); carriles 2 y 4: *vacA* s2 (206 pb) y carril 6: control negativo.

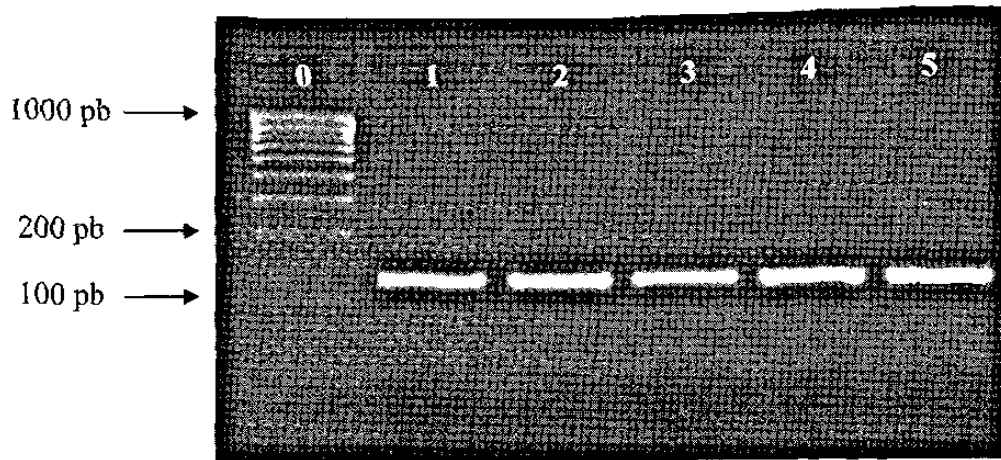


Figura 7. Ejemplo de la genotipificación de *cagA*, Carril 0: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 1 al 5: *cagA* (128 pb).

Los resultados obtenidos en las tipificaciones se tabularon y se muestran en la tabla 6.

Todas las cepas aisladas fueron *cagA*+, y 8 (20%) fueron *vacA* s1.

Diagnóstico( n )	Genotipo de <i>H. pylori</i>			Expresión <i>TLR-4</i> y-5	
	<i>vacA</i> s1 n (%)	<i>vacA</i> s2 n (%)	<i>cagA</i> n (%)	<i>TLR-4</i> n (%)	<i>TLR-5</i> N (%)
Gastritis (n= 15)	4 (26.7)	10 (46.7)	15 (100)	10 (66.7)	11 (73.3)
Metaplasia intestinal completa(4)	4 (100)	0 (0)	4 (100)	4 (100)	4 (100)
Úlcera gástrica(1)	0 (0)	1(100)	1(100)	1 (100)	1 (100)

Tabla 5. Distribución del genotipo de *H. pylori*, expresión de *TLR-4* y-5 *in vivo* y su correlación con los hallazgos endoscópicos-histológicos.

Una cepa de gastritis crónica fue genotipo *vacA* s1 y s2.

Entre las cepas *vacAs1* (n=9), el 77.8% (n=7) expresaron *TLR-4* y entre las cepas *vacAs2* (n=11), el 72.7% expresaron *TLR-4* (p= 1).

Al parecer, la expresión de *TLR4* es independiente del genotipo de *vacA*. Respecto a *cagA*, no se pueden extraer resultados de diferencias en la expresión porque todas las cepas fueron *cagA* +.

Las cepas de *H. pylori vacA* s1 se asociaron al desarrollo de metaplasia intestinal o úlcera gástrica (0.0498)

No se encontraron diferencias en la expresión de *TLR-4* o -5, entre presentaciones leves (gastritis) y pacientes con formas más severas de la infección (úlceras pépticas, metaplasia intestinal o gastritis atrófica) (p=1 para ambos análisis).

#### 4.2 Expresión de *H. pylori* enfrentadas a células AGS *in vitro*.

Se seleccionaron 24 cepas del cepario del Centro de Control de Enfermedades Infecciosas: Gastritis, cáncer, metaplasia intestinal incompleta, úlcera gástrica, úlcera duodenal, gastritis atrófica (4 de cada una de ellas).

Las cepas se genotificaron para los genes *vacA* y *cagA*. Además cada una de las cepas se enfrentó a células AGS para determinar la expresión de los receptores *TLR-4* y *-5*. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Grupos de estudio (n)	Genotipo de <i>H. pylori</i>				Expresión de <i>TLR</i>	
	<i>vacA</i> s1 n (%)	<i>vacA</i> s2 n (%)	<i>cagA</i> + n (%)	<i>cagA</i> - n (%)	<i>TLR-4</i> n (%)	<i>TLR-5</i> n (%)
Gastritis (4)	2 (50)	2 (50)	4 (100)	0 (0)	4 (100)	2 (50)
Cáncer (4)	3 (75)	1 (25)	4 (100)	0 (0)	4 (100)	4 (100)
Metaplasia intestinal incompleta (4)	3 (75)	1 (25)	3 (75)	1 (25)	4 (100)	4 (100)
Úlcera gástrica (4)	2 (50)	2 (50)	4 (100)	0 (0)	4 (100)	4 (100)
Úlcera duodenal (4)	1 (25)	3 (75)	4 (100)	0 (0)	4 (100)	4 (100)
Gastritis atrófica (4)	3 (75)	1 (25)	4 (100)	0 (0)	4 (100)	3 (75)

Tabla 6. Distribución del genotipo de *H. pylori*, expresión de *TLR-4* y *-5*, *in vitro* y su correlación con los hallazgos endoscópicos-histológicos.

De las cepas seleccionadas, 23/24 (95.8%) fueron *cagA* positivas y hubo una distribución similar del genotipo *vacA* s1 y s2 en las cepas estudiadas.

Se encontró que todas las cepas estimularon la expresión de *TLR-4*, independientemente del genotipo de *vacA* o de *cagA*.

Adicionalmente, se encontró que 3 cepas genotipo *vacA* s1, *cag A* (+), no estimularon la expresión de *TLR-5*. Estas cepas provenían de pacientes con gastritis (n=2) y gastritis atrófica (n=1).

En el análisis de la expresión de *TLR-5* de cepas provenientes de una de las patologías “benignas” de la infección por *H. pylori* (gastritis) contra las manifestaciones más severas de la infección por esta bacteria (cáncer gástrico, metaplasia intestinal, úlcera duodenal, úlcera gástrica), se observa que la expresión de *TLR-5* es menor en cepas que provienen de pacientes con presentaciones benignas (gastritis) que la expresión en pacientes con presentaciones severas (p= 0.03).

## CAPITULO 5

### DISCUSIÓN

*H. pylori* es considerada un factor importante en el desarrollo de las diferentes patologías gástricas y específicamente el proceso inflamatorio que se presenta como respuesta a la infección. El genotipo *cagA* (+), *vacA s1*, son considerados factores de virulencia importantes de la bacteria.

Se ha sugerido que los receptores *TLR-4* y *-5* son importantes en el reconocimiento inicial de *H. pylori* en la mucosa gástrica. En este estudio, se incluyeron pacientes infectados y no infectados con *H. pylori* para determinar si existía correlación entre la expresión de los receptores *TLR-4* y *-5* con la infección por esta bacteria.

Los resultados muestran que no existe diferencia en la expresión de los receptores *TLR-4* y *-5* de acuerdo a la infección por *H. pylori*.

La expresión de los receptores *TLR-4* y *-5* se ha asociado al reconocimiento de algunos componentes bacterianos, tales como la flagelina (*TLR-5*) y el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas (*TLR-4*). Otras bacterias, diferentes de *H. pylori*, podrían estimular esta respuesta y explicar esta expresión.

Para explicar la diferencia en expresión de los receptores *TLR-4* y *-5* entre los pacientes infectados, se estudió el genotipo de *vacA* y *cagA* de las cepas recuperadas de estos pacientes. De 23 pacientes infectados, se aislaron 20 cepas de *H. pylori* y todas presentaron el genotipo *cagA* (+), lo cual sugiere que el genotipo de *cagA* no es un factor determinante en la expresión de *TLR-4* y *-5*.

En lo que respecta a *vacA*, tampoco se encontró correlación entre el genotipo de *vacA* s1 (genotipo virulento) con la expresión de los receptores TLR-4 y -5.

Estos resultados sugieren que otros factores de virulencia de *H. pylori* tales como *SabA*, *BabA*, *HopQ*, *OMPLA* o *HP-MPI*, podrían estar involucrados en la expresión de estos receptores.

En los estudios *in vivo*, la mayoría de las cepas estudiadas indujeron la expresión del receptor *TLR-4* y -5 y esta expresión fue independiente del genotipo de *cagA* y *vacA* de la bacteria aislada, lo cual sugiere que la expresión de estos receptores es independiente del genotipo de la bacteria.

Interesantemente, en este estudio se encontró que el 50% de las cepas recuperadas de pacientes con gastritis, la cual es considerada una de las presentaciones benignas de la infección por *H. pylori* no expresaron los receptores *TLR-5* y este valor fue diferente del valor observado (100%) en las cepas provenientes de pacientes con las manifestaciones severas de la infección por *H. pylori* (cáncer gástrico, enfermedad úlcero péptica).

Estos resultados fueron independientes del genotipo de *cagA*, y no se pudieron explicar por el genotipo de *vacA*, de hecho llamó la atención que las 2 cepas que no indujeron la expresión de *TLR-5* fueron *vacA* s1, por lo que sugieren que existen otros componentes-bacterianos que podrían estar involucrados en el reconocimiento de *TLR-4* y -5 y que estas dos cepas no poseen.

Estudios detallados de los componentes de estas dos cepas que inducen la expresión de *TLR-5* podrían contribuir a explicar la diversidad clínica asociada a *H. pylori*.

El desarrollo de las diferentes presentaciones clínicas gástricas parecen ser el resultado de la combinación de muchos factores como; factores del hospedero, virulencia de la cepa de

*H. pylori*, la edad y algunos otros que no han sido descritos, por lo cual se requieren estudios posteriores.



## CAPITULO 6

### CONCLUSIONES

1. Los receptores *TLR-4* y *-5* se expresan en presencia y ausencia de *H. pylori*.
2. No se encontró asociación entre la expresión de los receptores *TLR -4* y *-5* y el genotipo *cagA* y *vacA* de *H. pylori*, tanto en los estudios *in vivo* como en los estudios *in vitro*.
3. Se encontró una mayor expresión del receptor *TLR-5* en pacientes con presentaciones clínicas severas relacionadas con la infección por *H. pylori*.

## APENDICES

### APÉNDICE A

#### PRUEBAS BIOQUÍMICAS

##### **Prueba de ureasa**

Inocular la cepa de estudio en agar urea de Christensen por picadura y estría.

Incubar a 37°C por un máximo de 6 horas.

La interpretación de la prueba positiva es cuando se observa un color rojo en el medio de cultivo, en una prueba negativa no se desarrolla color en el medio.

##### **Prueba de catalasa**

Tomar una asada de la cepa en estudio y sumergirla en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, una prueba positiva se considera con la formación de burbujas, en la prueba negativa no hay formación de burbujas.

##### **Prueba de oxidasa**

Impregnar un papel filtro con una gota de reactivo de oxidasa (cloruro de N,N dimetil-p-fenildiamina al 1% en agua), tomar una asada de la bacteria de estudio teniendo cuidado de no arrastrar medio de cultivo, extender la colonia en el *papel filtro empapado con el reactivo de oxidasa*, una prueba positiva se considera cuando hay la formación de color rosa-morado-negro, en una prueba negativa, no hay cambio de color.

## **APÉNDICE B**

### **TINCIONES**

#### **Tinción de Gram**

Se fija la colonia en un portaobjetos y se tiñe con cristal violeta 1 minuto.

Enjuagar con agua destilada

Cubrir el frotis con solución de lugol y se deja actuar por 1 minuto.

Se enjuaga con agua destilada, hasta eliminar el lugol.

Decolorar con etanol al 70%.

Cubrir la preparación con safranina durante 30 segundos.

Enjuagar con agua destilada.

Dejar secar al aire y observar la preparación con el objetivo 100X.

## APÉNDICE C

### MEDIOS DE CULTIVO O TRANSPORTE

#### **Agar sangre 10%**

Pesar 39 g de agar base sangre, se agrega 1 litro de agua destilada pH=7

Se calienta hasta ebullición, hasta la disolución del agar.

Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 libras por 15 minutos.

Enfriar y agregar 100ml de sangre y mezclar.

Vaciar en cajas petri y solidificar a temperatura ambiente.

Incubar 24h a 37°C para verificar la esterilidad del medio.

#### **Medio de transporte Stuart**

Se pesan 19g de medio y se disuelven en 1 litro de agua destilada pH=7.

Se disuelve el medio calentando a ebullición.

Se vacia en tubos de vidrio con tapón de rosca de 13 x 100 mm.

Se esteriliza en autoclave a 121°C, 15 libras por 15 minutos.

#### **Medio completo para cultivo celular AGS**

A 100 ml de medio RPMI 1640 1X con L-glutamina (GIBCO, Invitrogen Corporation N.Y. U.S.A.), se le agregan 11.11 ml de suero fetal bovino (FBS US ORIGIN, Biomeda Ca, U.S.A.) y 62.5 µl de gentamicina (Garamicina G.U.160 mg/ml, Schering-Plough, Mexico D.F.).

## **APÉNDICE D**

### **PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES**

#### **Agua DEPC**

1 ml de DEPC(dietilpirocarbonato), aforar a 1 litro de agua destilada estéril, 24 h a 37°C.

#### **Agarosa al 1% para ARN**

Pesar 1g de agarosa, agregar 0.5ml de isotiocianato de guanidina 0.002M y aforar con TBE 0.5X a 100ml, calentar hasta obtener una solución cristalina, dejar enfriar un poco y agregar 0.2µl de bromuro de etidio (10mg/ml).

#### **Isotiocianato de guanidina 0.002 M**

Pesar 0.23632 g y aforar a 1 litro con agua DEPC.

#### **Agarosa al 2%**

Pesar 2 g de agarosa, aforar a 100 ml con TBE 0.5X, calentar hasta obtener una solución cristalina, dejar enfriar un poco y agregar 0.2 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml).

#### **Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1**

Mezclar 24 mL de cloroformo y 1 mL de alcohol isoamílico.

#### **EDTA 500mM pH= 8**

Disolver 18,612 g de Na<sub>2</sub>EDTA en 40 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8.0 con lentejas de NaOH y aforar a 100 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

### **Etanol al 70 %**

Mezclar 35 mL de etanol al 100% y 15 mL de agua destilada estéril.

### **Fenol saturado**

Fundir el fenol a temperatura de 68°C (destilar si su aspecto fundido no es cristalino).

Equilibrar el fenol a pH de 7.8.

Agregar hidroquinoleína a una concentración final de 0.1%.

Añadir un volumen de solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M pH =8 y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor que 7.8.

Agitar durante 48 horas a temperatura de refrigeración.

Dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta conectada a una línea de vacío con trampa o un embudo de separación.

Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M pH =8.

Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M pH =8 conteniendo b-mercaptoetanol a una concentración final de 0.2%.

Almacenar en un frasco oscuro a -20°C. Conservar el fenol en uso a 4°C.

154515

### **Jugo azul 6X (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%)**

Disolver 235 mg de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3 mL de glicerol en TE 1X pH =8.

Aforar a 120 mL.

### **Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%**

Mezclar 5 mL de una solución de SFDS al 10% en 50 mL de agua destilada.

Esterilizar en autoclave.

### **Solución amortiguadora de lisis TSNT**

(Tritón 100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH=8, EDTA 1mM).

Disolver 500 mL de tritón 100 en 125 mL de agua destilada estéril.

Disolver 146.25 mg de NaCl, agregar 2.5 mL de SDS al 10%, 500 mL de Tris:HCl 500 mM pH=8 y 50 mL de EDTA 500 mM y aforar a 25 mL.

Esterilizar en autoclave.

### **TBE 10X**

Solución stock (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 20 mM pH=8)

Disolver 54g de Tris-Base, 27.5 g de ácido bórico en 20 mL de EDTA 0.5 M pH=8 y aforar a 500 mL con agua destilada estéril.

### **TBE 1X**

Solución de trabajo (Tris-base 0.089 M, ácido bórico 0.089M, EDTA 2 mM pH=8)

Mezclar 500 mL de Tris-HCl 500 mM pH=8 y 50 mL de EDTA 500 mM en agua destilada

Ajustar el pH a 8 y aforar a 25 mL.

Esterilizar en autoclave.

### **Tris-HCl 500 mM pH=8 (Solución stock)**

Disolver 30.3g de trisma base en 300 mL de agua destilada estéril.

Ajustar el pH con HCl 12F y aforar a 500 mL

Esterilizar en autoclave.



## REFERENCIAS

1. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-17777.
2. B Dunn, H Cohen and MJ Blazer. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997;10: 720-741.
3. Bäckhed F, Rokbi B, Torstensson E, Zhao Ying, Nilsson C, Seguin D. Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of toll-like receptor 4. *JID* 2003; 187: 829-36.
4. Blaser Martin J and Atherton John C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease *J.Clin.Invest* 2004, 113:321-333.
5. Bosques Padilla Francisco Javier. Enfermedad ulcero péptica Tratamiento de las enfermedades gastroenterológicas. Sección II Estomago, Capítulo 32.
6. Bosques Padilla FJ, Tijerina Menchaca R, Perez Perez GI, Flores Gutierrez JP, Garza Gonzalez E. Prevalence of *Helicobacter pylori* in symptomatic patients in

- Northeastern Mexico and its association with disease Arch Med Res 2003;34: 60-63.
7. C Faivre-Finn, A-M Bouvier-Benhamiche, J M Phelip, S Manfredi, V Dancourt and J Faivre Colon cancer in France: evidence for improvement in management and survival. Gut 2002; 51: A23.
  8. Carrington Mary, Chow Wong-Ho, McColl Kenneth, Bream Jay H, Rothman Nathaniel. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature 2000; 404: 398-402.
  9. Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense.  
[www.stke.org/cgi/content/full/sigtrans:2003/171/re3](http://www.stke.org/cgi/content/full/sigtrans:2003/171/re3).
  10. El-Omar EM. The importance of interleukin 1beta in *Helicobacter pylori* associated disease. Gut 2001; 48: 743-7.
  11. F Smith Michael, Mitchell Anastasia. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR 4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-KB activation and chemokine expression by epithelial cells. J Biol Chem 2003; 278: 32552.
  12. Figueiredo C, Van Doorn L J, Nogueira C, Soares JM, Pinho C, Figueira P, Quint WG, Carneiro F. *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical

outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 128-35.

13. Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimura H. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence. *Japan. Gastroenterology* 2002; 123: 92-106.
14. Garza-González E, Bosques-Padilla FJ, El Omar E, Hold G, Tijerina-Menchaca R, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez GI, Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in México. *Int J Cancer* 2005; 114: 237-41.
15. Gobert Alain P, Mersey Benjamin D, Cheng Yulan, Blumberg Darren R, Newton Jamie C and Wilson Keith T. Urease release by helicobacter pylori stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 2002, 168: 6002-6006.
16. Hashimoto, Hudson, K.L. and Anderson, KV. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1998; 52: 269-279.
17. Hatakeyama Masanori. Oncogenic Mechanisms of *Helicobacter pylori* CagA Protein. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 688-94.

18. Hallman Mikko, Rämetsä Mika and Ezekowitz R Alan. Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res* 2001; 50: 315-321.
19. Van Hooft C, Burger H, Peeters PH, Grobbee DE, Van Noord PA, Leufkens HG. Long-term oral contraceptive use increases breast cancer risk women over 55 years of age: the DOM cohort. *Int J Cancer*. 2000 Aug 15; 87 (4): 591-4.
20. L. Rock Fernando, Hardiman Gary, C Timans Jackie, Kastelein Robert, and Bazan Fernando. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 588-593.
21. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-83.
22. M.W. Pinkse, C.S. Maier, J.I. Kim, B.-H. Oh, A.J. Heck. Macromolecular assembly of *Helicobacter pylori* urease investigated by mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2003; 38:315-320.
23. Marshall Barry. *Helicobacter* pioneers. Blackwell publishing Ed 2002 MA, USA 1-14.
24. Ménétrier Gisbert J. y Pajares García J. Gastritis aguda y crónica, S.L.Travessera de Gracia, 17 - 2º, 08021 Barcelona, España 2004.

25. Panchal PC, Forman JS, Blumberg DR, Wilson KT. *Helicobacter pylori* infection: pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19:4-10.
26. Passaro y Parsonnet. Epidemiología de *Helicobacter pylori*.en: *Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales. Pajares, Correa y Pérez (ed) Prous Science Ed. Barcelona.pp.1998, 59-71.
27. Rugge Mm Busatto G, Cassaro M, Shiao YH; Russo V, Leandro G, Avellini C, Fabiano A, Sidioni A, Covaci A. Patients younger than 40 years whit gastric carcinoma: *Helicobacter pylori* Genotype and Associated Gastritis Phenotype. 1999; 2506-2511
28. Shin Maeda, Masao Akanuma, Yuzo Mitsuno, Hirata Yosshihiro. Mechanism of sinal transduction, distinct mechanism of H.elicobacter pylori-mediated NF-kB activation between gastric cancer cells and monocytic cel. *J Biol Chem* 2001; 276: 44856-64.
29. Ruslan Medzhitov, Paula Preston-Hurlburt & Charles A. Janeway Jr A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity *Nature* 1997; 388: 394-397.
30. Sachs George, Weeks David, Melchers Klaus, and Scott David. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu. Rev. Physiol* 2003; 65:349-69.

31. Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, Robertson MA, Schaffer D, Nichols M, Gruenthal K, Leppert MF, Slattery ML. The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology* 2001; 121: 823-9.
32. Sebastian Suerbaum, M.D. and Pierre Michetti, M.D. *Helicobacter pylori* Infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 1175-1186.
33. Skirrow Martin. Bacteria del género *Helicobacter* y sus asociaciones en: *Helicobacter pylori*: Microbiología, Clínica y Tratamiento: Retos para el Siglo XXI, Ed. M. López-Brea, Science, 1999.
34. Su Bin, Ceponis Peter, Lebel Sylvie, Huynh Hien, and Sherman Philip. *Helicobacter pylori* activates Toll-Like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infection Immunity* 2003; 71: 3496-02.
35. Suerbaum Sebastian M.D. and Pierre Michetti M.D. *Helicobacter pylori* Infection  
1. *N Engl J Med* 2002; 347: 1175-1186.
36. Tham KT, Peek RM Jr, Atherton JC, Cover TL, Perez-Perez GI, Shyr Y, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* genotypes, host factors, and gastric mucosal histopathology in peptic ulcer disease. *Hum Pathol.* 2001; 32: 264-73.

37. Torres J, Leal Herrera Y, Pérez Pérez G, Gómez A, Camorlinga Ponce M, Cedillo Rivera R, Tapia Conyer R, Muñoz O. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México. J Infect Dis 1998; 178: 1089-94.
  
38. Yamamoto Masahiro, Takeda Kiyoshi, Akira Shizuo. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. Mol Immunol 2003; 40: 861-868.
  
39. Zambon C-F, Navaglia F, Basso D, Rugge M, and Plebani M. *Helicobacter pylori* *babA2*, *cagA*, and *sl vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. J Clin Pathol 2003; 56: 287-91.

