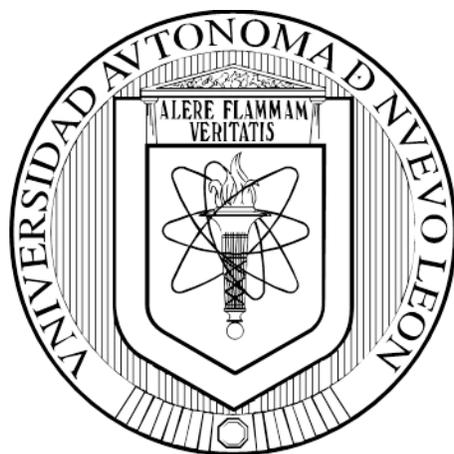


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE METABOLITOS PRODUCIDOS
POR *Lactobacillus reuteri* CONTRA *Helicobacter pylori* Y SU EFECTO EN
LA EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA**

POR

L.B.C. VÍCTOR HUGO URRUTIA BACA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA.**

Enero, 2016

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE METABOLITOS PRODUCIDOS POR
Lactobacillus reuteri CONTRA *Helicobacter pylori* Y SU EFECTO EN LA
EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA

Comité de Tesis

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Presidente

Dra. Patricia Tamez Guerra
Secretario

Dra. Erandi Escamilla García
Vocal

Dr. Moisés Franco Molina
Vocal

Dr. Pablo Zapata Benavidez
Vocal

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE METABOLITOS PRODUCIDOS POR
Lactobacillus reuteri CONTRA *Helicobacter pylori* Y SU EFECTO EN LA
EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA

Comité de Tesis

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Director

Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos
Director Externo

AGRADECIMIENTOS

A Dra. Diana Reséndez Pérez y personal de la Subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

A Dra. Cristina Rodríguez Padilla y al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

A mi Director de tesis Dr. Ricardo Gómez Flores, Directora externa Dra. Myriam Angélica De la Garza Ramos y miembros del comité de tesis por su apoyo, paciencia, orientación y disponibilidad que nos brindaron para la realización de este trabajo.

A la Unidad de Odontología Integral y Especialidades del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, CIDICS-UANL por permitir el uso de equipos y materiales.

A la Unidad de Inmunomoduladores y Acarreadores de Drogas, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL por permitir el uso de equipos y materiales.

A CONACYT por el apoyo económico y respaldo durante toda mi estancia en el país.

A todo los Maestros que me transmitieron su conocimiento y su experiencia.

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

A Dios quién me ha dado la vida y todas las cosas hermosas que me ha concedido llenando mi vida de constante felicidad y gratificación. Gracias también por darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi esposa Cynthia Urbina, que con su apoyo constante y amor incondicional ha sido amiga y compañera inseparable, enseñándome que siempre hay una luz al final del camino.

A mis padres Victorino Urrutia Aguirre y Norma del Socorro Baca Aguilar, por no perder la Fe y por dedicarme cada día un pedacito de sus oraciones y sus buenos deseos; por no dejar que me faltara nada y por comprometerme con su admiración expresada desde niño a ser mejor cada día. A ambos, gracias por su apoyo, consejos, comprensión, amor y ayuda en los momentos difíciles. Esto es un pequeño regalo de todo lo que han hecho por mí, este título es para ustedes, me siento orgulloso de que por fin les entrego este título por el cual luché y me esforcé teniendo como motivación y motor el gran amor que me han inculcado.

A mi hermana, Nekis Urrutia por su constante apoyo, por creer en mí y estar siempre presentes ofreciéndome su amor y la calidez de la familia.

A mis amigos Juan José Martínez, Arely Rodríguez, Eveling Muñiz, Sonia Montero y Mízael Ortiz por ser incondicionales, por su apoyo y cariño.

Víctor Hugo Urrutia Baca

ÍNDICE

<u>CONTENIDO</u>	<u>PÁGINA</u>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Características microbiológicas de <i>H.pylori</i>	3
2.2 Factores de virulencia de <i>H.pylori</i>	4
2.3 Tratamiento contra la infección por <i>H.pylori</i>	11
2.4 Efecto de probióticos contra <i>H.pylori</i>	13
2.5 Señalización de la expresión de genes de virulencia en <i>H. pylori</i>	16
2.6 Modulación de la expresión de genes de virulencia en patógenos por probióticos.....	19
III. JUSTIFICACIÓN	21
IV. HIPÓTESIS	22
V. OBJETIVOS	23
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	24
6.1 Material Biológico.....	24
6.2 Condiciones de crecimiento de microorganismos.....	24
6.3 Líneas celulares.....	25
6.4 Producción y aislamiento de reuterina.....	25
6.5 Cuantificación de reuterina.....	26
6.6 Concentración de reuterina.....	27
6.7 Ensayo de actividad antibacteriana.....	27
6.8 Ensayo de expresión de genes de virulencia.....	28
6.9 Cuantificación de citocinas proinflamatorias en Células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) tratadas con reuterina.....	31
6.10 Ensayo de citotoxicidad de reuterina contra la línea celular Hs 738.St/Int y PBMCs humanos.....	32
6.11 Análisis estadístico.....	33
VII. RESULTADOS	34
VIII. DISCUSIÓN	41
IX. CONCLUSIONES	45
X. PERSPECTIVAS	46
XI. BIBLIOGRAFÍA	47
XII. RESUMEN BIOGRÁFICO	58

ÍNDICE DE TABLAS

<u>CONTENIDO</u>	<u>PÁGINA</u>
Tabla 1. Medios y condiciones de cultivo para los Microorganismos usados según las recomendaciones por la ATCC.....	24
Tabla 2. Características de la línea celular Hs 738.St/Int.....	25
Tabla 3. Especificaciones de los oligonucleótidos utilizados para los ensayos de RT-qPCR.....	30
Tabla 4. Concentración mínima bactericida de la reuterina contra todos los patógenos bajo estudio.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>CONTENIDO</u>	<u>PÁGINA</u>
Figura 1. Representación esquemática del gen <i>vacA</i> y alelos en <i>H. pylori</i>	8
Figura 2. Funciones metabólicas de <i>luxS</i> en <i>H. pylori</i>	16
Figura 3. Eficiencia de amplificaciones para oligonucleótidos.....	30
Figura 4. Cuantificación de la reuterina.....	34
Figura 5. Concentración mínima inhibitoria de la reuterina contra <i>H. pylori</i> ATCC700824.....	35
Figura 6. Concentración mínima inhibitoria de la reuterina contra <i>T. forsythia</i> ATCC43037 y <i>A. naeslundii</i> ATCC51655.....	35
Figura 7. Concentración mínima inhibitoria de reuterina contra <i>P. endodontalis</i> ATCC35406 y <i>E. faecalis</i> ATCC29212.....	36
Figura 8. Expresión relativa de los genes de virulencia <i>vacA</i> , <i>cagA</i>	37
Figura 9. Porcentaje de citotoxicidad de reuterina sobre la línea celular de Hs 738.St/Int humanos.....	38
Figura 10. Porcentaje de citotoxicidad de la reuterina contra PBMCs humanos.....	38
Figura 11. Producción de TNF- α en PBMCs humanos.....	39
Figura 12. Producción de IL-6 en PBMCs humanos.....	40

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
AI	Auto-inductores.
AMC	Ciclo de metilo activado
BHI	Infusión Cerebro Corazón
<i>babA</i>	Antígenos de Lewis B
COX-2	Ciclooxigenasa 2.
<i>cagA</i>	Gen A asociado a la citotoxina
¹³ C-UBT	Prueba de aliento con urea marcada con C ¹³
Ct	Ciclo umbral.
cagPAI	Isla de patogenicidad asociadas a genes <i>cagA</i>
DC50	Dosis citotóxica al 50%
DEPC	Dietilpirocarbonato
DPD	4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona
Hs 738.St/Int	Fibroblasto de estómago e intestino de <i>Homo sapiens</i> .
HpaA	Adhesina A de <i>Helicobacter pylori</i> .
IBP	Inhibidor de la bomba de protones.
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MIC	Concentración mínima inhibitoria.
MBC	Concentración mínima bactericida.
MRS	Man-Rogosa-Sharpe
NAP	Proteína activadora de neutrófilos
OD	Densidad óptica
OipA	Proteína inflamatoria de membrana externa.
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
RT-qPCR	Retrotranscripción-reacción en cadena de polimerasa cuantitativa.
RPTP	Receptores tioproteínas tirosina-fosfatasa.
SHP-2	Proteína tirosina fosfatasa.
SCFAs	Ácidos grasos de cadenas cortas.
SabA	Adhesina de unión al ácido siálico
TGI	Tracto gastrointestinal
TBE	Tampón Tris-Boro-EDTA.
<i>vacA</i>	Citotoxina vacuolizante
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa en forma de espiral asociada con la presencia de inflamación en la mucosa gástrica, úlcera péptica, desarrollo de linfomas gástricos no-Hodgkin y con otros desórdenes linfoproliferativos asociados a la mucosa gástrica. A nivel Mundial, existe un incremento en la resistencia a los antibióticos comunes, particularmente en América Latina. En los últimos años, la aplicación de los probióticos ha demostrado poseer actividad antimicrobiana y de modulación de expresión de genes de virulencia contra bacterias patógenas. En este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de reuterina, metabolito producido por *Lactobacillus reuteri* contra *H. pylori* mediante ensayos de concentración mínima inhibitoria (MIC) y de concentración mínima bactericida (MBC), además de su efecto en la expresión de genes de virulencia por RT-qPCR y actividad citotóxica en fibroblastos de estómago y actividad anti-inflamatoria en PBMCs, mediante cuantificación de citocinas a través de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Los resultados demuestran una actividad antimicrobiana significativa contra *H. pylori* a dosis de 95.15 µg/mL. Una disminución significativa en la expresión de los genes *vacA*, *flaA* y *luxS* fue observada a las 3 horas post tratamiento. La dosis citotóxica al 50% (DC50) fue de 5.5 mg/mL en PBMCs humano y de 0.81 mg/mL para la línea celular Hs 738.St/Int. Por último, se observó disminución significativa ($p < 0.01$) en la producción del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) en PBMCs estimuladas con lipopolisacárido (LPS), en comparación con el control sin tratar. Estos resultados demuestran las amplias propiedades de la reuterina y la promueven como una alternativa terapéutica contra la infección por *H. pylori*.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a Gram-negative spiral bacteria associated with the presence of inflammation in gastric mucosa, peptic ulcer, gastric lymphomas develop non-Hodgkin's and other lymphoproliferative disorders associated with the gastric mucosa. Worldwide, there is an increase in resistance to common antibiotics, especially in Latin America. In recent years, the application of probiotics has been shown to have antimicrobial and modulation of expression of virulence genes activity against pathogenic bacteria. In this study, the antimicrobial activity of reuterin, metabolite produced by *Lactobacillus reuteri*, on *H. pylori* growth by minimal inhibitory and bactericidal concentration (MIC and MBC respectively) tests was evaluated, and its effect on expression of virulence genes by RT-qPCR and cytotoxic activity on stomach fibroblasts and anti-inflammatory activity on PBMCs by quantification of cytokines by ELISA. The results showed significant antimicrobial activity against *H. pylori* at a concentration of 95.15 µg/mL. A significant decrease on the expression of *vacA*, *flaA* and *luxS* genes was observed at 3 hours post-treatment. The Cytotoxicity doses 50% was 5.5 mg/mL in human PBMCs and 0.81 mg/mL on Hs 738.St/Int cell line. Finally, TNF- α production was significantly ($p \leq 0.01$) reduced in LPS-stimulated PBMCs, as compared with untreated control. These results demonstrated the extensive properties of reuterin and its potential as an alternative therapy against *H. pylori* infection.

I. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori fue originalmente descubierta por Walery Jaworski profesor de la Universidad de Jagiellonian en Polonia a finales del siglo XIX (Mczesnikiewicz, 2004). Sin embargo, el reconocimiento patológico de inoculación de *H.pylori* en el tracto gastrointestinal superior se debió a los clínicos australianos Barry Marshall y Robin Warren quienes la aislaron por primera vez en 1982 (Dunn y col., 1997).

H.pylori es una bacteria Gram-negativa en forma de espiral asociada con la presencia de inflamación de la mucosa gástrica (gastritis crónica superficial) y especialmente con la infiltración de células polimorfonucleares (gastritis crónica activa); también *H.pylori* se relaciona con úlcera péptica, con el desarrollo de linfomas gástricos no-Hodgkin y con otros desordenes linfoproliferativos de tejido linfoide asociados a la mucosa gástrica (MALT) y a linfomas (Dunn y col., 1997).

En países desarrollados, 70 al 90% de la población adquiere la infección antes de los 10 años de edad y sus vías de transmisión son oral-oral o fecal-oral, aunque también por iatrogenia al momento de realizar endoscopia con un tubo contaminado de persona a persona. La alta incidencia de infección por *H. pylori* contribuye probablemente al hecho de que la mortalidad por cáncer gástrico ocupe el segundo lugar entre las muertes por cáncer en todo el mundo. Debido a la relación de causalidad entre *H. pylori* y tumores gástricos, en 1994 la International Agency for Research on Cancer y la Organización Mundial de la Salud reconocieron a *H. pylori* como un carcinogénico de categoría I en humanos. En la actualidad, *H. pylori* es la única bacteria que ha logrado esta distinción peligrosa (Dye y col., 2002; Kim y col., 2009).

Entre las diferentes terapias para el tratamiento del *H.pylori* está la terapia triple estándar, constituida por un inhibidor de bomba de protones (IBP) y 2 de 3 antibióticos (amoxicilina o claritromicina o metronidazol/tinidazol), la terapia cuádruple con bismuto, triple con levofloxacino, terapia secuencial, terapia cuádruple sin bismuto, constituida por IBP, claritromicina, amoxicilina y metronidazol. En la actualidad, la terapia triple estándar alcanza niveles inaceptables de erradicación del *H.pylori* menores del 80% por intención de tratar debido, principalmente, al aumento de la resistencia a

claritromicina, metronidazol y amoxicilina (1-2% de resistencia) (Malfertheiner y col., 2007).

Los probióticos son organismos vivos que se administran por vía oral para conferir un beneficio de salud al huésped. En los últimos años, la aplicación de los probióticos en el tratamiento de la infección por *H. pylori* se ha convertido en un campo de investigación muy activo. Varios probióticos, incluyendo *Saccharomyces boulardii* y cepas de *Lactobacillus*, han sido combinados con terapias que contienen los antibióticos para tratar la infección (Cremonini y col., 2002). Un gran número de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas producen durante su crecimiento, proteínas que poseen actividad antimicrobiana, llamadas bacteriocinas, las cuales tienen generalmente bajo peso molecular (rara vez más de 10 kDa), son en general moléculas catiónicas y anfipáticas (Lesbros-Pantoflickova y col., 2007; Beasley y col., 2004). Entre las bacterias Gram (+), las bacterias ácido lácticas (LAB), especialmente, *Lactobacillus spp* han adquirido especial atención hoy en día, debido a la producción de estas bacteriocinas. (Rodríguez y col., 2003; Rodríguez E y col., 2000). *Lactobacillus reuteri* es la más importante de las especies de *Lactobacillus* en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y los animales (Casas y Dobrogosz., 2000) de forma regular y estable (Reuter, 2001). *L. reuteri* es una bacteria Gram-positiva, productora de ácido láctico. Una característica importante de esta especie es la capacidad de algunas cepas para convertir el glicerol en una molécula con propiedades antimicrobiana de amplio espectro sustancia, denominada reuterina. La reuterina es una proteína de pH neutro, soluble en agua, que se produce durante el metabolismo del glicerol a 1,3-propanodiol catalizada por la deshidratasa dependiente de coenzima B12. La reuterina consta de 3-hidroxipropionaldehído, su hidrato, y su dímero en equilibrio dinámico, es activa en un amplio rango de pH y es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, levaduras, hongos y protozoos (Talarico y Dobrogosz.,1989). Sin embargo, se desconocen el modo exacto de acción, así como el efecto de la dosis de reuterina que afecta al crecimiento de comensales o bacterias patógenas oportunistas. Por ello, la importancia de este estudio radica en evaluar el efecto antimicrobiano y su posible papel en la modulación de la expresión de genes de virulencia contra *H.pylori*.

II. ANTECEDENTES

Después que *H. pylori* fue identificado por Marshall y Warren en Australia, este microorganismo se ha encontrado en diferentes partes del mundo en al menos 50% de la población mundial, predominantemente en América latina. Es el más implicado en la patogénesis de un gran espectro de enfermedades tales como gastritis aguda y crónica, úlceras gástricas y duodenales, carcinoma gástrico y el linfoma.

2.1 Características microbiológicas de *H. pylori*.

H. pylori es una bacteria Gram-negativa que mide de 2-4 μm de largo y de 0.5 a 1 μm de ancho, aunque usualmente tiene forma espiral, también puede aparecer en forma bacilar o cocoide, tiene de 2-6 flagelos unipolares de aproximadamente 3 μm de largo, estos le confieren movilidad permitiéndole desplazarse rápidamente en soluciones viscosas. Su envoltura celular es similar a la de otras bacterias Gram-negativas, consta de una membrana interna citoplasmática, periplasma, peptidoglicano y una membrana externa; esta última está constituida por fosfolípidos y por lipopolisacáridos (LPS). El LPS usualmente está compuesto por lípido A, un núcleo de oligosacáridos y una cadena de antígeno O; el lípido A de *H. pylori* tiene poca actividad biológica comparada con el de otras bacterias, por otra parte, el antígeno O puede ser fucosilado y mimetizarse con antígenos del grupo sanguíneo Lewis y así evadir la respuesta inmune del huésped, ya que usualmente este antígeno es reconocido por la proteína D surfactante y al fucosilarse, no habría reconocimiento del mismo. Además, es catalasa y oxidasa positiva, se caracteriza por su potente actividad ureasa, fermenta la glucosa y otros hidratos de carbono como el fumarato para generar ATP o energía metabólica (Hernández y col., 1994; Mendez y col., 1993).

Para el cultivo, las muestras se obtienen a partir biopsias de mucosa del TGI; el tiempo que tarda en formar colonias se obtiene entre 4 a 7 días en condiciones de 5-10% O₂, 5-10% CO₂, 80-90% N₂, humedad de 95% y temperatura de 35 a 37 °C. Usualmente se cultiva en medios complejos con sangre, suero y antibióticos (Blanchard y Nedrud, 2012).

2.2 Factores de virulencia de *H. pylori*.

H. pylori posee factores de virulencia que ayudan a la colonización del epitelio superficial, la profundidad de las criptas y el espacio entre las células epiteliales.

Ureasa.

La ureasa es la enzima más abundante producida por *H. pylori* y su actividad depende del pH alrededor de la bacteria. El hábitat natural de *H. pylori* se encuentra por debajo de la capa mucosa, donde el pH se aproxima a la neutralidad (Bauerfeind, 1997). El mecanismo que utiliza para protegerse de ese pH ácido durante la colonización o de las bajadas de pH que pueden ocurrir por daños mecánicos en la mucosa, se basa en acumular una gran cantidad de ureasa en el citoplasma, en el espacio periplásmico y en la superficie de la bacteria. La ureasa es una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de la urea presente en el estómago en amonio y dióxido de carbono. El amonio producido aumenta el pH, elevándolo hasta 6 ó 7 en su entorno. De este modo puede alcanzar la superficie de las células de la mucosa, donde el pH es prácticamente neutro.

La ureasa se regula puesto que un aumento excesivo de la alcalinidad debida al NH_4^+ producido mataría a la bacteria. La regulación se produce mediante un transportador dependiente de pH. El transportador UreI permite la entrada de urea pero una vez que el pH alcanza el valor de 6-7, se inactiva. El NH_4^+ liberado va a producir una serie de daños que afectan a la microcirculación y a las células epiteliales superficiales. Origina una necrotización del tejido profundo; colabora en el desarrollo de gastritis atrófica crónica humana y facilita el incremento de infecciones virales y la carcinogénesis.

Sistemas antioxidantes.

H. pylori es una bacteria microaerofílica vulnerable a la toxicidad de H_2O_2 . Durante el proceso de colonización *H. pylori* promueve una fuerte respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y macrófagos, que generan una cantidad de metabolitos reactivos del oxígeno. *H. pylori* cuenta con mecanismos para la detoxificación de estos metabolitos, así como para la reparación de los daños sufridos que favorecen su supervivencia en el tejido inflamado. Entre los sistemas enzimáticos de detoxificación de los metabolitos reactivos del oxígeno están la enzima superóxido dismutasa, que cataliza la transformación del superóxido en peróxido de hidrógeno; la catalasa o peroxidasa, que

cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; las peroxirredoxinas, que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y otros hidroperóxidos orgánicos a sus correspondientes alcoholes y la flavoproteína MdaB, una NADPH quinona reductasa, que *H. pylori* expresa cuando debe compensar la pérdida de los principales componentes antioxidantes. Además, el sistema tiorredoxina cataliza los procesos de oxidación-reducción, tiol dependientes, de un gran número de enzimas detoxificadoras. La actividad enzimática de la catalasa, superóxido dismutasa y las peroxirredoxinas está incrementada en las cepas *cagA* positivas.

A veces los sistemas de detoxificación no son suficientes y puede existir oxidación. Para ello *H. pylori* cuenta con un mecanismo para reparar el DNA dañado, como las proteínas RecA, UvrABC, endonucleasa III, MutS y RuvC.

La proteína NAP (Proteína activadora de neutrófilos), codificada por el gen *napA*, fue identificada primeramente como una proteína que participa en la activación de los neutrófilos. Tiene función de bacterioferritina para captar los iones ferrosos libres intracelulares que pueden dañar el DNA de *H. pylori* y lo protege del estrés oxidativo. Puede actuar como adhesina cuando se secreta o se expresa en la superficie bacteriana pues tiene afinidad por las ceramidas presentes en las membranas plasmáticas celulares y por el grupo antigénico sanguíneo de Lewis (Long, 2009).

Flagelos.

La gran movilidad de estas bacterias es fundamental para colonizar la mucosa gástrica, según se ha deducido de la infección experimental de animales con variantes de *H. pylori* aflageladas y por tanto no móviles. *H. pylori* posee alrededor de 2 a 6 flagelos monopolares, característica inusual que es distinta del resto de proteínas flagelares, las cuales son homo poliméricas. Cada flagelo está compuesto por dos flagelinas, FlaA y FlaB. FlaB se localiza en la base del flagelo, mientras que la más abundante FlaA, se encuentra en el exterior. La eliminación de ambas flagelinas da como resultado la pérdida de la movilidad, que sin embargo conservan una capacidad de adherencia similar a la de tipo silvestre. Además la morfología espiral o helicoidal facilita la movilidad en la viscosidad del moco gástrico, y la bacteria produce una proteasa que digiere el moco facilitando su avance.

Adhesinas.

H. pylori se une a las células receptoras del huésped, estas son células epiteliales gástricas, a las que se une de una forma específica mediante un elevado número de adhesinas utilizando múltiples receptores. Entre ellos hay glicerofosfolípidos, sulfátidos, componentes de la matriz extracelular y secuencias repetidas de N-acetil-lactosamina o de glicoconjugados. Una sola clase de anticuerpos no inhibe por completo la adhesión de la bacteria a las células, por lo que se considera que la adherencia de *H. pylori* se realiza a través de múltiples adhesinas y receptores al mismo tiempo (Beswick, 2006).

HpaA (Adhesina A de *Helicobacter pylori*). La proteína HpaA es una de las principales proteínas de la membrana externa de *H. pylori* y, al igual que muchas de ellas actúa como adhesina. HpaA media la unión a glicoconjugados con ácido siálico (N-acetil-neuramini-lactosa) presentes en la superficie de las células epiteliales gástricas y en la de los neutrófilos. Está codificada por el gen *hpaA*. Es un antígeno de membrana que es reconocido por los anticuerpos humanos por lo que puede ser usado en los ensayos serológicos y para las vacunas. Se ha visto que es reconocida por las células presentadoras de antígeno humanas estimulando la proliferación de los linfocitos T y B (Nvström, 2007).

BabA (antígeno de Lewis B). Los antígenos de Lewis son antígenos fucosilados de grupo sanguíneo (Wirth, 1999). Son expresados, además de por los eritrocitos, por células epiteliales humanas. *H. pylori* se une con la adhesina BabA a las células epiteliales gástricas a través de los antígenos de Lewis (Wirth y col., 2006). Esta codificada por los genes *babA1* y *babA2*, aunque solo el gen *babA2* es funcionalmente activo. La síntesis de BabA puede ser regulada para adaptarse a las condiciones medioambientales. Se ha comprobado cómo la unión de *H. pylori* al receptor gástrico de Lewis promueve una respuesta inmune no específica y el desarrollo de autoanticuerpos frente a las células productoras de ácido, lo que contribuye a la gastritis crónica y a la pérdida de células parietales. Además, la adherencia mediada por BabA participa en la distribución de los factores de virulencia que dañan al tejido del hospedador, pudiendo llevar al desarrollo de úlcera y cáncer gástrico (Olfat, 2005).

SabA (Adhesina de unión a ácido siálico). Se une a los receptores con el ácido siálico de los neutrófilos y origina la activación de su respuesta oxidativa (Unemo, 2005).

OipA (proteína inflamatoria de la membrana externa). Todas las cepas poseen el gen que codifica para esta adhesina, pero sólo algunas la expresan. Su expresión está asociada a una mayor producción de IL-8, aunque no se sabe cuál es su contribución real a la inflamación gástrica puesto que suele estar asociada a las cepas *cagA* + (Yamoka, 2008).

VacA (Citotoxina vacuolizante):

La proteína VacA es una toxina codificada por el gen *vacA*, que induce vacuolización en las células epiteliales, la muerte celular y la destrucción de la integridad epitelial. Posee una estructura hexamérica y se ensambla en la bicapa lipídica celular del hospedador formando un canal selectivo de aniones. Produce un gradiente de pH que atrae sustancias alcalinas al interior haciendo que se capte agua por ósmosis, lo que origina una vacuolización alrededor del núcleo y más tarde el estallido y muerte celular. En el citosol interfiere con el tráfico vesicular de los lisosomas. Es producida por aproximadamente el 50% de las cepas de *H. pylori*. La infección por cepas que producen la toxina es más frecuente en pacientes con úlcera peptídica y cáncer gástrico que en pacientes que sólo padecen gastritis (Yamazadi, 2005). Otros estudios no encuentran esta relación, y una posible explicación es que el gen *vacA* tiene una estructura mosaico con varias formas posibles de presentación. Cuatro en la secuencia señal, que son *s1a*, *s1b*, *s1c* y *s2* y tres en la región media, *m1*, *m2a* y *m2b*. De la combinación de éstos podrían generarse distintos genotipos que podrían tener comportamientos más o menos agresivos (Yang, 1998; Rudi, 1998). Así las cepas *s1/m1* son más citotóxicas que las *s1/m2*. VacA se une a receptores tioproteínas tirosin-fosfatasa (RPTP) y la glicosidación postraslacional de los dominios RPTP pueden implicar diferentes respuestas celulares a las cepas *m1* o *m2*. Recientemente ha sido descrita una nueva región en el gen *vacA* que es la región intermedia (Rhead, 2007). Tiene varias posibles formas de presentación, *i1* e *i2*. Las cepas con la presentación *i1* son más citotóxicas y se encuentran más asociadas con la estructura alélica *s1m1*. Mientras que las cepas *i2* se encuentran más relacionadas

con las cepas con la combinación alélica *s2 m2* y que suelen presentar un mejor pronóstico, como se muestra en la Figura 1.

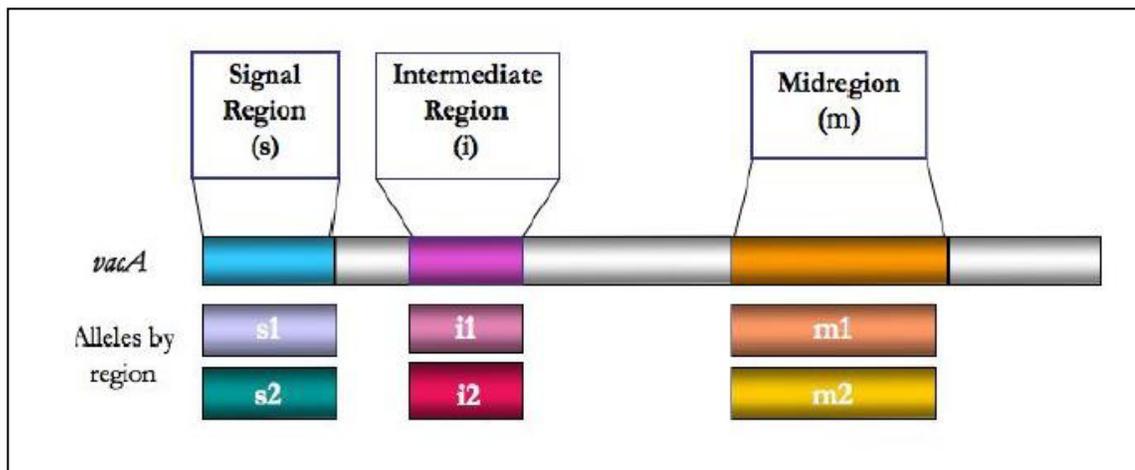


Figura 1. Representación esquemática del gen *vacA* y alelos en *H. pylori*

VacA puede llevar a la muerte programada, de forma independiente a la vacuolización, pues induce la liberación de citocromo C de las mitocondrias a través de la activación de proteínas proapoptóticas Bax y Bak. También puede participar en el proceso de la apoptosis a través de la activación del receptor Fas/CD95, a través de diversas caspasas y de la ruptura de la membrana mitocondrial que, al afectar a la concentración de ATP celular, altera el ciclo celular.

La presencia de VacA puede inducir la expresión de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y provocar el desarrollo de procesos tumorigénicos. El VEGF está implicado en la neoangiogénesis vía el sistema TLR2/TLR9 y se encuentra sobre expresado en distinto grado en carcinomas humanos dependiendo del tipo de cepa bacteriana, lo que podría explicar en parte el distinto potencial patogénico. Además, VacA amplifica la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica aumentando la expresión de ciclooxigenasa 2, en las células T, neutrófilos y macrófagos, que a su vez pueden activar la producción del factor de crecimiento vascular endotelial y provocar el desarrollo de procesos tumorigénicos. Aunque no están perfectamente definidos los mecanismos por los que la respuesta inmune inducida por *H. pylori* contribuye a la carcinogénesis gástrica, la sobreexpresión de COX-2 y VEGF, la activación de NF-κB y el aumento de citocinas proinflamatorias originan alteraciones morfológicas que llevan al desarrollo de gastritis atróficas y metaplasia gastrointestinal (Rudnicka, 2004).

También está implicada en la alteración de las funciones mediadas por integrinas al interactuar con la fibronectina y la modulación de la respuesta inmunitaria de granulocitos, monocitos y células B y T, ya que inhibe la presentación de antígenos y la proliferación de células T. Por otro lado interrumpe la maduración de los fagosomas en los macrófagos, por lo que la bacteria sobrevive dentro de los mismos (Atherton, 1997).

CagA (Gen A asociado a la citotoxina).

La presencia del gen *cagA* se asocia más con síntomas graves, como la gastritis severa, la atrofia de la mucosa, alto riesgo de úlcera y cáncer gástrico (Chromvarin, 2008). De hecho las cepas procedentes de pacientes con úlcera, son *cagA* positivas en un porcentaje mayor que las cepas procedentes de pacientes con gastritis (Erzin, 2006; Chiarini, 2009). Pero, igual que ocurre con el resto de factores de virulencia, en muchas ocasiones no hay asociación entre el genotipo de *cagA* y el estado clínico. Forma parte de la isla de patogenicidad Cag (*cagPAI*). Las islas de patogenicidad son segmentos de DNA que contienen más de un gen de virulencia con la peculiaridad de que una simple delección lleva a la pérdida de al menos dos genes de virulencia con segmentos de DNA de más de 30 Kb. Tienen un papel fundamental en la contribución a la virulencia de las bacterias patógenas que los contienen y en el desarrollo de la enfermedad. En el caso de la isla de patogenicidad de *H. pylori* (*CagPAI*), tiene un tamaño de 37 a 40 Kb y está flanqueada por secuencias repetidas directas (*direct repeats*) de 31 pb. Su contenido G + C es del 35% en contraste con el 39% del cuerpo del genoma. Como muchos genes de virulencia los genes de la *cagPAI* no se expresan constitutivamente, sino que responden a señales ambientales. Están reguladas por complejos mecanismos que pueden activarse o no dependiendo de condiciones microambientales como el nivel de oxígeno, la osmolaridad, la fase de crecimiento bacteriano, el pH, presencia o no de ácidos grasos volátiles de cadena corta, etc. (Blaser, 1995)

La *cagPAI* *H. pylori* codifica un sistema de secreción de proteínas tipo IV que inyecta *CagA* y peptidoglicanos en las células epiteliales del hospedador. La translocación de *cagA* depende de la presencia de un canal de urea protón dependiente *UreI*. Ante un descenso de pH, *cagA* se mueve del centro a la porción periférica del citoplasma. La proteína inyectada interactúa con un número elevado de moléculas de la célula

hospedadora. La diana molecular de CagA más estudiada es una fosfatasa SHP-2 (Tirosofosfatasa). En el gen que codifica esta proteína se han encontrado mutaciones y polimorfismos que están relacionadas con la carcinogénesis gástrica. La propia activación de SHP-2 por CagA puede contribuir a la proliferación celular excesiva. Además, los cambios que se producen en la expresión génica en las células epiteliales tras la infección por *H. pylori* suelen ser dependientes de este sistema de secreción codificado por la *cagPAI*.

CagA puede variar de tamaño entre las distintas cepas de *H. pylori*. Esta variación proviene de la presencia de un número de repeticiones de una secuencia aminoacídica del extremo carboxilo-terminal y puede influir en la patogenicidad de las distintas cepas *cagA+* debido a que la variación en el número de sitios de fosforilación implica una distinta efectividad en su unión a SHP-2, y por tanto una distinta activación. La secuencia aminoacídica que se repite es GLU-PRO-ILE-TYRALA denominada “EPIYA motif”. De acuerdo con la secuencia de aminoácidos que flanquea esta secuencia de GLU-PRO-ILE-TYR-ALA, los EPIYA reciben diferente nomenclatura: EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C y EPIYA-D. Hay estudios en los que se encuentra que la proteína CagA que contiene EPIYA-A y EPIYA-B, seguidas por repeticiones de EPIYA-C es más frecuente en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes occidentales, mientras que el EPIYA-D lo es en cepas aisladas en pacientes asiáticos (Panayotopoulou, 2006).

Hay una correlación entre la integridad de *cagPAI* y la gravedad de la enfermedad, ya que mutaciones puntuales llevan a la pérdida del sistema de secreción tipo IV por lo que no se puede translocar la proteína CagA. La proteína CagA translocada aumenta la producción de IL-8. Así mismo, los productos de la *cagPAI* están asociados con un aumento de la producción de otras citocinas como la IL-1 β , TNF- α y del factor nuclear de transcripción NF κ B. Varios estudios han revelado que el *cagPAI* puede presentarse como una única unidad no interrumpida, separándose en dos regiones por una secuencia o un fragmento cromosómico o bien presentarse parcialmente deletado. También se ha visto que la variabilidad de los motivos EPIYA juega un papel importante en la patogénesis producida por *H. pylori*. Las cepas *cagA* positivas y con número elevado de

motivos EPIYA han sido relacionadas con un aumento de gastritis crónica y atrofia (Doyle, 2001).

La detección del estado *cagA* se puede realizar de forma directa mediante la realización de una PCR al DNA de la cepa a estudiar o de forma indirecta, mediante serología. Mediante la PCR se puede detectar el gen *cagA*, que es un marcador de la isla de patogenicidad (Cerezo, 2006). La mayoría de estudios moleculares han determinado el estatus *cagA* mediante la presencia o ausencia con primers específicos o sondas para este gen. Así pues, en realidad, la identificación de cepas *cagA* negativas se ha realizado de forma indirecta (la ausencia de amplificación) (Sicinschi, 2003). Esto tiene el riesgo de que se produzcan falsos negativos. Además las cepas *cagA* negativas no se detectarían en caso de que existan infecciones mixtas. Por esto se han desarrollado detecciones directas para identificar las cepas de *H.pylori* que poseen la *cagPAI*. En las cepas *cagA* positivas, la *cagPAI* está flanqueada por dos secuencias de 31 bp. Sin embargo en las cepas *cagA* negativas esta misma secuencia sólo se encuentra presente en una copia. Usando primers de los sitios de inserción que flanquean la *cagPAI* se amplificará un fragmento de las cepas que no poseen la isla de patogenicidad.

2.3 Tratamiento contra la infección por *H.pylori*.

En cualquier tratamiento contra un microorganismo debe tenerse en cuenta que el éxito debe alcanzar una tasa de eliminación de por lo menos 90% en un análisis por protocolo y 80% en uno de intento de tratamiento. En el caso del *H. pylori* no debe ser la excepción si bien, algunos factores como la dificultad para cultivar la bacteria, los pocos antibióticos que han demostrado efectividad contra ella, la aparición de resistencia y el apego al esquema de tratamiento lo vuelven un escenario particular.

El tratamiento con un solo antibiótico no ha mostrado eficacia clínica por lo que no debe tenerse como una opción de tratamiento. Actualmente todos los esquemas utilizan la combinación de dos antibióticos asociados a un IBP a doble dosis durante periodos variables dependiendo de la región geográfica y la prevalencia. Los esquemas de primera línea pueden ser triples o cuádruples (cuando se agrega una sal de bismuto). Basado en las tasas de éxito alcanzadas en prácticamente todas las regiones del mundo se recomienda el uso de 1 g de amoxicilina dos veces al día, 500 mg de claritromicina

dos veces al día y dosis doble de un IBP durante 14 días. Se han propuesto esquemas cortos de 7 o 10 días. Sin embargo, su utilidad no ha sido confirmada en México y su eficacia sólo ha sido demostrada en países europeos (Abdo-Francis, 2007).

En el caso de alergia a la amoxicilina, se puede emplear como alternativa tetraciclina (500 mg cuatro veces/día) o metronidazol (250 mg cuatro veces/día). Debido a la alta tasa de resistencia al metronidazol demostrada *in vitro*, en nuestro medio no se recomienda su uso de manera rutinaria. Las sales de bismuto, en forma de subsalicilato o subcitrato, deben administrarse en cuatro tomas al día y en dosis promedio de 525 mg. La utilización de estos últimos medicamentos disminuye sustancialmente los costos, aunque favorecen la falta de apego por el tiempo de administración y el mayor número de efectos adversos.

En caso de falla terapéutica se recomienda emplear un esquema alternativo. Una de las principales causas de falla es la resistencia bacteriana, especialmente a la claritromicina. El aumentar la dosis de este antibiótico no ha demostrado mejores resultados. Pueden emplearse otros antibióticos como tetraciclina y metronidazol sin olvidar las particularidades ya descritas. En países donde la resistencia al metronidazol es elevada se recomienda como alternativa el tinidazol (1 g dos veces/día). Moayyedi informó 61% de éxito para erradicar al *H.pylori* utilizando tinidazol, claritromicina y omeprazol, aunque con un 45% de efectos adversos (Moayyedi y col., 2000).

Tratamiento de primera elección. Se recomienda utilizar un triple esquema combinando un IBP a doble dosis con dos antibióticos por un periodo de 14 días. La combinación de antibióticos más eficaz sigue siendo Claritromicina 500 mg dos veces al día y Amoxicilina 1 g dos veces al día.

Tratamientos de segunda elección. Esquema cuádruple con un IBP a doble dosis, tinidazol 1 g dos veces al día, tetraciclina 500 mg cuatro veces al día y bismuto 525 mg cuatro veces al día por 14 días

Tratamiento secuencial. Se inicia con IBP a doble dosis y amoxicilina 1 g dos veces al día durante 5 días, seguido por IBP a doble dosis más claritromicina y tinidazol a las dosis previamente descritas por 5 días más.

2.4 Efecto de probióticos contra *H.pylori*.

Probiótico es un suplemento o un producto alimenticio que contiene un número suficiente de microorganismos viables que tienen efectos benéficos para la salud del huésped (WHO, 2010). Microorganismos probióticos son generalmente miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus* (OMS, 2010.; Lionetti, 2012). Estas bacterias son organismos fermentativos, anaeróbicos, obligados o facultativos, muchos son productores de ácido láctico. Sus características biológicas inherentes les permitan predominar y prevalecer sobre los microorganismos patógenos en el tracto digestivo humano. Actualmente, se plantea la hipótesis de que estos microbios generan pequeños subproductos metabólicos moleculares que ejercen influencia regulatoria sobre las funciones biológicas del huésped. Estos subproductos metabólicos se refieren a veces como "posbióticos" y pueden funcionar como moduladores de la respuesta inmune (Thomas y col., 2010). Las bacterias probióticas más estudiadas hasta la fecha pertenecen al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Algunas levaduras y subproductos de levadura también se han estudiado y se han utilizado como un agente probiótico, por ejemplo, la levadura *Saccharomyces boulardii*.

Varias cepas probióticas, especialmente *Lactobacillus* han exhibido propiedades antagonistas contra *H. pylori in vitro* (Alsahli y col., 2001). Existen varios mecanismos de acción putativos contra *H. pylori*. Especies de *Lactobacillus* son comensales en el tracto digestivo humano y sus concentraciones normales en el estómago varían desde 0 y 10^3 /mL de fluido (Gotteland y col., 2006). Siendo resistente a los ácidos, persisten más tiempo en el estómago que otras bacterias. El posible papel de la microbiota local en la protección de las lesiones gástricas fue sugerido en el estudio de Elliott (Elliott y col., 1998) que encontraron que el nivel de aerobios totales en el estómago sanos de ratas sanas era entre 10^3 - 10^4 UFC/g de tejido, con microorganismos Gram-negativos representando sólo el 5% de la población; *Lactobacillus* autóctonos estaban presentes en todas las ratas. Sin embargo, un día después de la inducción de úlceras gástricas, el recuento total de aerobios se elevó 10^9 - 10^{10} UFC/g. Pero esta vez, las bacterias Gram-negativas eran la mayoría de los aerobios totales, mientras que la población de *Lactobacillus* desapareció. La colonización por bacterias Gram-negativas ocurrió preferentemente en el lugar de la úlcera. Estos hallazgos sugieren que la microbiota

gastroduodenal pudiera representar la primera línea de defensa contra organismos patógenos.

Dos tipos de sustancias han sido implicadas en la inhibición de *H.pylori* por las bacterias ácido lácticas: ácidos grasos de cadenas cortas (SCFAs) y bacteriocinas. SCFAs como ácido acético, propiónico, butírico y láctico son producidos durante el metabolismo de carbohidratos teniendo un papel importante en la acidificación del pH (Vandenbergh y col., 1993). Bhatia y colaboradores fueron los primeros en observar un efecto antagonista de cepas de *Lactobacillus* contra *Helicobacter* e implicar a los SCFAs (Bhatia y col., 1989). Sin embargo, el efecto inhibitorio difiere entre cepa.

Las bacteriocinas son pequeñas, resistentes al calor y dializables estructuras peptídicas con actividades antimicrobianas (Lesbros-Pantoflickova y col., 2007). Otro posible mecanismo de protección inducido por probióticos incluye la inhibición de la adhesión de *H.pylori* al epitelio gástrico, un punto importante en el desarrollo de patologías asociadas (Guruge y col., 1998). Cepas como *L.reuteri* pueden inhibir el crecimiento de *H.pylori* por competencia con los receptores de adhesión (Mukai y col., 2002). Se ha sugerido que la ingesta de probióticos fortalece la barrera de la mucosa mediante la estimulación de la producción de mucina. Reducción de la secreción de moco en un epitelio dañado es un hallazgo frecuente en la gastritis asociada a *H. pylori* al suprimir la expresión de *muc1* y *muc5A* en una línea celular gástrica humana (Byrd y col., 2000). Se ha demostrado in vitro que *Lactobacillus plantarum* y *rhamnosus* aumentan la expresión de los genes *muc2* y *muc3* (Mack y col., 1999).

La modulación de la respuesta inmunitaria a patógenos también debe tenerse en cuenta como un mecanismo potencial de la eficacia de los probióticos. La respuesta inflamatoria a la infección gástrica por *H. pylori* se caracteriza por la liberación de diversos mediadores inflamatorios tales como quimiocinas y citocinas. Los probióticos podrían modificar la respuesta inmunológica del huésped mediante la interacción con las células epiteliales y la modulación de la secreción de citocinas anti-inflamatorias, lo que resultaría en una reducción de la actividad gástrica y la inflamación (Gill y col., 2003). Sin embargo, el efecto de los probióticos sobre la respuesta inmune es difícil de

generalizar. Cepas de probióticos distintas pueden generar diferentes respuestas inmunes, que, a su vez, dependen del estado inmune del huésped (Haller y col., 2000).

Tolone y colaboradores, en el 2012, evaluaron el efecto de la triple terapia en combinación con lactoferrina y probióticos, observaron una reducción estadísticamente significativa de los sistemas como dolor, náuseas, vómitos y diarrea. En 2014, Wang y Huang, investigaron el efecto de *L.acidophilus* y *B.bifidum* suplementado a la terapia triple para la erradicación de *H.pylori* en 45 niños, durante 6 semanas de tratamiento obteniendo tasas de erradicación de 83% respecto al grupo control que solamente recibieron la triple terapia antimicrobiana.

Dore y colaboradores en el 2013, examinaron la eficacia de *L. reuteri* en la terapia de erradicación de *H. pylori*. La intervención consistió en *L. reuteri* DSM 17938 10^8 UFC más 20 mg de pantoprazol dos veces al día durante 8 semanas. La erradicación se define como un ^{13}C -UBT negativo, 4-6 semanas después de la terapia. *L.reuteri* más pantoprazol dos veces al día curada 13.6% -14.2% de los pacientes con infección por *H. pylori* mediante análisis de ITT. En general, la actividad de la ureasa evaluó antes y 4-6 semanas después de la terapia mostró una reducción significativa con una diferencia de media de 38.8 frente a 25.4, concluyendo que *L. reuteri* puede tener un papel potencial en la terapia de erradicación del *H. pylori* si la tasa de curación se puede ser mejorada mediante cambios en la dosis, el intervalo de dosificación, o duración de la terapia (Dore y col., 2013).

Resultados similares obtenidos por Kuo y colaboradores en el mismo año, aplicando el tratamiento por periodos de tiempos prolongados, concluyendo que la ingesta prolongada de probióticos ayuda a prevenir la infección de *H.pylori* en el 90% de los casos en un modelo *Mongolian gerbil* (Kuo y col., 2013).

Actualmente, Li y colaboradores, realizaron un meta-análisis sobre la eficacia de los probióticos contra *H.pylori*, incluyeron 7 estudios, concluyendo que existe una mayor tasa de erradicación de la bacteria con el uso de probióticos (Li y col., 2014). En el 2014, Zaman y colaboradores, demostraron que las especies de *Lactobacillus*, *L.reuteri*, *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus murinus* fueron capaz de inhibir el crecimiento

de *H. pylori* en *Mongolian gerbils* con tasas de colonización menor al 40% (Zaman y col., 2014).

2.5 Señalización de la expresión de genes de virulencia en *H. pylori*.

La comunicación de numerosas bacterias a través de pequeñas moléculas de señalización se denomina “quorum sensing”. Este proceso dirige la expresión de genes bacterianos al aumentar o disminuir la densidad celular (Miller y Blasser., 2001). Estos procesos fundamentales regulan la virulencia, la producción de toxinas, la motilidad, la quimiotaxis y la formación de biopelículas, que podrían contribuir a la adaptación de las bacterias y la colonización (Gonzales y Keshavan., 2006). Las moléculas de señalización, se denominan Auto inductores (AI), las que median la comunicación intraespecies específicas son AI-1 (Lactonas N-Acilhomoserina) en bacterias Gram-negativas y por oligopéptidos en bacterias Gram-positivas. AI-2 media las comunicaciones intra e inter especies, para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Miller y Blasser., 2001; Gonzales y Keshavan., 2006). Un tercer grupo de autoinductores, AI-3, fue descrita inicialmente en *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) por Sperandio y colaboradores (Sperandio y col., 2003). Este grupo de moléculas imita hormonas eucariotas y media eventos de señalización inter-reino entre las bacterias y mamíferos o plantas y viceversa (Pacheco y Sperandio., 2009). Los AI-2 sintetizados por la S-ribosilhomocisteinasa, es parte del ciclo de metilo activado (AMC) complejo de la enzima, que es importante para el reciclaje de metionina y la metilación de ADN y las proteínas (Winzer y col., 2002). La metionina se convierte en S-adenosilmetionina (SAM) en una reacción catalizada por la SAM-sintetasa (*metK*) en la Figura 2.

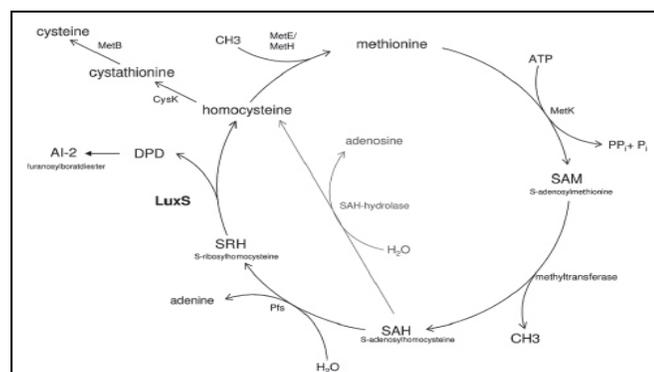


Figura 2. Funciones metabólicas de *luxS* en *H. pylori*.

La metiltransferasa SAM-dependiente escinde un residuo de metilo de SAM produciendo así el producto tóxico S-adenosilhomocisteína (SAH). SAH es metabolizado a homocisteína por una reacción de dos etapas, en donde la enzima Pfs (5'-metiltioadenosina / S-adenosil nucleosidasa) cataliza la escisión de SAH a adenina y S-ribosilhomocisteína (SSR), seguido por reacción catalizada por LuxS que escinde a SSR a Homocisteína y DPD, que es el precursor de AI-2 (He Y y col., 2008). Eucariotas, arqueobacterias y eubacterias algunos son capaces de metabolizar la SAH a homocisteína en una reacción de un solo paso por la SAH hidrolasa (Winzer y col., 2003). Las metiltransferasas MetE o MetH catalizan la conversión de homocisteína en metionina. La mayoría de los genomas *Helicobacteraceae* codifican un conjunto completo de enzimas AMC, mientras que *H. pylori* constituye una excepción (Doherty y col., 2010). Los dos metiltransferasas conocidos MetE y MetH parecen estar ausentes en *H. pylori*, y *luxS* es parte de una biosíntesis de cisteína “de novo” que usa metionina como fuente de azufre reducido. Análisis de BlastP con MetE (CAL35316) y MetH (ZP04809678) ha mostrado su ausencia en *H. acinonychis*, *H. bizzozeronii*, *H. felis* y *H. suis* (todos pertenecientes a los taxones *Helicobacter* gástrico)(Solnick y col., 2001), mientras que MetH o MetE parecen estar presentes en las especies de *Helicobacter* enterohepáticas (*H. bilis*, *H. canadensis*, *H. cinaedi*, *H. hepaticus*, *H. pullorum* y *H. winghamensis*).

Todas las cepas de *H. pylori* poseen en su genoma el gen *luxS*, se encuentran dentro de un operon que codifica *cysK*, *metB* y *luxS* que son necesarios para la biosíntesis “de novo” de cisteína (Doherty y col., 2010). En análisis “*in silico*” por Doherty y colaboradores sugieren que el operón *cysK-metB-luxS* fue adquirido por un evento de transferencia horizontal de genes de un *Enterococos* Gram-positivo después de la separación de estas especies de otras especies de *Helicobacter*, pero antes de su separación el uno del otro.

H. pylori es capaz de captar estímulos exógenos como señales quimotácticas, pero solamente pocas se han demostrado para quimiorreceptores de *H. pylori*. En la cepa 26695 de la quimiorreceptores TlpA se ha demostrado que responden a arginina y bicarbonato (Cerdeña y col., 2003), y en la cepa SS1 la quimiorreceptores TlpB se ha

demostrado que responden al ácido (Croxen y *col.*, 2006). El TlpD quimiorreceptores intracelular ha sido descrito como un sensor de energía, aunque la naturaleza molecular de las señales que percibe no se conoce (Schweinitzer y *col.*, 2008). No hay ligandos conocidos para TlpC.

Una de las condiciones del medio ambiente que *H. pylori* experimenta es la molécula de autoinductor-2 vía Quorum sensing producida endógenamente (AI-2) (Forsyth y Cubierta., 2000; Joyce y *col.*, 2000; Rader y *col.*, 2007.). AI-2 se produce como un subproducto metabólico de la reacción llevada a cabo por *luxS*, que escinde la S-ribosilhomocisteína, produciendo homocisteína y 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD). DPD se somete a una rápida deshidratación y ciclización, hasta formar los AI-2 (Schauder y *col.*, 2001). En muchas bacterias, *luxS* es una enzima clave en la producción de la donante de metilo activado, S-adenosilmetionina (SAM); sin embargo, en *H. pylori*, la homocisteína producida por *luxS* se metaboliza para producir “Cisteína de Novo” (Doherty y *col.*, 2010).

Informes anteriores han demostrado que varias cepas de *H. pylori* producen AI-2 de forma *luxS*-dependiente, como se detecta a través de un ensayo de luminiscencia con *Vibrio harveyi* (Forsyth y cubierta., 2000; Joyce y *col.*, 2000; Lee y *col.*, 2006; Rader y *col.*, 2007; Shen y *col.*, 2010). La mutación del gen *luxS* se ha asociado con la reducción de la transcripción y síntesis de flagelina *flaA*, mejorar la formación de biopelículas, disminución de la motilidad en placas de agar blando, y defectos de colonización en modelos murinos y gerbo (Cole y *col.*, 2004; Lee y *col.*, 2006; Loh y *col.*, 2004; Osaki y *col.*, 2006; Rader y *col.*, 2007). Ellos informaron anteriormente de que los AI-2 producidos funcionan como una molécula señalización que modula los niveles de transcripción del regulador flagelar FlhA, lo que influye en la regulación flagelar global (Rader y *col.*, 2007). Aunque está claro que el AI-2 afecta a la expresión del gen flagelar, encontraron que los flagelos en los mutantes *luxS* son morfológicamente normales y por lo tanto la alteración de la regulación de genes flagelares en esta cepa no puede explicar completamente su defecto la motilidad en placas de agar blando. Debido a la expansión colonial en estas placas requiere tanto de la motilidad y la quimiotaxis, ellos examinaron de qué forma AI-2 afecta a este último proceso.

En 2011, Rader y colaboradores demostraron que la delección del gen *luxS* resultó en el comportamiento de natación con una frecuencia reducida de paradas en comparación con la cepa de tipo silvestre. La frecuencia de paradas fue restaurada a niveles de tipo silvestre por complementación genética de la mutación *luxS* o por adición de sintético 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD), que se cicla para formar AI-2. El DPD sintético también aumentó la frecuencia de las paradas en *H. pylori* tipo silvestre, similar al comportamiento inducido por un quimio repelente conocido HCL. Se encontró que los mutantes carentes de los genes quimiorreceptores TlpA, TlpC o TlpD respondieron a una fuente exógena de DPD sintético, mientras que el mutante carente de TlpB no pudo responder a un gradiente o distribución uniforme de la sustancia química. Por otra parte, un doble mutante carente tanto TlpB y *luxS* exhibió un comportamiento quimiotáctico similar a mutante TlpB única, mientras que un doble mutante carente tanto TlpB y del gen de quimiotransducción CheA se comportó como No quimiotáctico CheA único mutante, apoyando el modelo que TlpB funciona en una vía de señalización corriente abajo de *luxS* y arriba de CheA. Llegando a la conclusión de que *H. pylori* percibe a los AI-2 producidos por LuxS como una sustancia quimio repelente a través de los quimiorreceptores TlpB.

En 2012, Rolig y colaboradores, demostraron que la quimiotaxis, específicamente, es controlada por TlpD y es necesaria para que *H. pylori* pueda sobrevivir o crecer alrededor de la inflamación en el antro. Al infectar ratones con cepas de *H.pylori* (Che-) y carentes de quimoreceptores.

2.6 Modulación de la expresión de genes de virulencia en patógenos por probióticos.

Medellín-Peña y colaboradores, en 2009, confirmaron que el sobrenadante libre de células de *L.acidophilus* La-5 poseen la capacidad de bloquear o interferir con la virulencia de *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 en un ensayo *in vitro* (Medellín-Peña y col., 2008). En ese mismo año, Carey y colaboradores, estudiaron el efecto de los probióticos y ácidos orgánicos en la expresión de Shiga toxina 2 en *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica, observado para todas las cepas de probióticos probadas

incluyendo *L.reuteri* una disminución en la expresión de *stx2A*, en comparación con el cultivo control. Además, la producción de ácidos orgánicos, produce una disminución en el pH influyendo en la expresión génica de *stx2A* (Carey y col., 2008).

Kieran y colaboradores, en 2009, determinaron la capacidad de *L.salivarius* de modular la expresión de genes de virulencia en *H.pylori*, modulando 8 de 12 genes relacionados a la isla de patogenicidad *cagA*, mediante qPCR observaron una disminución de la expresión de estos genes (Kieran y col., 2009). En otro estudio, el sobrenadante libre de células de *L.reuteri* RC-14 procedente de la vagina, reprime la expresión del gen que codifica a la exotoxina causante del síndrome de Shock toxico (TSST-1) en *Staphylococcus aureus* mediante sistema Agr, regulador clave de los genes de virulencia (Li J y col., 2011).

En 2013, Mundi y colaboradores, estudiaron el efecto del sobrenadante libre de células de *L.acidophilus* y *B.longum* en la expresión de genes de virulencia en *Campylobacter jejuni*, ambas cepas probióticas fueron capaces de disminuir la expresión de *ciAB* y *flaA* en una cepa de tipo silvestre de *Campylobacter jejuni* 81-176 (Mundi y col., 2013).

III. JUSTIFICACIÓN:

H. pylori afecta a cerca de dos tercios de la población mundial y su prevalencia está fuertemente relacionada con las condiciones socioeconómicas (Malaty, 2007) En países en vía de desarrollo afecta a más de 80% de los adultos, en contraste 20 a 50% en países desarrollados (Suebaum, 2002). En todos los infectados produce gastritis crónica, pero solo el 20% de ellos tendrá alguna enfermedad clínica. Del 10 a 20% de los infectados durante su vida tendrán riesgo de desarrollar úlceras pépticas y 1-2% de tener carcinoma gástrico (Otero y col., 2007). A pesar de la disminución en la incidencia del cáncer gástrico, actualmente ocupa el cuarto lugar y el segundo en mortalidad entre todos los cánceres en todo el mundo (Jemal y col., 2011). Se estima que en 2008 hubo 989.600 nuevos casos y 738.000 muertes por cáncer de estómago en el mundo, y aproximadamente el 70% de los dos nuevos casos y muertes ocurrieron en países latinoamericanos (Ferlay y col., 2010).

Las tasas de incidencia más altas se encuentran en el este de Asia, Europa Oriental, y en algunos países de América Latina, principalmente en Centroamérica y la Región Andina, con tasas de entre 20 a 30 por cada 100.000 habitantes. Algunas de las tasas de incidencia más bajas se encuentran en países de África (0,6 a 3/100000) y en América del Norte (5 a 6/100,000). Se ha estimado que la infección por *H. pylori* es responsable de 77% de los casos de cáncer gástrico distal y se asocia con ambos tipos, intestinales y difusos, pero no con carcinomas originados en el cardias gástrico. A nivel Mundial, existe un incremento en la resistencia a los antibióticos comunes contra *H. pylori*, particularmente en América latina encontrándose altas tasas de 12 % para claritromicina, 53 % para metronidazol, 4 % para amoxicilina, 6 % para tetraciclina, 3 % para furazolidona y 15 % para fluoroquinolonas (Camargo y col., 2014). Debido a todo lo anterior, es necesario proponer alternativas terapéuticas, como el uso de bacterias probióticas, especialmente metabolitos producidos por estas, que posean actividad antimicrobiana y pudiesen modular la expresión de los genes de virulencia.

IV. HIPÓTESIS

El metabolito reuterina producido por *Lactobacillus reuteri* posee actividad antimicrobiana contra patógenos orales-gástricos y reprime la expresión de genes de virulencia en *Helicobacter pylori* en ensayos *in vitro*.

V. OBJETIVOS

General.

Evaluar la actividad antimicrobiana de reuterina producida por *Lactobacillus reuteri* contra patógenos orales-gástricos y efecto en la expresión de genes de virulencia de *Helicobacter pylori* en ensayos *in vitro*.

Específicos.

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de la reuterina contra *H. pylori* y patógenos orales (*Actinomyces naeslundii*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas endodontalis* y *Enterococcus faecalis*).
2. Evaluar el efecto de la reuterina en la expresión de los genes de virulencia *vacA*, *cagA*, *flaA* y *luxS* de *H. pylori*.
3. Evaluar la citotoxicidad de la reuterina contra la línea celular de fibroblastos de estómago/intestino humana y células monoculares de sangre periférica humana.
4. Evaluar la expresión de citocinas proinflamatorias en células monoculares de sangre periférica humana tratadas con reuterina.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material Biológico

Se utilizaron cepas bacterianas proporcionadas por la ATCC Tabla 1.

Bacteria	ATCC	Pre-cultivo y medio de cultivo	Atmósfera	Incubación 37°C (horas)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	55730	MRS-MRS	Anaeróbica	24-48
<i>Helicobacter pylori</i>	700824	Agar Sangre 5% - Caldo Brucella con 10% SFB	Microaerofila	48-72
<i>Tanarella forsythia</i>	43037	NAM-PY con suero de caballo – NAM	Anaeróbica	24-48
<i>Actinomyces naeslundii</i>	51655	CAMG pH 7.5	Anaeróbica	24-48
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406	BHI-BHI	Anaeróbica	24-48
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	BHI-BHI	Aeróbica	24-48

Tabla 1. Medios y condiciones de cultivo para los microorganismos usados según las recomendaciones por la ATCC.

6.2 Condiciones de crecimiento de microorganismos.

El pre-cultivo de los microorganismos se realizó sobre agar en cajas Petri por 24-48 hrs a 37°C (Thermo Scientific Incubator Lab-Line, Marietta, OH) recomendado por la ATCC. *L. reuteri* y los patógenos orales *T. forsythia*, *A. naeslundii*, *P. endodontalis* son anaerobios y para su manipulación se requirió de una atmósfera controlada en una cámara anaeróbica (Plas-Labs, Lansing/MI). Esta atmósfera fue una mezcla de gases H₂ (20.13%), CO₂ (10.13%), y N₂ (69.74%). Todos los medios de cultivo, así como los materiales fueron pre-esterilizados 15 min a 120 °C a 15 libras de presión (All American, Hillsville, USA). Los caldos de cultivo fueron preparados en matraces de 250mL conteniendo 200mL de medio de cultivo apropiado para cada microorganismo (Tabla 1) e inoculados a una densidad óptica (OD) de 0.2 a 600nm.

Actinomyces naeslundii y *Tannerella forsythia* requirieron medios de cultivo específicos; medio CAMG, compuesto de (g/L), 5-triptona, 5-extracto de levadura (Dibico, México D.F., México), 5-K₂HPO₄, 2-glucosa (J.T. Baker, Center Valley, PA), 0.5 mL polisorbato 80 y 2-agar bacteriológico (Oxoid Ltd., Hampshire RG24 8PW, UK) pH 7.5 (±0.1) para pre-cultivo de *A. naeslundii* y crecimiento en caldo CAMG. *T. forsythia* fue pre-cultivada en agar ácido N-acetilmurámico, que consiste de 49 g de agar

triptona soya (Becton–Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ), y 10 mL de hemina porcina (AppliChem GmbH, Darmstadt, Alemania) suspendido en 1L de agua destilada. Posteriormente, cultivado en Peptona-Levadura (PY), constituido (g/L) de 5-peptona (Dibico, México D.F., México), 5-tryptona (Bio Basic Inc., Ontario, Canada), 10-extracto de levadura (Dibico, México D.F., México), 4 mL de resazurin, 40 mL of agua, 10 mL de hemina porcina, 0.2 mL de vitamin K, 0.5 L-cisteína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y pH 7.0 (± 0.1). El desarrollo de ambas bacterias se llevó a cabo en una atmósfera de mezcla de gases a 37°C durante 24-48 h.

Porphyromonas endodontalis y *Enterococcus faecalis* se cultivaron en agar y caldo Infusión-Cerebro-Corazón (Becton–Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) a 37 °C, en atmósfera aeróbica para *E. faecalis* y anaeróbica para *E. endodontalis* durante 24-28 hrs.

6.3 Líneas celulares.

Las línea celular fibroblastos de estómago e intestino humano Hs 738.St/Int fue provista por la ATCC, se cultivaron en medio d-MEM suplementado con 10% de SFB en frascos de 25 cm² (Corning, One River, NY, USA) e incubadas durante 72 hra a 37°C y 5% CO₂ (Tabla2).

Características	Hs 738.St/Int
Organismo	<i>Homo sapiens</i> , humano
Tejido	Mezcla, estómago e intestino
Morfología	Fibroblasto
Propiedades	Adherente
Enfermedad	Normal
Procedencia	Feto de 18 semanas de gestación, Masculino, Caucásico

Tabla 2. Características de la línea celular Hs 738.St/Int.

6.4 Producción y aislamiento de la reuterina (3-HPA).

Primeramente, se requirió producir biomasa de *L. reuteri* ATCC 55730. Se sembró un inoculo de 2×10^8 bacterias/mL ($DO_{600nm} = 0.4$) según la escala de McFarland, en matraces de 250mL conteniendo 100mL de caldo MRS (Oxoid Ltd., Hampshire RG24

8PW, UK), suplementado con 1% de glucosa (v/v) y pH 6.2 ± 0.2 , luego fueron incubadas durante 14, 16, 18 y 20 hrs a 37°C en atmósfera anaerobia compuesta por una mezcla de gases H₂ (20.13%), CO₂ (10.13%), y N₂ (69.74%). Tras la incubación, se determinó la concentración bacteriana y pH en el medio, posteriormente, las células fueron centrifugadas a 1500 x g durante 10 minutos a 20°C, se separó el sobrenadante y el pellet. El sobrenadante se filtró a través de membranas de nitrocelulosa de 0.22 micras (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) y almacenado a 5°C hasta la cuantificación de 3-HPA. Por otra parte, el pellet se lavó 2 veces con buffer de fosfato de potasio 0.1M y se determinó el peso seco; luego, se resuspendió en 100mL de solución de Glicerol 200 mM e incubó a 37°C en atmósfera anaerobia por 2 hrs. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 15,000 x g a 15 °C por 5 minutos; el sobrenadante resultante se filtró (0.22 µm) y se eluyó a través de cromatografía en columna Sílica gel 60 (Merck, Darmstadt, Alemania), con acetona: acetato de etilo (2:1) como eluyente, así como lo describe Cleusix y *col.*, 2007. Para la eliminación del eluyente la muestra solución fue sometida a rota-vaporización. Por último, el producto se almacenó a 4 °C en frascos ámbar hasta su cuantificación.

6.5 Cuantificación de reuterina.

La cuantificación de 3-HPA se realizó por el método colorimétrico descrito por Circle y col (1945). Para obtener la curvas de calibración, 0-6 µmol de acroleína (Fluka, Buchs, Suiza) se añadió a 6 mL de agua destilada. Luego, 4.5 mL de solución DL-triptófano (Solución 0.01 M en HCl 0,05 M) y 18 mL de HCl al 37%. Para cuantificación de 3-HPA, 1 mL de muestra se mezcló con 0.75 mL de solución de DL-triptófano y 3 mL de HCl 37%. Las mezclas que contenían las muestras y los estándares se incubaron durante 20 min en baño de agua a 37 °C y la densidad óptica se midió a 560 nm. Las muestras de 3-HPA se diluyeron con agua destilada antes de mezclar con reactivos para asegurar una DO₅₆₀ final <1. Este método permite una cuantificación precisa de 3-HPA usando acroleína como un estándar (Rutti y *col.*, 2010; Lüthi-Peng y *col.*, 2002). Los ensayos para la curva estándar y cuantificación de muestras se realizaron en triplicado.

6.6 Concentración de reuterina.

Las muestras de 3-HPA se congelaron en frascos de 100mL por inmersión en acetona más hielo seco a -40°C. Esas preparaciones se liofilizaron para reducir el volumen de agua en una liofilizadora (LABCONCO, Kansas City, MO) a 0.133 mBar a -40°C y almacenadas a -70°C hasta su utilización.

6.7 Ensayo de actividad antibacteriana.

La actividad antibacteriana se determinó por la técnica de microdilución con microplacas de 96 pozos. Usando esta técnica, los valores de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida se obtuvieron para reuterina contra los microorganismos bajo estudio. Todos los ensayos se realizaron en triplicado.

6.7.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

Se realizó por microdilución en placas de 96 pozos de fondo plano que contenían 120 µL de las diluciones seriadas de reuterina en caldo de cultivo específico para cada microorganismo (Tabla 1) y 80 µL de inóculo a una absorbancia de 0.1 (DO 600nm) correspondiente a 0.5 en la escala de McFarland, equivalente a 2×10^8 UFC/mL, alcanzando un volumen final de 200 µL por pozo; clorhexidina 0.12%, tetraciclina 5 µg/mL e hipoclorito de sodio 5% se utilizaron como controles positivos de inhibición de crecimiento bacteriano y caldo de cultivo se usó como control negativo. Por otra parte, el crecimiento microbiano se indicó como un cambio en la densidad óptica del inóculo. Las placas de 96 pozos se incubaron a 37°C según lo recomendado por la ATCC para cada microorganismo. La MIC se definió como la concentración más baja que inhibió el crecimiento bacteriano.

6.7.2 Concentración mínima bactericida (MBC).

Se tomaron 10 µL de cada ensayo realizado en la MIC, estos se inocularon en cajas de Petri conteniendo agar específico e incubado según lo recomendado por la ATCC para cada microorganismo. La MBC se definió como la concentración más baja donde no se observaron UFC en agar.

6.8 Ensayo de expresión de genes de virulencia.

Se partió de una densidad celular de 10^8 UFC/mL de *H. pylori* ATCC 700824 en 50 mL de caldo Brucella suplementado con 10% de SFB, se incubaron a 37°C por 72 horas en microaerofilia. Posteriormente, se transfirieron 5 mL a 3 tubos de 15 mL y se dispensaron 5 mL de bacteria en fase estacionaria más 5 mL caldo Brucella al control Negativo (calibrador), 50 µg/mL de reuterina (tratamiento) y se incubaron, se tomaron 1.5 mL a las 3 horas (tiempo 1) y 6 horas (tiempo 2) postratamiento para la extracción de RNA total.

6.8.1 Extracción de RNA.

1×10^9 bacterias se separaron por centrifugación a 4,000x g durante 10 minutos, luego se lavaron y resuspendieron en 100 µL de tampón Tris-EDTA 1x pH 7.4, se añadieron 100 µg de Lizosima (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 100 µg de Proteinasa K (Thermo-Fisher, Carlsbad, CA, USA) y se incubaron a 37°C durante 30 min, luego, se realizó la extracción de RNA total con Trizol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); 1 mL de Trizol, para asegurar la completa disociación de los complejos nucleoproteínicos se incubó por 5 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200 µL de Cloroformo, se mezcló vigorosamente por 15 seg protegiendo las muestras de la luz e incubación a temperatura ambiente durante 15 min. La mezcla resultante se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4°C, la centrifugación separó la mezcla en 3 fases; orgánica (proteínas) en el fondo, interfase (DNA) y Acuosa (RNA) en la superficie. Para el aislamiento de RNA, se transfirió la fase acuosa en un tubo Eppendorf, luego, se añadieron 500 µL de 2-propanol por 10 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, la mezcla se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4°C, posteriormente, se descartó el sobrenadante y se obtuvo el pellet, al cual se le añadió 1 mL de etanol al 75% y se repitió la centrifugación. Por último, se eliminó el etanol que contenía la muestra y el RNA se resuspendió en agua libre de nucleasas (Agua DEPC) y almacenado a -80°C hasta su utilización.

6.8.2 Cuantificación de RNA.

Se utilizó 1 μ L de RNA total para la cuantificación y determinación de su pureza en radios de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 8000 UV-Vis (Thermo-Fisher, Carlsbad, CA, USA).

6.8.3 Integridad de RNA.

Se diluyeron 5 μ L de RNA total con 1 μ L de tampón de carga 6X, la mezcla se transfirió al gel de agarosa al 1.3% en tampón TBE 1x, la corrida electroforética se realizó a 90 volts por 40 min, luego, se tiñó en solución de bromuro de etídio (5 μ g/mL) y por último, se transfirió a un transiluminador de luz ultravioleta Gel DocTM XR+ Imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), donde se visualizaron 2 bandas predominantes de RNA ribosomal, RNA de bajo peso molecular (0.1-0.3 Kb) y bandas de RNA de alto peso molecular (7-15 Kb).

6.8.4 Síntesis de DNA complementario (cDNA).

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit comercial M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). Se transfirieron 1 μ g de RNA total a tubos Eppendorf libres de RNAasa y se añadió 1 μ g de random primer hasta un volumen final de 14 μ L, luego la mezcla se calentó a 70°C por 5 min. Tras la incubación, la mezcla se enfrió en hielo y centrifugó brevemente, luego, se añadieron 5 μ L del buffer de reacción 5X M-MLV; 250mM Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, 50mM DTT. Además, 1.25 μ L dATP 10mM, 1.25 μ L dCTP 10mM, 1.25 μ L dGTP 10mM, 1.25 μ L dTTP 10mM, 25 unidades de inhibidor de ribonucleasa, 200 unidades transcriptasa reversa M-MLV, y agua DEPC hasta un volumen final de 25 μ L. Por último, la mezcla se incubó a 37°C durante 1 h. El cDNA sintetizado se almacenó en agua libre de nucleasas a -20°C hasta su uso.

6.8.5 PCR tiempo real.

Para el análisis de expresión génica por PCR en tiempo real, se diseñaron oligonucleótidos dirigidos a los genes *vacA*, *cagA*, *flaA*, *luxS* y como gen de referencia *16s* rRNA, las secuencias se obtuvieron de la base de datos del GenBank (NCBI), como se muestra en la Tabla 3.

Gen	Forward	Reverse	Temperatura de alineación (°C)
<i>vacA</i>	CCTACTGAGAATGGTGGCAATA	GTTCTTCACGAGAGCGTAGTT	55
<i>cagA</i>	GACCGACTCGATCAAATAGCA	TTAGCTGAAAGCCCTACCTTAC	55
<i>flaA</i>	CAGTATAGATGGTCGTGGGATTG	GAGAGAAAGCCTTCCGTAGTTAG	55
<i>luxS</i>	CTAAATTCTGTGCGCCCTCTAA	ACGATGCAAGACGTGCTAAA	55
<i>16s</i> rRNA	GGAGTACGGTCGCAAGATTA	CTAGCGGATTCTCTCAATGTCAA	55

Tabla 3. Especificaciones de los oligonucleótidos utilizados para los ensayos de RT-qPCR.

Para la validación de los oligonucleótidos, se determinó la eficiencia de la amplificación realizando diluciones seriadas desde 4 ng/μL hasta 0.004 ng/μL de cDNA, el valor de la pendiente (m) se obtuvo por análisis de regresión lineal simple. Se utilizó la ecuación siguiente: Eficiencia = $10^{-1/m}$, los datos se muestran en la Figura 3.

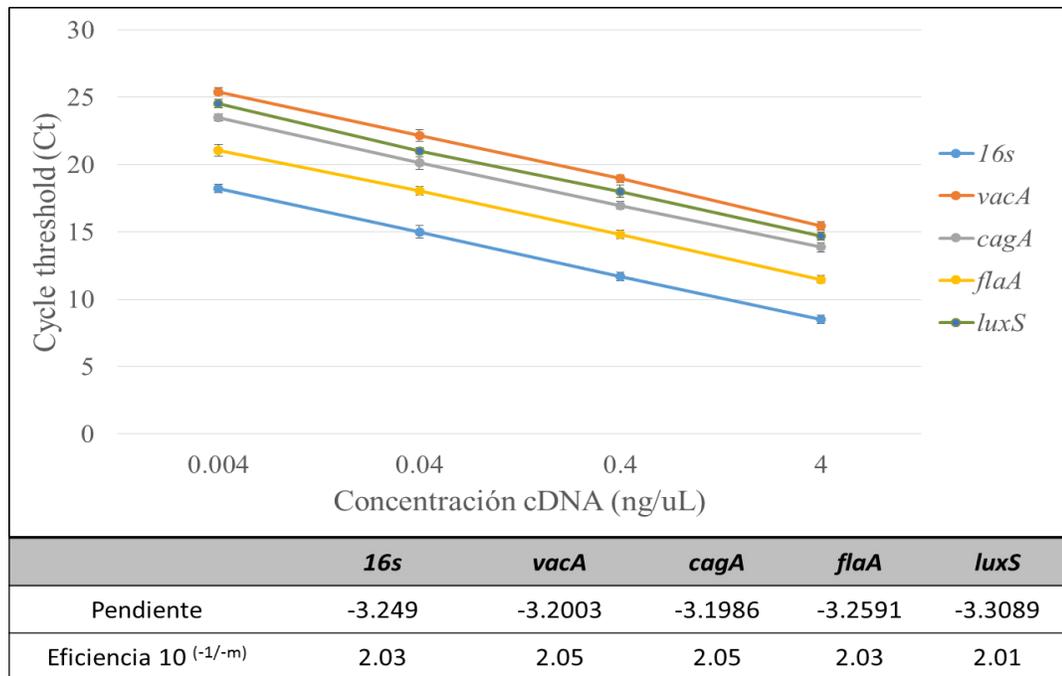


Figura 3. Eficiencia de la amplificación para los oligonucleótidos *16s* rRNA, *vacA*, *cagA*, *flaA* y *luxS*.

Además, se evaluó su especificidad a través de los picos de disociación, donde se determinó la temperatura para cada par de oligonucleótidos, fueron 80.4, 80.8, 81.1, 82.2 y 78.1 grados Celsius para *16s*, *cagA*, *flaA*, *luxS* y *vacA*, respectivamente.

Las reacciones de qPCR se realizaron en placas de 96 pozos, se utilizó 12.5 μ L de Maxima Sybr Green/qPCR master mix 2X (Thermo-Scientific, Carlsbad, CA, USA), 0.5 μ M de mezcla de primer forward/reverse, 100 ng de cDNA y agua libre de nucleasas a volumen final de 25 μ L, y se llevó a cabo en un termociclador LightCycler 480II (Roche, Basilea, Suiza), programado con el sistema de detección Sybr Green I en tres etapas; un ciclo de Pre-incubación, cincuenta ciclos de amplificación, un ciclo para la curva de disociación (melting) y un ciclo de enfriamiento. La pre-incubación fue a 95°C durante 10 min y descenso de 4°C/s, la amplificación se llevó a cabo con tres temperaturas: 95°C por 10 seg y descenso de 4°C/s, temperatura de alineación de acuerdo a los recomendado por cada par de primer (52-56°C) por 15 seg y descenso de 2°C/s, y finalmente a 72°C por 10 seg y descenso de 4°C/s en modo de adquisición individual. La curva de disociación fue a 95°C por 5 seg 4°C/s, 65°C por 1 min 2.2°C/s y por último, a 97°C en modo de adquisición continuo 5°C. La etapa de enfriamiento fue a 40°C por 30 seg y a 2 seg a 1.5°C/s. Mediante análisis de expresión relativa se calcularon los valores de ciclo umbral (Cycle threshold Ct) y radios normalizados por el método de $\Delta\Delta$ CT con ayuda del software LightCycler 480II (Roche, Basilea, Suiza) y Rest2009 (QIAGEN, Hilden, Alemania).

6.9 Cuantificación de citocinas proinflamatorias en PBMCs humanas tratadas con reuterina.

Se realizó toma de muestra sanguínea por punción intravenosa de la vena mediana cubital en un donante voluntario, el fluido se colectó en tubos conteniendo anticoagulante EDTA 7.2 mg (BD bioscience, San José, CA). Para la obtención de células monoculares se diluyeron 10 mL de sangre con 10 mL de tampón PBS 1x pH. 7.4 la mezcla se transfirió a un tubo de 50 mL conteniendo 20 mL de Ficoll-Hypaque PLUS (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) y posteriormente se centrifugó a 400x g a 20°C durante 30 min, luego, con ayuda de un pipeta serológica se extrajo la interfase entre plasma-Ficoll conteniendo las PBMCs, se lavaron 3 veces y por último se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 10% de SFB inactivado, 2 mM glutamina, 100 u/mL ampicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina a una concentración de 2×10^6 células/mL. Se dispensaron 400 μ L en placas de 24 pozos (1.9 cm²), se añadió medio de cultivo al control negativo, 100 ng/mL

LPS (*E. Coli*, O55:B5, Sigma-Aldrich) al control positivo, 100 µg/mL y 50 µg/mL de reuterina como tratamiento. La placa se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 hrs, luego, se colectó el sobrenadante mediante centrifugación y se almacenó a -70 °C hasta su uso. Posteriormente, se realizó la cuantificación de citocinas proinflamatorias Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF-α) e Interleucina 6 (IL-6) mediante kit ELISA (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6. 10 Ensayo de citotoxicidad de reuterina en línea celular Hs 738.St/Int y PBMCs humano.

Se evaluó el efecto de la reuterina a diferentes concentraciones sobre la viabilidad celular en las líneas Hs 738.St/Int por el método de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en microplacas de 96 pozos. Se partió de cultivos celulares confluentes contenidos en frascos de 25 cm², se descartó el medio utilizando una pipeta serológica de 5 mL, seguido, se aplicaron dos lavados a la capa celular con solución PBS (0.004% EDTA), inmediatamente, se añadieron 500 µL de Tripsina-EDTA (0.05%) y se incubaron a 37°C por 15 min; después de lograr dispersión celular observable al microscopio invertido, se realizó recuento celular mediante tinción con azul de tripano, mezclando 20µL de suspensión celular con 20µL de azul de tripano al 0.4% (Gibco, Carlsbad, CA, USA), montaje en cámara de Neubauer y lectura bajo el microscopio a 40x para determinar el promedio de células dentro de los 4 cuadrados grandes angulares, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Numero de células} = \left(\frac{\bar{X}_{\text{Células en 4 cuadrados grandes}}}{\text{Superficie} \times \text{Dilución} \times \text{Profundidad}} \right) \times \left(\frac{2000}{20} \right)$$

Dónde:

\bar{X} = Promedio. Superficie= 1 mm². Profundidad= 0.1 mm. Dilución= 1/2

Se sembraron 5,000 células viables en cada pozo de la placa en medio Dulbecco's Modified Eagle's (d-MEM) suplementado al 10% de suero fetal bovino, se incubaron a 37°C, 5% CO₂ hasta obtener confluencia (48-72 hrs), posteriormente se aplicó reuterina y se incubaron las placas durante 24 y 48 hrs, luego se descartó el medio utilizando y se aplicó un lavado a la capa celular con solución PBS (0.004% EDTA), luego se adicionaron 30 µL de MTT (3 mg/mL) a cada pozo, se incubaron por 1 h y por

último, se añadieron 200 μL de dimetil sulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán. La lectura de la placa se realizó a 570nm en un lector de microplacas Smart Spectrophotometer plus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

$$\% \textit{citotoxicidad} = \left[\frac{(A - B)}{A} \right] \times 100$$

Dónde:

A = Absorbancia de células sin tratar. B= Absorbancia de células tratadas.

6.11 Análisis estadístico.

Se utilizó el paquete estadístico SPSS v.22 para obtener los valores promedios, desviaciones típicas, posteriormente se empleó la prueba ANOVA de una vía para evaluar el nivel de significancia de la diferencia entre la media de los grupos de los que constaba el experimento (control y tratamientos). En los casos que se encontró diferencia entre los grupos, se empleó la prueba de *t* de Student para evaluar el nivel de significancia de la diferencia de la media entre los tratamientos y del grupo control contra cada una de las concentraciones de los compuestos (tratamiento).

VII. RESULTADOS

Se evaluó la producción de reuterina, metabolito producido por la cepa bacteriana *Lactobacillus reuteri* ATCC55730 desde las 14 hrs hasta 20 hrs en su fase estacionaria de crecimiento utilizando el pellet celular, así como, sobrenadante. La mayor producción se obtuvo utilizando el pellet celular a las 18 hrs $152.96 \pm 3.7 \mu\text{g/mL}$, seguido de las 14 hrs, 20 hrs y 16 hrs, con $128.86 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$, $123.36 \pm 10.4 \mu\text{g/mL}$, $77.16 \pm 17.0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Sin embargo, se obtuvo una baja producción de reuterina cuando se utilizó sobrenadante libre de células, las máxima fue a las 20 hrs con $19.86 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$. El análisis de *t* de Student determinó diferencias significativas $p \leq 0.01$ entre los grupos, como lo muestra la Figura 4.

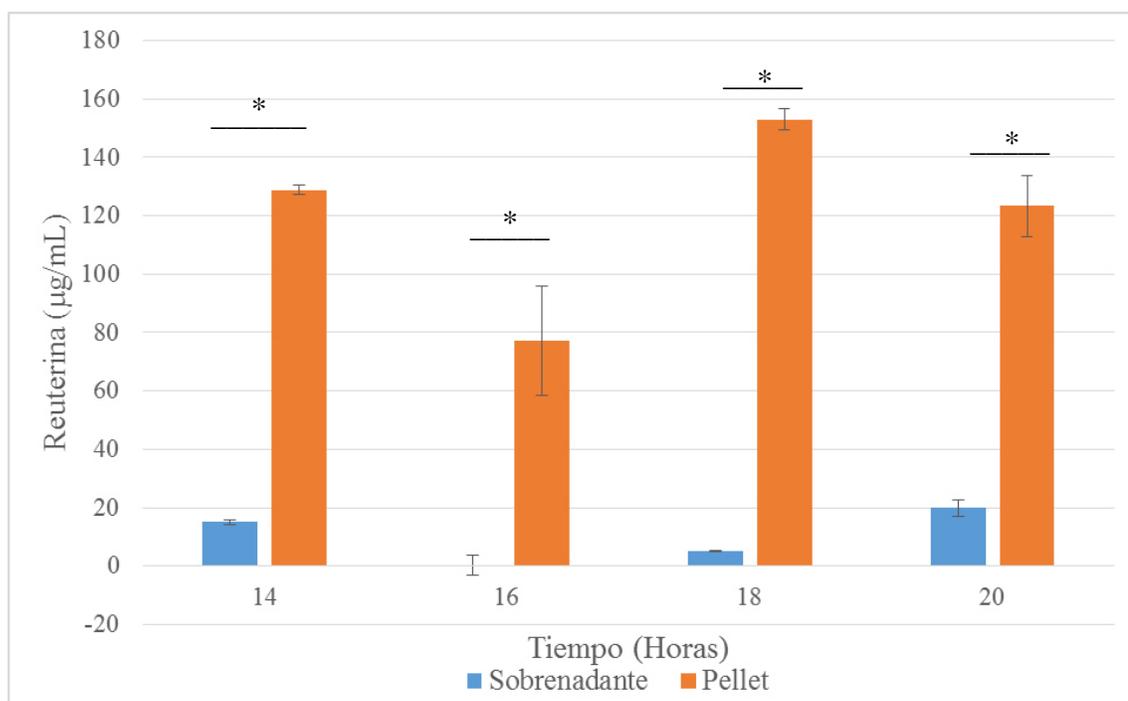


Figura 4. Cuantificación de reuterina, de pellet (rojo) y sobrenadante (azul) durante la fase exponencial de *L. reuteri*. Datos se muestran como la media (\pm) desviación estándar. * $p \leq 0.01$

Para la concentración mínima inhibitoria (MIC), se realizaron diluciones seriadas de reuterina contra *H. pylori* partiendo de una concentración bacteriana correspondiente al 0.5 en la escala de McFarland ($\text{DO} = 0.1$, 10^8 UFC/mL). La MIC fue de $95.15 \mu\text{g/mL}$ al 100% de inhibición, además se observó 50% de inhibición a $60.55 \mu\text{g/mL}$, datos se muestran en la Figura 5.

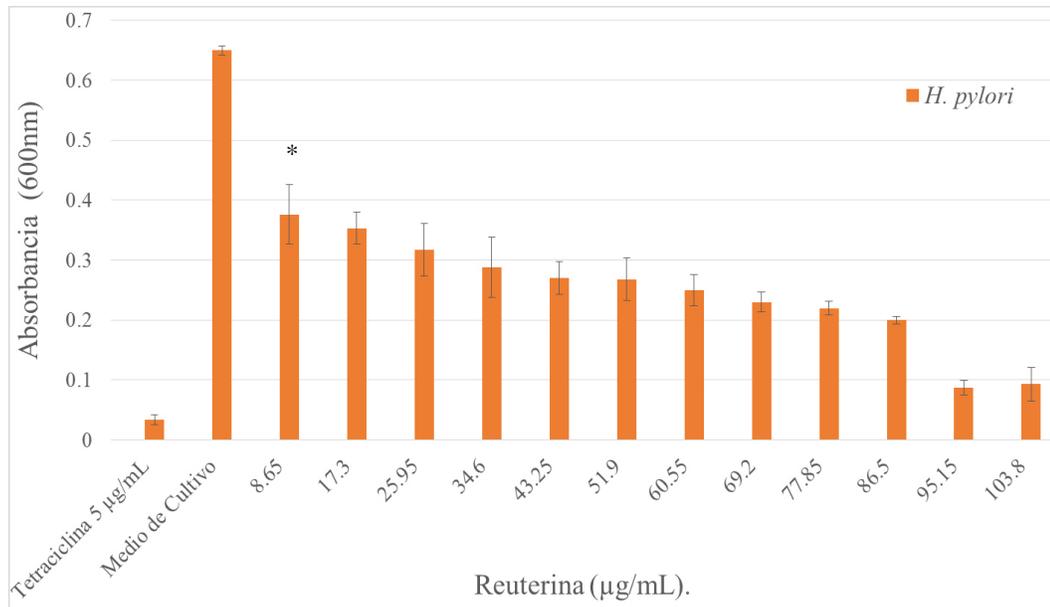


Figura 5. Concentración Mínima Inhibitoria de reuterina contra *H. pylori* ATCC700824, tetraciclina 5 µg/mL como control positivo y caldo de cultivo control negativo. Datos se muestran como la media (\pm) desviación estándar.

La MIC para los patógenos orales *A. naeslundii* y *T. forsythia* fue de 80.1 µg/mL, en ambos, sin embargo, desde 13.9 µg/mL se observa un efecto inhibitorio significativo $p \leq 0.05$ respecto al control negativo, como lo muestra la Figura 6.

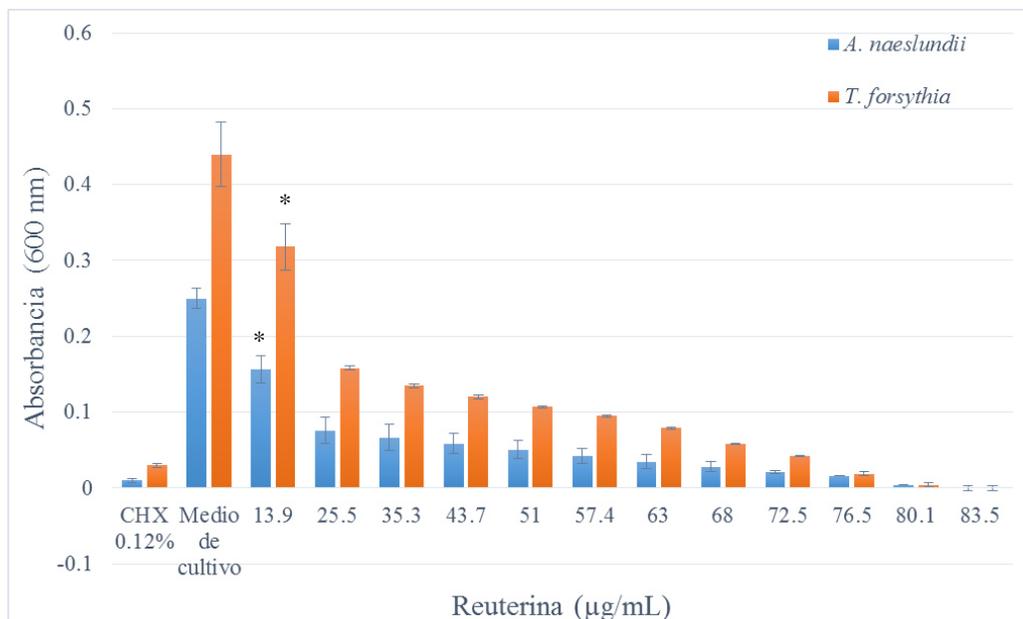


Figura 6. Concentración Mínima Inhibitoria de reuterina contra *T. forsythia* ATCC43037 y *A. naeslundii* ATCC51655, Clorhexidina 0.12% como control positivo y caldo de cultivo control negativo. Datos se muestran como la media (\pm) desviación estándar. * $p \leq 0.05$.

La MIC para los patógenos orales *E. faecalis* y *P. endodontalis* fue de 86.5 µg/mL y 95.15 µg/mL, respectivamente, sin embargo, se observó inhibición significativa a 8.65 µg/mL en *E. faecalis* $p \leq 0.05$, como se muestra en la Figura 7.

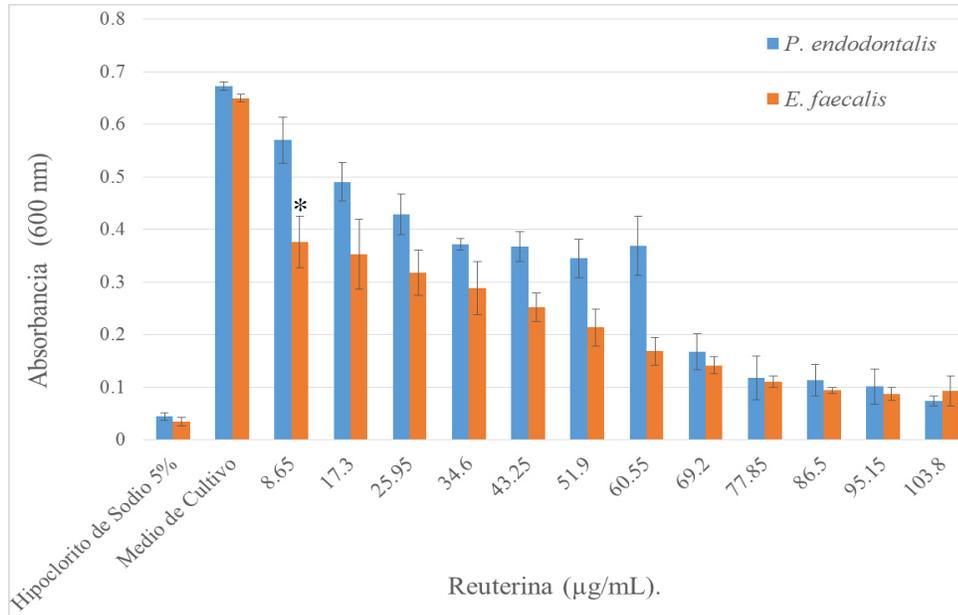


Figura 7. Concentración Mínima Inhibitoria de reuterina contra *P. endodontalis* ATCC35406 y *E. faecalis* ATCC29212, solución de hipoclorito de sodio 5% como control positivo y caldo de cultivo control negativo. Datos se muestran como la media (\pm) desviación estándar.

Se establecieron las concentraciones bactericidas (MBC) de reuterina contra las bacterias patogénicas en estudio mediante método de siembra en Agar, > 95 µg/mL para *H. pylori* a las 72 hrs. Además, se determinó la dosis microbicida contra patógenos orales a las 24 hrs, a dosis mayores a 61.0 µg/mL, 83.7 µg/mL, 80.55 µg/mL y 81.9 µg/mL para *A. naeslundii*, *T. forsythia*, *P. endodontalis* y *E. faecalis*, respectivamente, datos se muestran en la Tabla 4.

Patógeno	Resultados	
	MBC (µg/mL)	Bacteriostática (µg/mL)
<i>H. pylori</i> ATCC [®] 700824 TM	> 95	≤ 95
<i>T. forsythia</i> ATCC [®] 43037 TM	> 83.7	≤ 83.7
<i>A. naeslundii</i> ATCC [®] 51655 TM	> 61.0	≤ 61.0
<i>P. endodontalis</i> ATCC [®] 35406 TM	> 80.55	≤ 80.55
<i>E. faecalis</i> ATCC [®] 29212 TM	> 81.9	≤ 81.9

Tabla 4. Concentración Mínima Bactericidas de reuterina contra todos los patógenos bajo estudio.

Para la determinación del efecto en la expresión de los genes de virulencia, se evaluó la expresión de los genes *vacA*, *cagA*, *luxS* y *flaA* en *H. pylori*, a dosis de 50 µg/mL de reuterina en fase estacionaria de cultivo bacteriano, el efecto se evaluó a las 3 y 6 hrs post-tratamiento. Se obtuvieron los radios normalizados respecto al gen de referencia *16s* rRNA mediante cuantificación relativa. Se observó una disminución altamente significativa en la expresión de los genes *vacA* y *flaA* a las 3 y 6 hrs postratamiento $p \leq 0.01$. Sin embargo, para el gen *luxS* se observó disminución significativa a las 3 hrs $p \leq 0.05$ y posteriormente a las 6 hrs estabilizó su expresión. Por último, para el gen *cagA* no presentó diferencias estadísticamente significativa ($p > 0.05$), como se muestra en la Figura 8.

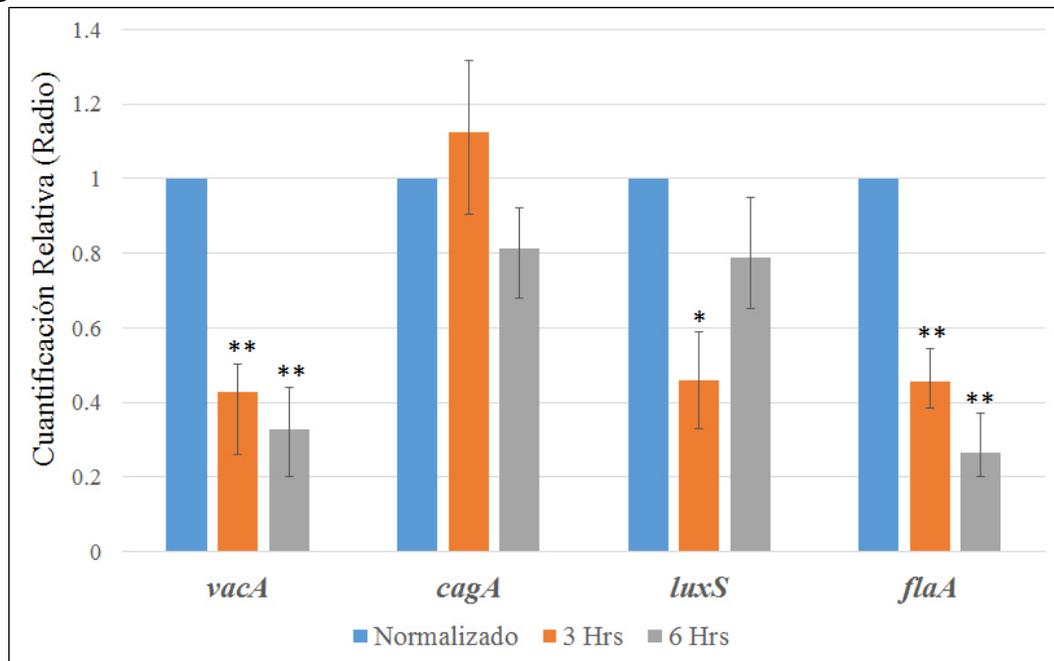


Figura 8. Cuantificación relativa de los genes de virulencia *vacA*, *cagA*, *luxS* y *flaA* bajo tratamiento con reuterina, *16s* rRNA se utilizó como gen de referencia. Los datos se obtuvieron mediante el método de $\Delta\Delta Ct$. Los datos se muestran como la Media \pm error. ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$

Se evaluó la citotoxicidad de la reuterina desde 3.4 mg/mL hasta 220 µg/mL contra la línea celular de fibroblastos de estómago e intestino humano Hs 738.St/Int. La dosis citotóxica 50 (CD50) fue de 1.1 mg/mL a las 24 hrs y 810 µg/mL a las 48 hrs postratamiento, los datos se muestran en la Figura 9.

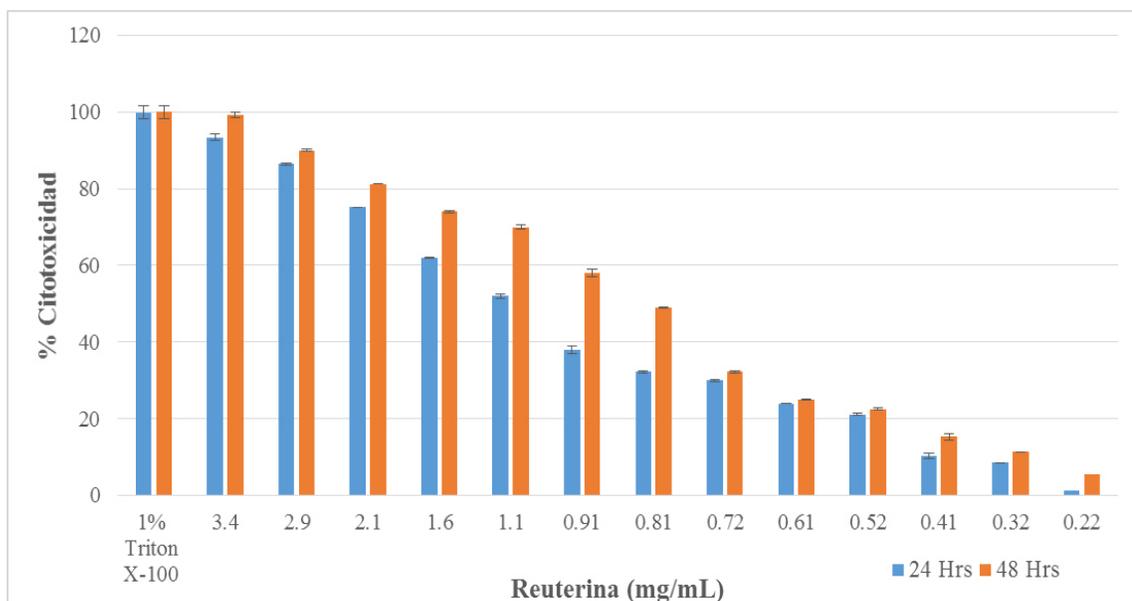


Figura 9. Porcentaje de citotoxicidad de reuterina sobre la línea celular de Hs 738.St/Int humano a las 24 y 48 hrs postratamiento, como control positivo 1% de Triton X-100. Datos se muestran como la media (\pm) desviación estándar.

Además, la citotoxicidad se evaluó contra células mononucleares humanas PBMCs a dosis desde 6.5 mg/mL hasta 10 μ g/mL. Las dosis citotóxica 50 (DC50) fue de 5.5 mg/mL tanto a las 16 hrs como a las 24 hrs, se muestran los datos en la Figura 10.

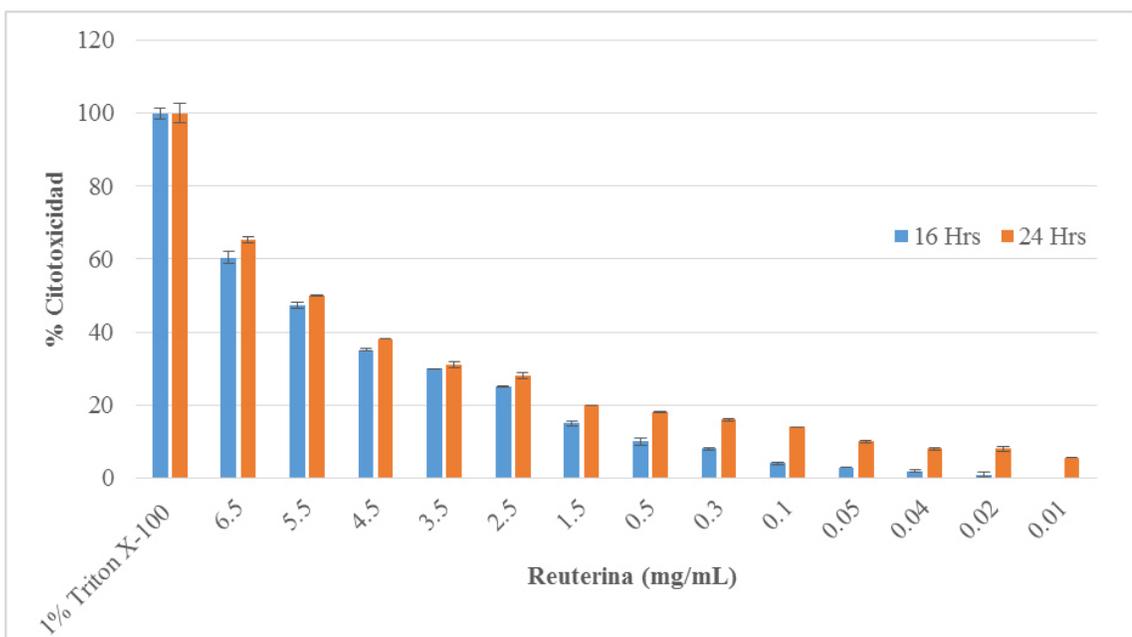


Figura 10. Porcentaje de citotoxicidad de reuterina sobre PBMCs humanas a las 16 y 24 hrs postratamiento, como control positivo 1% de Triton X-100. Datos se muestran como la media (\pm) desviación estándar.

Se evaluó la actividad anti-inflamatoria mediante cuantificación de citocinas presentes en el sobrenadante de PBMCs humanas tratadas con reuterina en diferentes tiempos mediante ELISA. En los grupos tratados con reuterina no se observó una diferencia significativa respecto al control $p > 0.05$. En los grupos tratados con 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ de reuterina más LPS, la producción de $\text{TNF-}\alpha$ fue de $175 \pm 2.1 \text{ pg/mL}$ y $100 \pm 2.5 \text{ pg/mL}$, respectivamente, esto a las 24 hrs. Se observó una reducción significativa respecto al control positivo LPS $p \leq 0.01$, todos los datos se muestran en la Figura 11.

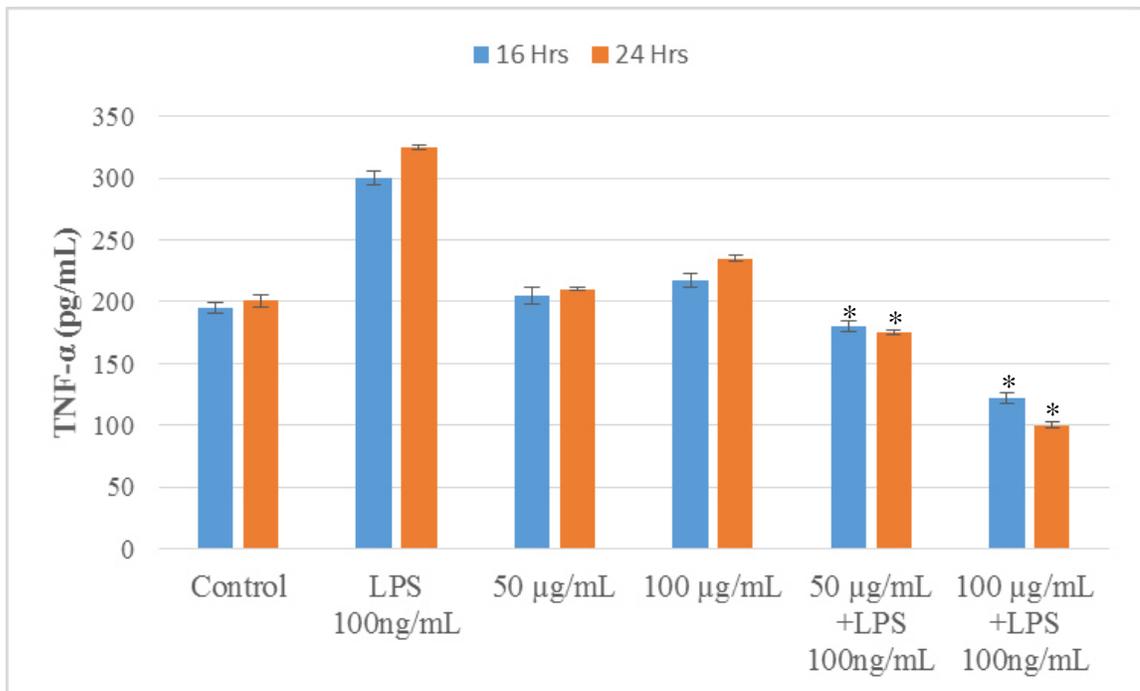


Figura 11. Producción de $\text{TNF-}\alpha$ en células mononucleares de sangre periférica humana (2×10^6 células) tratadas con 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ de reuterina, LPS 100 ng/mL como control positivo y medio de cultivo control negativo a las 16 y 24 horas post-tratamiento. * $p \leq 0.01$

Además, se cuantificó la producción de IL-6, en el grupo tratado con 100 $\mu\text{g/mL}$ de reuterina más LPS, la producción de IL-6 fue de $73 \pm 2.5 \text{ pg/mL}$, esto a las 24 hrs. Se observó una reducción significativa respecto al control positivo LPS $p \leq 0.01$, todos los datos se observan en la Figura 12.

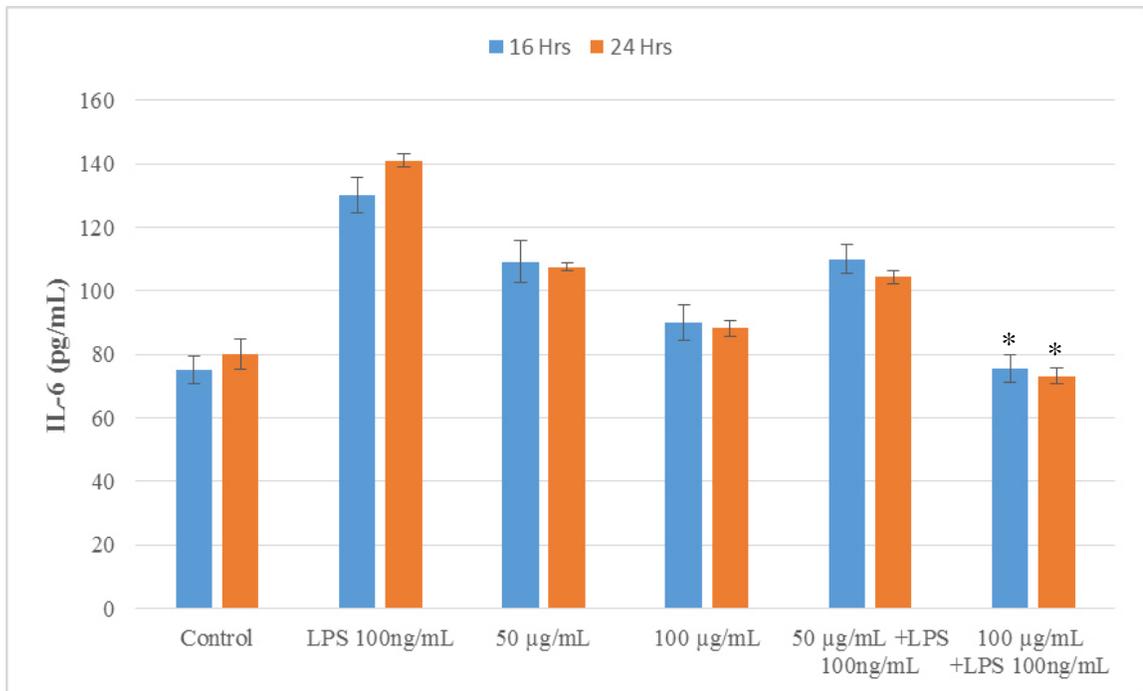


Figura 12. Producción de IL-6 en células mononucleares de sangre periférica humana (2×10^6 células) tratadas con $50 \mu\text{g/mL}$ y $100 \mu\text{g/mL}$ de reuterina, LPS 100 ng/mL como control positivo y medio de cultivo control negativo a las 16 y 24 horas postratamiento. $*p \leq 0.01$

VIII. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la producción de reuterina durante la fase estacionaria de *L. reuteri* ATCC55730, nuestros resultados son muy similares a los obtenidos por Cleusix y *col.*, quienes obtuvieron 170 µg/mL de reuterina de la cepa *L. reuteri* SD2112, sin embargo, utilizaron el pellet de 14 horas con 200mM de glicerol y para la purificación cromatografía en columna de gel sílice 60. Por otra parte, nuestros reportes difieren de Arques y *col.*, quienes obtuvieron concentraciones de 40 µg/mL de reuterina de *L. reuteri* Pro 137, utilizando cultivos de 16 horas con 100mM de glicerol. Esto sugiere que la fase de crecimiento del cultivo, así como, la concentración de substrato es fundamental en la bio-producción de este metabolito.

La importancia de probióticos para el tratamiento con la infección por *H. pylori* está ampliamente documentado, sin embargo la actividad antimicrobiana que pudieran tener los metabolitos y/o compuestos secretados no ha sido evaluada completamente.

En este estudio, la concentración de reuterina se determinó por un método desarrollado originalmente para la cuantificación de acroleína, usando la formación de un complejo coloreado entre acroleína/HPA y triptófano. Este método ha sido usado por muchos autores como Vollenweider y *col.*, (2004). La MIC y MBC de reuterina contra *H. pylori* se determinó usando un ensayo de microdilución en placa.

No existen antecedentes de la actividad antimicrobiana de reuterina contra *H. pylori*, sin embargo, ha sido evaluada contra *E.coli* así como en otras bacterias Gram-negativas. Especies del género *Bacteroides*, una de las más importantes especies en el tracto gastrointestinal, fue inhibida a concentraciones mínimas de 7.5 mM. Reuterina ha demostrado ser efectiva contra *E.coli* entero hemorrágica (EHEC), además, un estudio demostró poseer actividad contra *C. jejuni* y reportaron la reducción de 4 log a las 24 h (Arques y *col.*, 2004). Otros microorganismos Gram-negativos mostraron ser afectados por reuterina como *Salmonella sp.*, *Vibrio Cholera*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomona sp.*, and *Shigella sp* (Chung y *col.*, 2011). Nuestros resultados demuestran una moderada actividad antibacteriana contra *H. pylori*, esto pudiera atribuirse a la habilidad de *H.pylori* para resistir los cambios en el pH porque la reuterina es activa a pH menor a 6.

Por otra parte, la utilización del probiótico completo ha demostrado ser efectiva, en 2007 un estudio realizado por Imase y *col.*, mediante ensayos clínicos con grupos de pacientes infectados que fueron tratados con tabletas de *L. reuteri* SD2112, donde se observó disminución de la actividad ureasa, además de lo reportado por Dore y *col.*, quienes combinando tabletas de *L. reuteri* DSM 17938 20mg con el tratamiento convencional en pacientes infectados, obtuvieron un aumento en la eficiencia terapéutica. Sin embargo, existen reportes de la actividad antimicrobiana de reuterina contra patógenos bacterianos como *P. aeruginosa*, reportado por Liang y *col.*, MIC 130 µg/mL y MBC 180 µg/mL, así también, en *L. monocytogenes* MIC de 16 a 24 µg/mL según lo reportado por Montiel y *col.*, y en *C. jejuni* en base a lo descrito por Nazef y *col.*, utilizaron el sobrenadante libre de células producido por *L. reuteri* observando una importante actividad contra este patógeno del tracto gastrointestinal.

Nuestro trabajo permitió establecer las dosis inhibitoria y bactericidas, además de mostrar el posible papel que poseen los compuestos secretados por *L. reuteri* como reuterina para mantener una microbiota gastrointestinal saludable mediante la prevención de sobrecrecimiento gastrointestinal por otros microorganismos comensales y patógenos, como *H. pylori*.

Nuestro estudio evaluó el efecto de reuterina contra patógenos cariogénicos, tanto *T. forsythia* como en *A. naeslundii*, nuestros resultados coinciden con lo reportado por Kang y *col.*, sin embargo, éstos utilizaron el sobrenadante libre de células de la cepas *L. reuteri* KCTC3594 y KCTC 3678 y atribuyeron ese efecto a los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Por otra parte, existen estudios donde se ha utilizado la bacteria probiótica, como el realizado por Baca y *col.*, quienes obtuvieron inhibición del crecimiento contra los mismos patógenos a una concentración celular de 10^7 bacterias/mL mediante el método de difusión en agar. El presente estudio se corrobora con muchos otros que también demuestran actividad antimicrobiana de moléculas y/o metabolitos (Reid *et al.*, 2004).

El uso de probióticos para luchar contra las bacterias patógenas no sólo se basa en su capacidad para competir por nichos, incluidos los tejidos del huésped y las propiedades antimicrobianas, alternativas a matar o competencia por nichos también son posibles.

Laughton y col., (2006) demostraron la capacidad de los sobrenadantes de *L. reuteri* para inhibir la expresión de *sslII* gen en *S. aureus* a través de moléculas de señalización célula-célula. En otro estudio, Ryan y col., (2009) demostraron que *L. salivarius* desregula significativamente el gen de virulencia *cag* en *H. pylori*.

El enfoque de este estudio fue evaluar el efecto de la reuterina en la expresión de genes de virulencia en *H. pylori*. La expresión de *vacA* podría estar implicado en las enfermedades gastroduodenales por la inflamación, la citotoxicidad y apoptosis. La inhibición de la expresión observada en este estudio abre la posibilidad de regulación de los procesos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios que participan en la producción de citotoxina *vacA* que podrían contribuir a la reducción de los síntomas y la prevención de enfermedades malignas. La inhibición de la expresión génica en *flaA* y *luxS* a bajas concentraciones de reuterina sugiere que los procesos de modulación pueden estar ocurriendo a nivel transcripcional. Hay informes que demostraron que los mutantes deficientes para *flaA* exhiben pérdida completa de la motilidad y una reducción significativa en la colonización del epitelio gástrico. Además, se ha demostrado que *luxS* está implicada en la regulación transcripcional y biosíntesis flagelar. En este estudio, el aumento de la expresión de los genes *luxS* observados a las 6 horas post-tratamiento puede ser debido a un proceso de compensación en respuesta a la inhibición de *flaA*.

En este estudio se obtuvo una baja citotoxicidad en fibroblastos de estómago e intestino y células mononucleares humanas, con menor toxicidad en esta última, estableciendo un efecto dosis dependiente, estos datos son consistentes a lo reportado por Prince y col., quienes demostraron las propiedades protectoras de *L. reuteri* ATCC55730 en queratinocitos infectados con *S. aureus*, aumentando la viabilidad celular ($P > 0.05$) en comparación a las células sin tratar, ellos sugieren que la capacidad protectora se debe a la capacidad de adherencia a las células. No existían reportes sobre la dosis citotóxica 50 de reuterina en células humanas hasta este estudio. Además, se observó una disminución en la producción de TNF- α e IL-6 sobre PBMCs estimuladas con LPS respecto al grupo control, demostrando una importante actividad anti-inflamatoria que puede estar relacionada directamente a la toxicidad, múltiples estudios han demostrado este efecto, sin embargo, han utilizado la bacteria y no reuterina, como lo realizado por Liu y col., en

monocitos humanos y keratinocitos estimulados con LPS, quienes obtuvieron una reducción significativa de IL-8 y TNF α respecto al grupo control estimuladas sin tratar esto en un modelo murino. Un trabajo realizado por O'Mahony y *col.*, demostró que las bacterias probióticas pueden inducir la proliferación de Treg en la mucosa intestinal, lo que puede sugerir que metabolitos secretados como reuterina pueden realizar la misma función, y reducir la inflamación en epitelio y/o mucosas.

IX. CONCLUSIONES

- La reuterina producida por *L. reuteri* posee actividad antimicrobiana inhibitoria moderada y microbicida contra *Helicobacter pylori* y patógenos asociados a infección en la cavidad oral desde dosis bajas y resultó mayor a la reportada en otros estudios.
- A dosis bajas es capaz de reprimir significativamente la expresión de genes de virulencia *vacA*, *flaA* y *luxS*, esenciales en el mecanismo de señalización.
- Reuterina presentó citotoxicidad en fibroblastos de estómago e intestino y en células mononucleares humanas, sin embargo, a bajas concentraciones presentó actividad anti-inflamatoria una disminución en la producción de TNF α e IL6 sobre PBMCs estimuladas con LPS.

X. PERSPECTIVAS

Es muy importante realizar un estudio profundo sobre los mecanismos moleculares por los cuales la reuterina es capaz de reprimir la expresión de los genes de virulencia e inhibir el crecimiento de *H. pylori*, así como, rutas metabólicas que puedan intervenir en estos procesos a través de ensayos *in vitro*. Por otra parte, la reuterina pudiera ser aplicable en ensayos *in vivo* en ratones infectados para la evaluación de su capacidad anti-*H. pylori* y profiláctica gracias a su efecto microbicida contra patógenos orales.

La actividad antiinflamatoria de la reuterina en células gástricas humanas la perfila como una buena alternativa terapéutica sola y/o en combinación a la terapia convencional para obtener mayores tasas de erradicación, menores efectos adversos, así como, atenuar la expresión de los genes de virulencia más importantes en el desarrollo de procesos inflamatorios y malignos en la mucosa gástrica y/o a nivel de bucal. Además, se requieren estudios que evalúen la fármaco-cinética y biodistribución de esta molécula.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Abdo-Francis. III Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Rev Gastroenterol Mex.* 2007;72(3).

Alsahli M, Michetti P. Lactobacilli for the management of *Helicobacter pylori*. *Nutrition* 2001; 17: 268-269

Atherton J, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vaca, the vacuolating cytotoxin gene in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 1997; 112: 92 – 99.

Arqués JL, Fernández J, Gaya P, Nuñez M, Rodríguez E, Medina M. Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology.* 2004; 95(2):225-229.

Baca-Castanon ML, De la Garza-Ramos MA, Alcazar-Pizana AG, Grondin Y, Coronado-Mendoza A, Sanchez-Najera RI, et al. Antimicrobial Effect of *Lactobacillus reuteri* on Cariogenic Bacteria *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, and Periodontal Diseases *Actinomyces naeslundii* and *Tannerella forsythia*. *Probiotics and antimicrobial proteins.* 2015;7(1):1-8.

Bauerfeind P, Garner R, Dunn B, Mobley H. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut.* 1997;40: 25-30.

Beasley SS, Saris PEJ. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004;70(8):5051-5053.

Beswick E, Suarez G, Reyes V. *Helicobacter pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2006;12:5599-5605.

Bhatia SJ, Kochar N, Abraham P, Nair NG, Mehta AP. *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2328-2330

Blanchard T, Nedrud J. Laboratory maintenance of *Helicobacter* species. *Current Protocols in Microbiology.* 2012; supplement 24.

Blaser MJ, Pérez-Pérez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *caga* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 1995; 55: 2111 – 15.

Byrd JC, Yunker CK, Xu QS, Sternberg LR, Bresalier RS. Inhibition of gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2000; 118: 1072-1079.

Camargo MC, et al. The Problem of *Helicobacter pylori* Resistance to Antibiotics: A Systematic Review in Latin America. *Am J Gastroenterol*. 2014;109:485–495.

Carey CM, Kostrzynska M, Ojha S, Thompson S. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Microbiological Methods*. 2008;73(2):125–32.

Casas IA, Dobrogosz WJ. Validation of probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microb Ecol Health Dis*. 2000;12:247-285

Cerda O, Rivas A, Toledo H. *Helicobacter pylori* strain ATCC700392 encodes a methyl-accepting chemotaxis receptor protein (MCP) for arginine and sodium bicarbonate. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;224:175–81.

Cerezo S, Ponce M y Gutiérrez G. Diagnóstico microbiológico, serológico, genotipificación de *Helicobacter pylori* aislado de biopsias de niños y adultos. Detección molecular de la isla de patogenicidad *cag* de *Helicobacter pylori*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2006;2:99–104.

Chiarini A, Calà C, Bonura C, Gullo A, Giuliana G, Peralta S, D'Arpa F, Giammanco A. Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from Western Sicily, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; 28: 437 - 46.

Chromvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripa B, Tor-Udom S, Vilaichone RK. Prevalence of *Helicobacter pylori vaca, caga, cage, icaa* and *baba2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int J Infect Dis* 2008;1: 30 – 6.

Chung TC, Axelsson L, Lindgren SE, Dobrogosz WJ. In Vitro Studies on Reuterin Synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2011; 2(2).

Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Duboux M, Le Blay G: Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC microbiology*. 2007;7:101.

Circle SJ, Stone L, Boruff CS. Acrolein Determination by Means of Tryptophane. A Colorimetric Micromethod. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* 1945; 17(4):259-262.

Cremonini F, Di Caro S, Covino M, Armuzzi A, Gabrielli M, Santarelli L, Nista EC, Cammarota G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Effect of different probiotic preparations on anti-*Helicobacter pylori* therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(11):2744–2749.

Croxen MA, Sisson G, Melano R, Hoffman PS. The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor tlpb (HP0103) is required for ph taxis and for colonization of the gastric mucosa. *J Bacteriol.* 2006;188:2656–65.

Cole SP, Harwood J, Lee R, She R, Guiney DG. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2004;186(10):3124–3132

Doherty NC, Shen FF, Halliday NM, Barrett DA, Hardie KR, Winzer K, Atherton JC. In *Helicobacter pylori*, luxS is a key enzyme in cysteine provision through a reverse transsulfuration pathway. *J Bacteriol.* 2010;192:1184–92.

Dore MP, Cucu M, Pes GM, et al. *Lactobacillus reuteri* in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Intern Emerg Med.* 2013; 9(6):649-54.

Doyle J, Evans J and Evans D. *Helicobacter pylori* caga: Analysis of sequence diversity in relation to phosphorylation motifs and implications for the role of caga as a virulence factors. *Helicobacter.* 2001; 6: 187 – 98.

Dunn BE, Cohen H, and Blaser MJ. Blaser. *Helicobacter pylori.* *Clin. Microbiol. Rev.* 1997;10(4):720.

Dye B, Kruszon-moran D, Mcquillan G. The relationship between periodontal disease attributes and *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. *Am J Public Health.* 2002; 92(11): 1809–1815.

Elliott SN, Buret A, McKnight W, Miller MJ, Wallace JL. Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats. *Am J Physiol* 1998; 275: G425-G432

Erzin Y, Koksali V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vaca*, *caga*, *baba* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter.* 2006; 11: 574 - 80.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0 (accessed aug 2014), Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC cancer base No.10 (Internet). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from <http://globocan.iarc.fr>.

Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: joint FAO/WHO Working Group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Accessed October 1, 2010. Available from: <http://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.

Forsyth MH, Cover TL. Intercellular communication in *Helicobacter pylori*: luxS is essential for the production of an extracellular signaling molecule. *Infect Immun*. 2000;68:3193–9.

Gill HS. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 755-773.

Gonzalez JE, Keshavan ND. Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70:859–75.

Gotteland M, Brunser O, Cruchet S. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1077-1086

Guruge JL, Falk PG, Lorenz RG, Dans M, Wirth HP, Blaser MJ, Berg DE, Gordon JI. Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3925-3930.

Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ, Blum S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte cocultures. *Gut* 2000; 47: 79-87.

He Y, Frye JG, Strobaugh TP, Chen CY. Analysis of AI-2/luxS-dependent transcription in *Campylobacter jejuni* strain 81–176. *Foodborne Pathog Dis*. 2008;5:399–415.

Hernández F, Monge-Nájera J. Ultrastructure of the bacteria *Campylobacter* and *Helicobacter*: implications for the phylogeny of mammal gastric bacteria. *Rev Biol Trop*. 1994;42:85-92.

Imase K, Tanaka A, Tokunaga K, Sugano H, Ishida H, Takahashi S. Lactobacillus reuteri tablets suppress *Helicobacter pylori* infection--a double-blind randomised placebo-controlled cross-over clinical study. *Kansenshogaku Zasshi*. 2007;81(4):387-93

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69–90.

Joyce EA, Bassler BL, Wright A. Evidence for a signaling system in *Helicobacter pylori*: detection of a luxs-encoded autoinducer. *J Bacteriol.* 2000;182:3638–43.

Kang MS et al. Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. *J Microbiol.* 2011;49(2):193-9

Kieran A. Ryan et al. *Lactobacillus salivarius* modulates cytokine induction and virulence factor gene expression in *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol.* 2009;58:996-1005.

Kim N, Kim JJ, Choe YH, Kim HS, Kim JI, Chung IS. Diagnosis and treatment guidelines for *Helicobacter pylori* infection in Korea. *Korean J Gastroenterol.* 2009; 54(5): 269-78.

Kuo CH et al. Long-Term Use of Probiotic-Containing Yogurts Is a Safe Way to Prevent *Helicobacter pylori*: Based on a Mongolian Gerbil's Model. *Biochem Res Int.* 2013;2013:594561.

Laughton JM, Devillard E, Heinrichs DE, Reid G, McCormick JK. Inhibition of expression of a staphylococcal superantigen-like protein by a soluble factor from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology.* 2006;152(Pt 4):1155-67.

Lee WK, Ogura K, Loh JT, Cover TL and Berg DE. Quantitative effect of luxs gene inactivation on the fitness of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:6615–22.

Lesbros-Pantoflickova D, Corthésy-Theulaz I, Blum AL. *Helicobacter pylori* and probiotics. *J Nutr* 2007; 137 (Suppl 2):S812-818.

Liang HF, et al. Natural antimicrobial agent (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* for sanitization of biological tissues inoculated with *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol Bioeng.* 2003;84(2):233-9

Liu Y, et al. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* strains differentially reduce intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 299(5): G1087–G1096

Li J, Wang W, Xu SX, Magarvey NA, McCormick JK. Lactobacillus reuteri-produced cyclic dipeptides quench agr-mediated expression of toxic shock syndrome toxin-1 in staphylococci. *PNAS*. 2011;108(8):3360-3365

Li S et al. Meta-analysis of randomized controlled trials on the efficacy of probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy in children. *Eur J Pediatr*. 2014;173(2):153-61.

Lionetti E, Francavilla R, Castellazzi AM, Arrigo T, Labò E, Leonardi S, Ciprandi G, Miraglia Del Giudice M, Salpietro V, Salpietro C, La Rosa M. Probiotics and *Helicobacter pylori* infection in children. *J Biol Regul Homeost Agents* 2012; 26: S69-S76.

Loh JT, Forsyth MH and Cover TL. Growth phase regulation of flaa expression in *Helicobacter pylori* is luxs dependent. *Infect Immun*. 2004;72:5506–10.

Long M, Luo J, Li Y, Zeng FY, Li M. Detection and evaluation of antibodies against neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2009;15:2381-8.

Lüthi-Peng Q, Schärer S, Puhan Z. Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002;60(1-2):73-80

Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. Coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 1999; 276: G941-G950.

Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007; 21:205-14

Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007;56:772-81.

Marshall BJ, Warren JR: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984;1:1311–1315.

Mczesnikiewicz-Guzik M, Karczewska E, Bielanski W et al. Association of the presence the *Helicobacter pylori* in the oral cavity and in the stomach. *Journal of physiology and pharmacology*. 2004;55(2):105-115

Medellin-Peña MJ and Griffiths MW. Effect of Molecules Secreted by *Lactobacillus acidophilus* Strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:1165-72.

Mendz GL, Hazell SL, Burns BP. Glucose utilization and lactate production by *Helicobacter pylori*. *J Gen Microbiol.* 1993;139:3023-3028.

Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:165-99.

Moayyedi P, Feltbower R, Rocombe W, Mason S, Atha P, Brown J, Dowell AC. The effectiveness of omeprazole, clarithromycin and tinidazole in eradicating *Helicobacter pylori* in a community screen and treat program. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14(6):719-28.

Mukai T, Asasaka T, Sato E, Mori K, Matsumoto M, Ohori H. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 32: 105-110.

Mundi A, et al. Cell-Free Preparations of *Lactobacillus acidophilus* Strain La-5 and *Bifidobacterium longum* Strain NCC2705 Affect Virulence Gene Expression in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Food Protection.* 2013; 76(10):1740–6.

Montiel R, et al. Antimicrobial activity of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* on *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Food Microbiol.* 2014;44:1-5.

Nvström J, Svennerholm AM. Oral immunization with hpaA affords therapeutic protective immunity against *H. Pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. *Vaccine.* 2007;25:2591-8.

Nazef L, Belguesmia Y, Tani A, Prévost H, Drider D. Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: Evidence on anti-*Campylobacter* and anti-*Listeria* activities. *Poult Sci.* 2008;87:329–334

Olfat F, Zheng Q, Oleastro M, et al. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor baba with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;44(2):151-6.

Osaki T, Hanawa T, Manzoku T, Fukuda M, Kawakami H, Suzuki H, Yamaguchi H, Yan X, Taguchi H, et al. Mutation of luxs affects motility and infectivity of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of a Mongolian gerbil model. *J Med Microbiol.* 2006; 55:1477–85.

Otero W, Gomez M, Trespalacios AA. *Helicobacter pylori*: despues de todo. Temas escogidos de gastroenterologia. Asociacion colombiana de gastroenterología. 2007;43-56.

O'Mahony L, Feeney M, O'Halloran S, Murphy L Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001;15(8):1219-25.

Pacheco AR, Sperandio V. Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host. *Curr Opin Microbiol.* 2009;12:192–8.

Panayotopoulou E, Sgouras D, Papadakos K, Kalliaropoulos A, Papatheodoridis G, Mentis A and Archimandritis A. Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of caga protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2006;45:488–95.

Prince T, McBain AJ, O'Neill CA. *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-induced cell death by competitive exclusion. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(15):5119-26.

Rader BA, Campagna SR, Semmelhack MF, Bassler BL, Guillemin K. The quorum-sensing molecule autoinducer 2 regulates motility and flagellar morphogenesis in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2007;189(17):6109–6117

Rader BA, Wreden C, Hicks KG, Sweeney EG, Ottemann KM, Guillemin K. *Helicobacter pylori* perceives the quorum-sensing molecule AI-2 as a chemorepellent via the chemoreceptor TlpB. *Microbiology.* 2011;157(9):2445–2455.

Reuter G. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Microflora of the human intestine. Composition and succession. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2001;2(2):43-53.

Reid G, Burton J, Hammond J, Bruce AW. Nucleic Acid-Based Diagnosis of Bacterial Vaginosis and Improved Management Using Probiotic *Lactobacilli*. *Journal of Medicinal Food.* 2004; 7(2): 223-228

Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, Atherton JC. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology.* 2007;133:926 – 36.

Rodriguez E, Martinez MI, Horn N, Dodd HM. Heterologous production of bacteriocins by Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;80(2):101-116.

Rodriguez EGB, Gaya P, Nanez M, Medina M. Diversity of bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal*. 2000;10:7-15.

Rolig AS et al. *Helicobacter pylori* Requires tlpD-Driven Chemotaxis To Proliferate in the Antrum. *Infect Immun*. 2012;80(10):3713–20.

Ryan KA, O'Hara AM, van Pijkeren JP, Douillard FP, O'Toole PW. *Lactobacillus salivarius* modulates cytokine induction and virulence factor gene expression in *Helicobacter pylori*. *Journal of medical microbiology*. 2009;58(Pt 8):996-1005.

Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle P, Stremmel W. Diversity of *Helicobacter pylori vaca* and *caga* genes and relationship to *vaca* and *caga* protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol*. 1998;36:944-8.

Rudnicka A, Chimela M. Inflammation and host immune response in *Helicobacter pylori* infections. *Curr Trends Immunol*. 2004;6:1-19.

Rütti DP, Lacroix C, Jeremić T, Mathis M, Díe A, Vollenweider S. Development of a reversible binding process for in situ removal of 3-hydroxypropionaldehyde during biotechnological conversion of glycerol. *Biochemical Engineering Journal*. 2011; 55(3):176-184.

Schweinitzer T, Mizote T, Ishikawa N, Dudnik A, Inatsu S, Schreiber S, Suerbaum S, Aizawa S, Josenhans C. Functional characterization and mutagenesis of the proposed behavioral sensor tlpD of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 2008;190:3244-55.

Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G. and Bassler, B. L. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*. 2001;41: 463–476

Shen F, Hogley L, Doherty N, Loh JT, Cover TL, Sockett RE, Hardie KR, Atherton JC. In *Helicobacter pylori* auto-inducer-2, but not LuxS/MccAB catalysed reverse transsulphuration, regulates motility through modulation of flagellar gene transcription. *BMC Microbiol*. 2010;10:210

Sicinschi L, Correa P, Bravo L and Schneider B. A positive assay for identification of *caga* negative strains of *Helicobacter pylori*. *J Microbiol Meth*. 2003;55:625–33.

Solnick JV, Vandamme P. Taxonomy of the *Helicobacter* Genus. In: Mobley H, Mendz G, Hazell S, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001

Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB. Bacteria–host communication: The language of hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100: 8951–6.

Suebaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. 2002;347:1175-86

Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989;33:674–679.

Thomas DW, Greer FR. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics* 2010; 126: 1217-1231

Tolone S, Pellino V, Vitaliti G, Tolone C. Evaluation of *Helicobacter Pylori* eradication in pediatric patients by triple therapy plus lactoferrin and probiotics compared to triple therapy alone. *Ital J Pediatr*. 2012;38:1–5.

Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergstrom J, Boren T, Danielsson D, Teneberg S. The sialic acid binding saba adhesion of *Helicobacter pylori* essential for nonopsonic activation of human Neutrophils. *J Biol Chem*. 2005;280:15390-7.

Vandenbergh PA. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol Rev* 1993; 12: 221-238

Vollenweider S, Lacroix C. 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied microbiology and biotechnology*. 2004; 64(1):16-27.

Wang Y, Huang Y. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* supplementation to standard triple therapy on *Helicobacter pylori* eradication and dynamic changes in intestinal flora world. *J Microbiol Biotechnol*. 2014;30:847–53.

Winzer K, Hardie KR, Burgess N, Doherty N, Kirke D, Holden MTG, Linforth R, Cornell KA, Taylor AJ, Hill PJ, Williams P. LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology-Sgm*. 2002;148:909–22.

Winzer K, Hardie KR, Williams P. LuxS and autoinducer-2: Their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria. *Adv Appl Microbiol*. 2003;53:291–396.

Wirth H, Yang M, Sanabria-Valentin E, Berg D, Dubois A and Blaser MJ. Host Lewis phenotype-dependent *Helicobacter pylori* Lewis antigen expression in rhesus monkeys. *FASEB J.* 2006; 20(9):1534-6.

Wirth HP, Yang M, Peek R, Hook-Nikanne J, Fried M and Blaser MJ. Phenotypic diversity in Lewis expression of *Helicobacter pylori* isolates from the same host. *J Clin Lab Med.* 1999;133:488-500.

Yamaoka Y, Kato M and Asaka M. Geographic Differences in Gastric Cancer Incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Intern Med.* 2008;47:1077-83.

Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T *et al.* Distinct diversity of *vaca*, *caga* and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3906-16.

Yang JC, Kuo CH, Wang HJ, Wang TC, Chang CS, Wang WC. Vacuolating toxin gene polymorphism among *Helicobacter pylori* clinical isolates and its association with *m1*, *m2*, or chimeric *vaca* middle types. *Scand J Gastroenterol.* 1998;33: 1152-7.

Zaman C *et al.* Analysis of the microbial ecology between *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota of Mongolian gerbils. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 1):129-37.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Victor Hugo Urrutia Baca

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE METABOLITOS PRODUCIDOS POR *Lactobacillus reuteri* CONTRA *Helicobacter pylori* Y SU EFECTO EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en la Ciudad de León, Departamento de León, Nicaragua el 16 de agosto de 1990, hijo de Norma del Socorro Baca Aguilar y Victorino Urrutia

Educación: Egresado de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, grado obtenido Licenciatura en Bioanálisis Clínico en 2012.

Experiencia Profesional: Responsable del Laboratorio de Hematología en el Depto. de Microbiología y Parasitología UNAN-León, desde 2012 hasta enero de 2014