

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la actividad *in vitro* de compuestos fenólicos
presentes en el vino y de seis antimicrobianos en aislados
clínicos de *Helicobacter pylori***

PRESENTADA POR

Ana María Correa Ruiz

Directores

Manuel López-Brea Calvo
Teresa Alarcón Cavero
José Prieto Prieto

Madrid, 2014

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

**Estudio de la actividad *in vitro* de
compuestos fenólicos presentes en el vino
y de seis antimicrobianos en aislados
clínicos de *Helicobacter pylori***

Tesis Doctoral

Ana María Correa Ruiz

Madrid 2014

Manuel López Brea Calvo, Doctor en Medicina, ex jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de la Princesa y ex Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, Teresa Alarcón Cavero, Doctora en Ciencias Biológicas, Facultativo del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de la Princesa y Profesora Asociada de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y José Prieto Prieto, Doctor en Medicina y Catedrático de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Estudio de la actividad *in vitro* de compuestos fenólicos presentes en el vino y de seis antimicrobianos en aislados clínicos de *Helicobacter pylori***” realizada por Ana María Correa Ruiz para optar al Grado de Doctor en Medicina, ha sido desarrollada bajo mi dirección y reúne los requisitos suficientes para su lectura y defensa.

Para que así conste, se expide le presente certificado.

Madrid, 1 de Septiembre del 2014

Fdo: Dr. Manuel López-Brea Calvo

Fdo: Dra Teresa Alarcón Cavero

Fdo: Dr. José Prieto Prieto

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar a los directores de esta tesis, el Doctor Manuel López-Brea, a la Doctora Teresa Alarcón y al Doctor José Prieto, por su colaboración y consejos. Al Dr. López-Brea debo agradecerle el haber hecho que mostrara interés por este microorganismo, después de tantas sesiones en inglés de *Helicobacter pylori* todos los miércoles por la tarde. Gracias a la Doctora Teresa Alarcón, por la paciencia y apoyo, animándome constantemente para seguir adelante y no abandonar pese a los momentos complicados.

En segundo lugar, quiero agradecer al Dr Adolfo J Martínez-Rodríguez y al Dr. Alfonso V. Carrascosa, por proporcionarme los compuestos fenólicos y la realización de una rotación externa en el Instituto de Investigación de Ciencias de la Alimentación del CSIC, quiero destacar su enorme interés por mi trabajo.

Mi agradecimiento para el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario de La Princesa, donde me estoy formando como especialista: facultativos, técnicos y residentes (especialmente para Laura, mi gran confidente). Quiero dar las gracias a mis “R” mayores Ángela y Marina, por haberse implicado en mi trabajo (gracias por enseñarme a hacer las extracciones y PCR) y como no, a mi co-R Alba, que más de una vez ha tenido que dar pases de placa para que no se muriese el *H. pylori*.

Gracias a mis padres, por enseñarme a ser constante, y por confiar en mí. Sin ellos, no podría haber llegado hasta donde estoy llegando.

Quisiera agradecer a mi hermano, mis cuñados y mis suegros por su preocupación en cada etapa de mi vida.

A mi hija Ainhoa, gracias por haber sido tan buena en sus primeros meses de vida, y haberme dejado escribir mientras ella dormía. A pesar de haber sido momentos agotadores, verla me llenaba de vitalidad y fuerzas para seguir con este trabajo. Te quiero hija mía.

Por último, quiero agradecer a mi marido Jorge, por haberme apoyado, por haberme dejado tu hombro para mis lágrimas, por hacerme reír cada día, por tu comprensión, por animarme cada día, y por infinitas cosas. Muchas gracias cariño.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <u>CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS.</u>	2
1.1.1 Historia	2
1.1.2 Epidemiología	4
1.1.3 Caracterización	8
1.2 <u>FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>H. pylori</i>.</u>	9
1.2.1 Ureasa	10
1.2.2 Sistemas antioxidantes	12
1.2.3 Adhesinas	13
1.2.4 Citotoxina vacuolizantes VacA	13
1.2.5 CagA	15
1.2.6 Lipopolisacárido	16
1.3 <u>MANIFESTACIONES CLÍNICAS.</u>	17
1.3.1 Manifestaciones digestivas	18
1.3.2 Manifestaciones extradigestivas	21
1.4 <u>MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i>.</u>	23
1.4.1 Métodos invasivos	23
1.4.2 Métodos no invasivos	26
1.5 <u>TRATAMIENTO.</u>	29
1.5.1 A quién tratar	29
1.5.2 Cómo tratar	30
1.6 <u>RESISTENCIA ANTIBIÓTICA.</u>	33
1.6.1 Amoxicilina	33

ÍNDICE

1.6.2 Claritromicina	34
1.6.3 Metronidazol	34
1.6.4 Tetraciclina	35
1.6.5 Furazolidina	36
1.6.6 Levofloxacino	36
1.6.7 Rifabutina	37
1.7 <u>MÉTODOS DE DETECCIÓN DE RESISTENCIAS.</u>	37
1.7.1 Dilución en agar	37
1.7.2 Difusión con disco	38
1.7.3 Método del epsilómetro (E-test)	38
1.7.4 Puntos de corte	38
1.7.5 Métodos moleculares	39
1.8 <u>VINO Y SALUD.</u>	40
1.9 <u>COMPUESTOS FENÓLICOS.</u>	42
1.9.1 Compuestos puros	44
1.9.1.1 Catequina (C)	44
1.9.1.2 Metil galato (M)	45
1.9.1.3 Ácido gálico (G)	46
1.9.1.4 Quercetina (Q)	46
1.9.1.5 Taninos (Tan)	47
1.9.1.6 Resveratrol puro (RE)	48
1.9.2 Extractos	49
1.9.2.1 Extracto de semilla de uva (GSE)	50
1.9.2.2 Extracto de uva (Pu)	51

ÍNDICE

1.9.2.3 Resveratrol 1 (R1)	52
1.9.2.4 Resveratrol 2 (R2)	52
1.9.2.5 Extracto de semilla de uva (SCOM)	53
1.10 <u>TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS.</u>	54
<u>DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS SOBRE EL <i>H. pylori</i>.</u>	
1.10.1 Estudio del daño de membrana mediante yoduro de propidio	54
1.10.2 MALDI-TOF	55
1.10.2.1 Aplicaciones de MALDI-TOF en Microbiología Clínica	57
2. OBJETIVOS	58
3. MATERIALES Y MÉTODOS	60
3.1 <u><i>Helicobacter pylori</i>.</u>	61
3.1.1 Número de cepas estudiadas	61
3.1.2 Procedencia de los microorganismos	61
3.1.3 Transporte de las muestras	61
3.1.4 Procesamiento de las muestras	61
3.1.5 Identificación de los microorganismos	62
3.1.6 Cepa control	63
3.1.7 Conservación de las cepas	63
3.2 <u>COMPUESTOS FENÓLICOS.</u>	63
3.2.1 Preparación de catequina	64
3.2.2 Preparación de metil galato	65
3.2.3 Preparación de ácido gálico	65
3.2.4 Preparación de quercetina	65
3.2.5 Preparación de resveratrol puro	66

ÍNDICE

3.2.6 Preparación de Taninos	66
3.2.7 Preparación de GSE	66
3.2.8 Preparación de Pu	67
3.2.9 Preparación de SCOM	67
3.2.10 Preparación de Resveratrol 1	67
3.2.11 Preparación de Resveratrol 2	68
3.2.12 Conservación de los compuestos fenólicos	69
3.3 <u>ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO DE <i>H. pylori</i>.</u>	69
3.3.1 Difusión en agar usando E-test	69
3.3.2 Puntos de corte	70
3.4 <u>ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE LOS GENES <i>vacA</i> Y <i>cagA</i>.</u>	70
3.4.1 Extracción del DNA cromosómico de <i>H. pylori</i>	70
3.4.2 Detección del gen <i>vacA</i>	72
3.4.2.1 Primers utilizados	72
3.4.2.2 Mastermix	72
3.4.2.3 Condiciones de la PCR	73
3.4.2.4 Revelado de la PCR por electroforesis en gel de agarosa	73
3.4.3 Detección del gen <i>cagA</i>	73
3.4.3.1 Primers utilizados	73
3.4.3.2 Mastermix	74
3.4.3.3 Condiciones de la PCR	74
3.4.3.4 Revelado de la PCR por electroforesis en gel de agarosa	75
3.5 <u>ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE DIFUSIÓN EN AGAR.</u>	75

ÍNDICE

3.6 <u>ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS FRENTE A <i>H. pylori</i>.</u>	76
3.6.1 Curvas de muerte	76
3.6.2 Concentración mínima inhibitoria	78
3.6.3 Estudio del daño de membrana mediante yoduro de propidio	79
3.6.3.1 Preparación del yoduro de propidio	79
3.6.3.2 Protocolo	79
3.6.4 Estudio sobre el efecto proteínico en <i>H. pylori</i> mediante MALDI-TOF	81
3.6.4.1 Extracción de la muestra	81
3.6.4.2 Análisis	82
3.7 <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.</u>	82
4. RESULTADOS	83
4.1 <u>ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO DE <i>H. pylori</i>.</u>	84
4.1.1 Sensibilidad global a antibióticos	84
4.1.2 Sensibilidad a antibioticos según la edad	85
4.1.3 Sensibilidad a antibioticos según el sexo	87
4.1.4 Resistencia a antibióticos por cada año de estudio	88
4.2 <u>ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE LOS GENES <i>vacA</i> Y <i>cagA</i>.</u>	91
4.2.1 Presencia de los alelos <i>s1</i> y <i>s2</i> del gen <i>vacA</i>	91
4.2.2 Presencia del gen <i>cagA</i>	92
4.2.3 Relación entre la presencia del gen <i>vacA</i> y el gen <i>cagA</i>	93
4.2.4 Relación entre los alelos del gen <i>vacA</i> y la edad	93
4.2.5 Relación entre la presencia del gen <i>cagA</i> y la edad	94

ÍNDICE

4.3 <u>ESTUDIO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.</u>	95
4.3.1 Halos de inhibición	95
4.3.2 Relación entre los alelos del gen <i>vacA</i> y los halos producidos por los compuestos fenólicos	97
4.3.3 Relación entre la presencia del gen <i>cagA</i> y los halos producidos por los compuestos fenólicos	98
4.3.4 Relación entre la resistencia a claritromicina y los halos producidos por los compuestos fenólicos	99
4.4 <u>ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS FRENTE A <i>H. pylori</i>.</u>	100
4.4.1 Curvas de muerte	100
4.4.2 Concentración mínima inhibitoria	103
4.4.4 Estudio del daño de membrana mediante yoduro de propidio	105
4.4.5 Estudio sobre el efecto proteínico en <i>H. pylori</i> mediante MALDI-TOF	105
5. DISCUSIÓN	109
5.1 <u>ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO DE <i>H. pylori</i>.</u>	110
5.1.1 Sensibilidad a amoxicilina	110
5.1.2 Sensibilidad a claritromicina	111
5.1.3 Sensibilidad a rifampicina	113
5.1.4 Sensibilidad a levofloxacino	114
5.1.5 Sensibilidad a tetraciclina	115
5.1.6 Sensibilidad a metronidazol	116
5.2 <u>ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE LOS GENES <i>vacA</i> y <i>cagA</i>.</u>	118

ÍNDICE

5.2.1	Presencia de los alelos s1 y s2 del gen <i>vacA</i>	118
5.2.2	Presencia del gen <i>cagA</i>	119
5.2.3	Relación entre la presencia del gen <i>vacA</i> y el gen <i>cagA</i>	119
5.2.4	Relación entre la presencia del gen <i>vacA</i> y <i>cagA</i> y la edad	120
5.3	<u>ESTUDIO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS FRENTE A <i>H. pylori</i>.</u>	120
5.3.1	Estudio de los halos de inhibición de los compuestos fenólicos	120
5.3.2	Relación entre los factores de virulencia y los halos producidos por los compuestos fenólicos	122
5.3.3	Relación entre la resistencia a claritromicina y los halos producidos por los compuestos fenólicoso	123
5.4	<u>ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS FRENTE A <i>H. pylori</i>.</u>	123
5.4.1	Curvas de muerte	123
5.4.2	Concentración mínima inhibitoria	124
5.4.3	Estudio del daño de membrana mediante yoduro de propidio	125
5.4.4	Estudio sobre el efecto proteínico en <i>H. pylori</i> mediante MALDI-TOF	125
6.	CONCLUSIONES	127
7.	BIBLIOGRAFÍA	130
8.	SUMMARY	161

ABREVIATURAS

Ácido gálico.....	G
Amoxicilina.....	AMX
Catequina.....	C
Claritromicina.....	CLA
Concentración mínima inhibitoria.....	CMI
Dimetilsulfóxido.....	DMSO
Extracto de uva.....	Pu
Extracto de semilla de uva-GSE.....	GSE
Extracto de semilla de uva-SCOM.....	SCOM
Levofloxacino.....	LEV
Metil galato.....	M
Metronidazol.....	MET
Quercetina.....	Q
Resveratrol 1.....	R1
Resveratrol 2.....	R2
Rifampicina.....	RIF
Taninos.....	Tan
Tetraciclina.....	TET

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

1.1.1 Historia.

En octubre del 2005 recorrió el mundo la noticia de la obtención del premio Nobel de Medicina por los australianos Barry Marshall, de 54 años, y Robin Warren, de 68, por el descubrimiento del bacilo *Helicobacter pylori*, asociado a la etiología de la gastritis y de la úlcera gástrica. Tras esta escueta noticia, había una fábula de tintes clásicos, apta para una película de Hollywood, con una bella moraleja incluida.

Todo comenzó en 1979, cuando Robin Warren, patólogo del Royal Perth Hospital, encontró en una biopsia de úlcera gástrica la presencia de una gran cantidad de bacterias, que “no podían estar allí”, pues el dogma científico establecía que la acidez gástrica impedía el desarrollo bacteriano. Interesado vivamente en el tema, descubrió que esta pequeña bacteria colonizaba el antro del estómago en la mitad de los pacientes a los cuales tomara muestra, existiendo signos de inflamación siempre que estaba presente en la mucosa.

Convencido de su hallazgo, que convertía la úlcera péptica en una enfermedad infecciosa, debió luchar contra la incompreensión y los chistes malos de sus colegas. En defensa de sus ideas, se atrevió a tratar como infección la úlcera de su propia esposa, Win, con quien compartía un feliz matrimonio y cuatro hijos.

Por esa época Barry Marshall estaba terminando sus estudios de medicina, planificando su futuro como un simple médico general, porque, en sus propias palabras, *tenía la impresión que todo ya había sido descubierto en medicina, de manera que nunca pensé que la investigación médica pudiera ser interesante, hasta que hice mi internado y comprendí que había un montón de personas haciendo cosas equivocadas, sin que se pudiera hacer nada al respecto.* De manera que este futuro galeno, que nunca había destacado en ese terreno, comenzó a buscar un proyecto de investigación

INTRODUCCIÓN

que completara su formación médica. En ese momento, su jefe le insinuó que le preguntara a Warren, que estaba siempre viendo bacterias en biopsias estomacales.

El joven estudiante y Warren estudiaron una serie de cien biopsias, que resultó muy estimulante. Marshall hizo múltiples intentos para cultivar la bacteria, fracasando una y otra vez, hasta que el azar (error o accidente) vino en su ayuda, como le ocurriera a Fleming con su placa de Petri abandonada junto a una ventana abierta. En un fin de semana largo, de Semana Santa, en que no había personal suficiente en el laboratorio, un cultivo quedó más tiempo en incubación y el bacilillo creció. Los autores lo identificaron como perteneciente al género *Campylobacter*; muy pronto se le agregó el epíteto latinizado equivocadamente de *pyloridis*; con el tiempo, con ese afán de acortar las palabras, devendría en *pylori* en 1988.

El bacilo había sido atrapado, pero faltaba probar que tenía un papel patógeno en la úlcera. Warren y Marshall creían que la presencia bacteriana contribuía al desarrollo de la lesión, sumada a los factores clásicos claramente establecidos por la ciencia médica, teoría de la cual se burlaba todo el mundo científico. Entonces, a los 32 años de edad, Barry Marshall decidió hacer su *experimentum crucis* y, un día de julio de 1984, preparó una infusión de unos cuantos miles de millones de *Campylobacter pyloridis*... y la bebió de un trago.

El audaz investigador comenzó en los días siguientes a sentir los síntomas de un *flu-like*, esto es, síntomas similares a una gripe, pero con algunos vómitos y dolor abdominal. Al día catorce se le practicó una endoscopia gástrica, que reveló una inflamación de la mucosa similar a la que acompaña a la mayoría de las úlceras. Marshall no tomó antibióticos y su fuerte sistema inmune se encargó de erradicar a la bacteria.

INTRODUCCIÓN

El triunfo llegó y el 10 de diciembre del 2005 Robin Warren y Barry Marshall recibieron de la Fundación Nobel unos 10 millones de coronas, es decir, un millón trescientos mil dólares. El triunfo para ellos, claro, pero en lo personal, porque el bacilillo no está derrotado y su historia continua dejando misterios por desvelar. Por lo pronto, ha sido aislado casi exclusivamente de biopsias u otros especímenes de esófago o duodeno con metaplasma gástrica.

Al poco tiempo de ser cultivado por primera vez, se vio que era diferente de los otros representantes del género *Campylobacter*. Además de tener múltiples flagelos en vez de uno polar, posee una composición de ácidos grasos que es única y propia; por otra parte, al revés de la superficie rugosa de los *Campylobacter*, su superficie es más bien lisa. Por último, la estructura de su ácido nucleico demostró que se apartaba del género que lo cobijara, de manera que el año 1989 se creó un nuevo género. Se eligió el término *Helicobacter* por la forma en que mueve sus flagelos, como hélices.

Como el cultivo siempre ha sido engorroso, el mismo Marshall desarrolló en 1988 un test no invasor, que aprovechaba la presencia de una potente ureasa en el arsenal metabólico de la bacteria, con la cual desdobla urea y libera anhídrido carbónico; de esta manera, marcando la urea a ingerir con carbono 14, este marcador podía recuperarse en la respiración del enfermo (Ledermann, 2007).

1.1.2 Epidemiología.

A pesar de que, al igual que ocurre con otras enfermedades de tan alta prevalencia, es difícil establecer cifras exactas, se estima que la infección por *H. pylori* afecta a más de la mitad de la población mundial. De todas formas, muchos trabajos publicados han sido realizados con pacientes sometidos a una gastroscopia, por lo que en estos casos las cifras de prevalencia han sido sobrestimadas (Pueyo, 1998).

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista epidemiológico la prueba diagnóstica ideal debe de cumplir una serie de requisitos: poseer una alta sensibilidad y especificidad, no ser invasiva, ser fácilmente realizable y no excesivamente costosa. La prueba más utilizada en estudios epidemiológicos es la detección de anticuerpos séricos, tipo IgG, frente al *H. pylori* mediante técnicas de enzimoimmunoanálisis (Ghasemi, 2013). Otros autores prefieren el test del aliento tras la toma oral de urea marcada con ^{13}C por presentar una mayor especificidad y no precisar venopunción (Vandenplas, 1992). Ambas técnicas poseen una alta sensibilidad (superior al 95%) (Marshall, 1995), pero a favor de la segunda estaría el hecho de que podría detectar infecciones agudas o muy recientes en las que todavía no se hubiera producido la seroconversión (Thomas, 1994).

Al revisar la prevalencia publicada en la bibliografía médica se puede observar una amplísima variación entre las diversas zonas estudiadas, existiendo una clara diferenciación entre los países desarrollados y aquéllos en vías de desarrollo. Así pues, podemos apreciar cifras bajas en países desarrollados como es Francia (25%) (Megraud, 1989), hasta otras superiores al 80% en países como Nigeria o India (Holcombe, 1992, Graham, 1991). Estas diferencias parecen deberse fundamentalmente a la incidencia de la infección durante la infancia (Taylor, 1991), edad en la que se infecta la gran mayoría de niños en las regiones en vías de desarrollo (Ghasemi, 2013). En los países avanzados la prevalencia es baja en las primeras décadas de la vida, para ir aumentando progresivamente a partir de la cuarta- quinta década (Pounder, 1995), circunstancia ésta que Banatvala, entre otros autores, achaca al efecto generacional que se produce en relación al progreso acontecido en los últimos años en dichos países (Banatvala, 1993).

La prevalencia publicada en España es un tanto dispar, comunicándose cifras que van desde el 36% en una determinada comarca valenciana (Alfonso, 1995) hasta el

INTRODUCCIÓN

sorprendente 84% referido por Carballo al área de Guadalajara (Carballo, 1995). Tal vez una cifra que represente más la situación global y más acorde al desarrollo de nuestro país sea la referida por Martín de Argila, que halla una prevalencia del 53% en la zona de Madrid (Martín de Argila, 1996).

La incidencia actual de la infección en regiones desarrolladas es muy baja en el adulto, siendo coincidentes los trabajos publicados en cuantificarla por debajo del 1% (Sipponen, 1997). Por otra parte, varios estudios realizados con sueros conservados observan cómo la infección va decreciendo en las últimas décadas para individuos de la misma edad (Banatvala, 1993), hecho que podría estar en relación con un progresivo menor riesgo de infección durante la infancia. Todo ello vendría a apoyar el antes mencionado efecto generacional relacionado con el progreso socio-económico.

Probablemente el principal factor epidemiológico de riesgo sea el bajo nivel económico-higiénico-sanitario; de ahí que la infección, como ya se ha comentado, sea mucho más frecuente en regiones no desarrolladas. Estudios realizados en países industrialmente avanzados también confirman este hecho: Graham en U.S.A (Graham, 1991), Murray en el Reino Unido (Murray, 1997) o Haeckel en Alemania (Haeckel, 1996) encuentran una clara relación entre la infección por *H. pylori* y clase social baja en general y hacinamiento, bajo nivel educacional o malas condiciones sanitarias en particular.

Algunos autores consideran posibles factores raciales o genéticos, de forma independiente al nivel social de la población estudiada, como predisponentes a la adquisición de la infección (Azuma, 1994).

El sexo no parece ser una variable de riesgo esencial ya que, aunque hay trabajos que encuentran una mayor prevalencia en hombres (Murray, 1997), son mayoría aquellos que no encuentran diferencias significativas entre ambos sexos (Samie, 2014)

INTRODUCCIÓN

El consumo de alcohol o de tabaco parecen suponer un factor de riesgo, no implicando una mayor prevalencia en la mayoría de estudios (Martín de Argila, 1996). No obstante, en cuanto al tabaco existe una cierta controversia, ya que autores como Murray (Murray, 1997) o Bateson (Bateson, 1993) lo identifican como un posible factor de riesgo.

Otra variable que tampoco tiene bien definido su papel es la actividad laboral. Un trabajo realizado en Italia, entre trabajadores de un matadero, observó que la prevalencia de la infección era mayor en los operarios de la carne que en los trabajadores de oficinas, no correspondiéndose adecuadamente con el estatus social (Vaira, 1988). Por otra parte, diversos estudios han encontrado una mayor prevalencia en profesionales de la salud, sobre todo en gastroenterólogos y especialmente en endoscopistas (Chong, 1994), en los que el riesgo de infección se correlacionaba directamente con el número de endoscopias realizadas (Matysiak-Budnik, 1997). Estos hallazgos son puestos en entredicho por otros investigadores, que o bien no encuentran diferencias significativas entre dichos grupos y controles (Pristautz, 1994), o bien concluyen que la supuesta exposición ocupacional es un riesgo menor en comparación con la condición socio-económica (Matysiak-Budnik, 1994).

El hábitat natural fundamental del *H. pylori* es la mucosa gástrica humana, sobre todo la antral, aunque ha sido cultivado o detectado mediante técnicas de PCR por diversos autores a nivel de la placa dental, saliva y heces (Mujmadar, 1990, Li, 1995, Kelly, 1994). El significado de la presencia de la bacteria en la cavidad oral todavía no está claro, siendo posible que se trate de una localización primaria o que, por el contrario, provenga de su reservorio principal, el estómago, mediante el reflujo gastroesofágico fisiológico.

INTRODUCCIÓN

Una de las cuestiones previsiblemente más importantes por dilucidar es el mecanismo de transmisión, ya que su total conocimiento podría conllevar la adopción de medidas sociales o campañas preventivas concretas que atenúen la enorme penetración de la infección. Actualmente se acepta, aún sin poder descartar otras rutas, que el contagio se realiza mediante un mecanismo de persona a persona, bien a través de la vía fecal-oral, bien a través de la vía oral-oral, ambas posiblemente mediadas por diversos vectores como fómites, saliva, alimentos o aguas contaminadas. (Neale, 1995, Logan, 1996). La transmisión via oral-oral sería la más frecuente, sobre todo en el ámbito intrafamiliar (Veres, 2007), es decir, de hermanos a hermanos y de padres a hijos (Ghasemi-Kebri, 2013); siendo el papel de la madre, como transmisora de la infección el más importante durante el primer año de vida (Urruzuno, 2012).

1.1.3 Caracterización

El género *Helicobacter* se describe integrado por bacilos gram negativos, de aspecto curvado, con una longitud de 2,5 a 5 mm y un grosor de 0,5 a 1 mm. Sus extremos son redondeados, y puede presentar un mechón polar de flagelos envainados en uno o ambos extremos dependiendo de la especie. En el caso de *H. pylori* presenta de 4 a 6 flagelos en un solo extremo; generalmente aparece con un engrosamiento a manera de vesícula en el extremo de los flagelos, lo que parece deberse a problemas de fijación. Se trata de bacterias microaerófilas de crecimiento lento, cuya temperatura óptima es de 37°C. Es oxidasa, catalasa y ureasa positivo (Goodwin, 1989).

INTRODUCCIÓN

1.2 FACTORES DE VIRULENCIA DE *H. pylori*.

La infección por *H. pylori* origina prácticamente siempre gastritis crónica. Sin embargo, las complicaciones principales (úlcera péptica, adenocarcinoma y linfoma gástrico) se desarrollan sólo en una minoría de personas infectadas, predominantemente en hospedadores adultos (Ernst, 2000).

Uno de los retos en la investigación de *H. pylori* es la identificación de los factores de virulencia predictivos de la progresión de la infección. Se han propuesto numerosos factores de virulencia como CagA, VacA y BabA, entre otros (Ozbey, 2013). Aunque se han asociado con un mayor riesgo de enfermedad ulcerosa péptica, adenocarcinoma gástrico o linfoma tipo MALT, ninguno de ellos implica por sí mismo el desarrollo de una enfermedad en concreto (Kusters, 2006). Esta asociación aumenta cuantos más factores de virulencia acumula una bacteria (Salama, 2013).

Los factores de virulencia son productos bacterianos o estrategias que contribuyen a la patogenicidad. Algunas propiedades y productos, como la capacidad para adherirse a las células o la de producir una toxina proteica, se pueden considerar un mecanismo de virulencia de las bacterias patógenas. Pero es conveniente usar “factores de virulencia” para características de la bacteria conectadas con su capacidad para producir enfermedad. Así pues, muchos de los considerados como factores de virulencia de *H. pylori* han sido detectados en cepas aisladas de pacientes con enfermedades gástricas más graves pero no se ha demostrado una acción patogénica. Puede ser una de las causas de la existencia de estudios que muestra resultados contradictorios (García Campos, 2007).

Por otro lado, el valor predictivo de los factores de virulencia se cree limitado debido a que, presumiblemente, la patogenicidad depende de interacciones multifactoriales entre los propios factores de virulencia bacterianos y factores

INTRODUCCIÓN

inmunológicos del hospedaderos, factores fisiológicos e influencias ambientales que modulan la respuesta inmune del hospedador (Höcker, 2003; Salama, 2013).

H. pylori origina una fuerte respuesta inmune, humoral y celular, en la mucosa gástrica que no consigue eliminar la infección y es responsable de muchos de los daños producidos en la mucosa gástrica. Tras la colonización de la mucosa gástrica, *H. pylori* libera sustancias tóxicas que estimulan la respuesta inmunológica local en la que fundamentalmente participan los neutrófilos. Después se produce una amplificación de la respuesta inflamatoria por la interacción de linfocitos, neutrófilos, macrófagos, células mastoides células no inmunes que liberan gran cantidad de mediadores químicos. La úlcera péptica, el adenocarcinoma y el linfoma gástrico son complicaciones de esta inflamación crónica.

1.2.1 Ureasa.

Al contrario de lo que se puede pensar, *H. pylori* es extremadamente sensible al ácido. Su hábitat natural se encuentra debajo de la capa mucosa, donde el pH se aproxima a la neutralidad. El mecanismo que utiliza para protegerse del pH ácido de la capa mucosa durante la colonización, o de las bajadas de pH que pueden ocurrir por daños mecánicos de la mucosa (Bauerfeind, 1997), 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 cataliza la hidrólisis de la urea presente en el estómago y libera amonio y dióxido de carbono (Posselt, 2013). El amonio producido aumenta el pH, con lo que *H. pylori* mantiene el pH adecuado, interno y periplásmico, incluso aunque el pH externo sea extremadamente bajo. Es esencial para la colonización, como se ha demostrado en experimentos utilizando cepas de *H. pylori* con ureasa no funcional (Eaton, 1991).

INTRODUCCIÓN

La producción de ureasa se regula de acuerdo con la condición del entorno, puesto que un aumento excesivo de la alcalinidad debida al NH_4^+ producido mataría la bacteria. La regulación se produce mediante un transportador dependiente de pH. El transportadore (UreI) permite la entrada de urea pero, una vez que pH alcanza el valor de 6-7, se inactiva (Weeks, 2000).

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 (Murakami, 1990); colabora en el desarrollo de gastritis atrófica crónica humana y facilita el incremento de infecciones virales y la carcinogénesis (Megraud, 1992). También origina la formación de cloramina (Suzuki, 1998), elevadamente tóxica, que debido a su lipofilicidad y bajo peso molecular, atraviesa la membrana plasmática celular. Así mismo, la formación de monocloraminas con el ácido hipocloroso que liberan los PMN, que contribuye a la lisis celular y a la úlcera, puede servir de protección frente al sistema inmune (García Campos, 2007). La concentración de NH_4^+ en el estómago de pacientes infectados es significativamente mayor que la encontrada en sujetos no infectados (Thomsen, 1989), disminuyendo tras la erradicación de *H. pylori*.

El dióxido de carbono resultante de la hidrólisis de la urea por la ureasa se transforma en bicarbonato y tiene un papel protector puesto que suprime el efecto bactericidad del peroxinitrito (Kuwahara, 2000).

La ureasa se ha utilizado en la búsqueda de vacunas debido a que está formada por dos subunidades, UreaA y UreB, que son inmunodominantes proteicos (Nomura, 2005, Urruzuno, 2012).

INTRODUCCIÓN

1.2.2 Sistemas antioxidantes.

H. pylori es una bacteria microaerofílica muy vulnerable a la toxicidad del O₂. Durante el proceso de colonización *H. pylori* promueve una fuerte respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y macrófagos, que generan una gran cantidad de metabolitos reactivos del oxígeno (MRO) (García Campos, 2007). Se ha comprobado que también son producidos por las células epiteliales gástricas en respuesta a la infección (Nardone, 2004), aumentando su concentración en la mucosa gástrica. *H. pylori* cuenta con mecanismos para detoxificación de los MRO, así como de reparación de los daños sufridos, que favorecen su supervivencia en el tejido inflamado. Estos mecanismos son adaptables y están interconectados entre sí (Wang, 2006). Entre los sistemas enzimáticos de detoxificación de los MRO 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 (Wood, 2003) 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 de MRO llevados a cabo por NADPH. La actividad enzimática de la catalasa, superóxido dismutasa y las peroxiredoxinas está incrementada en las cepas *cagA* positivas (Salama, 2013).

A veces los sistemas de detoxificación no son suficientes y puede existir daño oxidativo. Para ello, *H. pylori* cuenta con mecanismos para reparar el ADN dañado, como las proteínas RecA, UvrABC, endonucleasa III (Nth), MutS y RuvC. Los daños

INTRODUCCIÓN

oxidativos producidos en las proteínas son reparados por la metonin sulfóxido reductasa (García Campos, 2007).

1.2.3 Adhesinas.

H. pylori se une a las células receptoras del huésped, las células epiteliales gástricas, de una forma específica mediante un elevado número de adhesinas utilizando múltiples receptores (Beswick, 2006). Entre ellos hay glicerofosfolípidos, sulfátidos, componentes de la matriz extracelular (como el colágeno) y secuencias repetidas de N-acetil-lactosamina o de glicoconjugados (Miller-Podraza, 2005). Una sola clase de anticuerpo 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. Dado el nicho tan específico que tiene, el hecho de poseer tantas adhesinas debe indicar que son muy importantes para *H. pylori* (Posselt, 2013). De algunas de ellas se tienen datos que muestran su papel potencial como factores de virulencia. Además se ha observado una contribución elevada del epitelio gástrico a la respuesta de citoquinas, lo que sugiere, que tiene un papel importante en la inmunopatogénesis y resultado de la infección.

1.2.4 Citotoxina vacuolizante VacA.

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 (Salama, 2013). Posee una estructura hexamérica y se ensambla en la bicapa lipídica celular del hospedador formando un canal selectivo de aniones (Cover, 1997). Produce un gradiente de pH que atrae sustancias alcalinas al interior haciendo que se capte agua por ósmosis, lo que origina la vacuolización alrededor del

INTRODUCCIÓN

núcleo y más tarde el estallido y muerte celular (Posselt, 2013). En el citosol interfiere con el tráfico vesicular de los lisosomas (Cover, 2005).

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 péptica y cáncer gástrico que en pacientes que solo padecen gastritis (Boquet, 2003). Otros estudios no encuentran esta relación (Suerbaum, 1999). Una explicación posible es que el gen *vacA*, que está presente en todas las cepas de *H. pylori*, 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 (Van Door, 1998). Así, las cepas *s1/m1* son más citotóxicas que las *s1/m2*. En el caso de las cepas *cagA+* occidentales suelen tener un patrón genotípico *s2* y *s1a/m1a vacA* (que está más asociado a úlcera péptica) y las cepas *cagA+* del este asiático suelen tener el patrón genotípico *s1c/m1b vacA*. (Ozbey, 2013).

La presencia de VacA puede llevar a la muerte celular 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 (Yamasaki, 2006). También puede participar en el proceso de la apoptosis a través de la activación del receptor Fas/CD95 (Rudi, 1998), a través de diversas caspasas y de la ruptura de la membrana mitocondrial que, al afectar a la concentración de APT celular, altera el ciclo celular.

VacA puede inducir la expresión de factor de crecimiento vacular endotelial (VEGF) y provocar el desarrollo de procesos tumorigénicos (Caputo, 2003).

INTRODUCCIÓN

VacA amplifica la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica aumentando la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX-2), en las células T, neutrófilos y macrófagos (Montecucco, 2003), que a su vez pueden activar la producción de VEGF. 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- κ B y el aumento de citoquinas proinflamatorias originan alteraciones morfológicas que llevan al desarrollo de gastritis atrófica y metaplasia gastrointestinal.

1.2.5 CagA

La presencia del gen *cagA* se asocia más con síntomas graves, como son la gastritis severa, la atrofia de la mucosa, alto riesgo de úlcera y cáncer gástrico. De hecho, las cepas procedentes de pacientes con úlcera, en un porcentaje superior al 90% son *cagA* positivas. Pero, al 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 ADN 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 ADN de más de 30 kb (Hacker, 1990). Tienen un papel fundamental en la contribución a la virulencia de las bacterias patógenas que los contienen y en el desarrollo de la enfermedad (Schmidt, 2004). *cagPAI* tiene un tamaño de 37 a 40 kb y está flanqueada por *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

INTRODUCCIÓN

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 (Durant, 2000).

1.2.6 Lipopolisacárido.

El lipopolisacárido (LPS) de *H. pylori*, como el de otras especies bacterianas, presenta una estructura con tres dominios principales: la capa polisacárida externa o cadena específica O, el núcleo oligosacárido y el lípido A. La estructura química del LPS de *H. pylori*, en concreto la cadena específica O, puede mimetizar los antígenos de grupo sanguíneo de Lewis (Le^x, Le^y) (Aspinall, 1996). Cuando sucede, se dice que son cepas que expresan antígenos de Lewis. La expresión de estos antígenos se ha asociado a patologías más graves (Zheng, 2006). Algunos estudios muestran que cepas *H. pylori* *cagA*+ los expresan más frecuentemente (Wirth, 1996). Se han propuesto varios significados biológicos a su mimetización molecular. Entre ellos la respuesta autoinmune del hospedador, la evasión de la respuesta inmunológica y la adherencia a la mucosa gástrica.

La respuesta autoinmune inducida por *H. pylori* genera autoanticuerpos que contribuyen al desarrollo de gastritis atrófica. Se ha observado que la bomba protón/potasio tiene epítomos Lewis^y y podría ser un objetivo del sistema inmune en casos de gastritis crónica (Appelmek, 1996).

La capacidad que tiene *H. pylori* para evadir la respuesta inmunológica origina que la infección se cronifique. El LPS de *H. pylori* es inmunológicamente inerte comparado con el de otras bacterias gramnegativas (Salama, 2013).

El antígeno lipopolisacárido O participa en la adherencia de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas. Es reconocido específicamente por una lectina que une β-

INTRODUCCIÓN

galactósidos (Fowler, 2006). Los antígenos Le^x de *H. pylori* participan en la colonización de *H. pylori* (Appelmelk, 2000) por su función como adhesinas. Se ha visto que la adherencia de las cepas, que expresan Le^x, a células epiteliales gástricas puede inhibirse mediante un anticuerpo monoclonal anti-Le^x. Además, en pacientes con gastritis crónica se ha encontrado una relación entre la expresión Le^x y Le^y y la densidad de colonización de *H. pylori*. Aunque es un patógeno extracelular, puede encontrarse en el interior de las células epiteliales gástricas y se cree que el antígeno Le^x puede jugar algún papel en esta internalización (Lozniewski, 2003). La expresión Le^x se ha asociado a patologías más agresivas. Por tanto, la estructura del polisacárido O parece ser un determinante de la severidad de la gastritis (Eaton, 2004).

1.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

Cuando *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica humana produce una gastritis superficial que puede permanecer así durante el resto de la vida o bien, al cabo de años o décadas desarrollar una úlcera péptica (duodenal o gástrica) o una gastritis atrófica que podría ser el primer paso para la evolución a cáncer gástrico (Kodaman, 2014). También puede desarrollarse un tipo de linfoma, poco frecuente, que es el linfoma gástrico tipo MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*) (Salama, 2013).

Todavía no se conoce claramente por qué en unos pacientes la enfermedad es casi asintomática mientras que en otros se producen enfermedades digestivas de diferente gravedad. Existen factores genéticos predisponentes en el paciente, como el grupo sanguíneo, el tipo de antígeno Lewis o el tipo de HLA. También existen factores ambientales como las condiciones socioeconómicas, el consumo de tabaco o la dieta (la ingestión de sal actúa como factor agresivo de la mucosa mientras que el consumo de

INTRODUCCIÓN

alimentos anti-oxidantes actúa como factor protector), que pueden influir en el desarrollo de un tipo u otro de enfermedad. Por otro lado, los factores de patogenicidad de la propia bacteria pueden tener su efecto en el desarrollo de la enfermedad (Alarcón, 2004)

1.3.1 Manifestaciones digestivas.

* **Gastritis:** La colonización permanente de la mucosa gastroduodenal por *H. pylori* causa una inflamación con un infiltrado mixto en el que predominan los polimorfonucleares, pero también con linfocitos y células plasmáticas, dando lugar a lo que se denomina una gastritis crónica activa. Una de las características de este infiltrado en la edad pediátrica es la mayor presencia de linfocitos y células plasmáticas y una afectación más leve que la que tiene lugar en el adulto, por lo que se le denomina gastritis crónica superficial activa. La bacteria puede ser identificada en biopsias gástricas mediante tinción de Giemsa y en presencia de mucha cantidad de bacterias, incluso con hematoxilina-eosina. Después de la erradicación de la bacteria, la gastritis histológica mejora lentamente pero no desaparece totalmente hasta 6 meses o un año después de haber finalizado el tratamiento (Urruzuno, 2007).

Tanto la afectación glandular (gastritis atrófica) como el desarrollo de metaplasia intestinal, se ha descrito en adultos, y menos frecuente en niños. Estas lesiones son factores de riesgo para el posterior desarrollo del cáncer gástrico y que pueden estar presentes durante muchos años antes de la aparición de displasia y malignidad.

* **Úlcera péptica:** Existe una estrecha relación entre la enfermedad ulcerosa duodenal y la infección por *H. pylori* con una prevalencia que oscila entre el 95% y el 97% (Kuipers, 1995), en la úlcera gástrica su relación es menor, siendo su prevalencia

INTRODUCCIÓN

de alrededor del 83% (Boixeda, 1996) y achacándose el porcentaje restante a otros factores, tanto externos como genéticos.

Ahora bien, de todos los infectados por *H. pylori* tan sólo desarrollan enfermedad ulcerosa una escasa proporción (10% al 12%) (Martín de Argila, 1996), por lo que es necesaria la presencia de una serie de factores que determinen dicho desarrollo y expliquen por qué en unos casos se produce una úlcera péptica y en otros no llega a presentarse aunque persista la infección por mucho tiempo.

En la úlcera duodenal el microorganismo está presente con más frecuencia en el antro que en el duodeno. Los mecanismos que se han sugerido para explicar que un microorganismo antral produzca una lesión duodenal son las alteraciones causadas por productos del microorganismo infectante, la respuesta inflamatoria del huésped, la colonización bacteriana de una metaplasia gástrica en el duodeno, y las alteraciones secundarias de la secreción ácida gástrica o del bicarbonato pancreático. Entre los primeros está la propiedad bacteriana de alguna de las cepas de *H. pylori*, como la producción de citotoxinas que inducen vacuolización celular y que dependen de su acción citotóxica del gen *cagA*.

Respecto a la úlcera gástrica hay autores que sugieren una asociación significativa entre el polimorfismo genético localizado en el gen C del pepsinógeno y la úlcera gástrica como factor de predisposición a padecerla. Aprecian diferencias etiológicas entre la úlcera gástrica del cuerpo y la úlcera de incisura y/o antral, no estando asociada con la infección por *H. pylori* (Ohtaki, 1997). Este dato, junto con la administración de AINE y otros factores externos, puede explicar la menor prevalencia de *H. pylori* en la enfermedad ulcerosa gástrica.

INTRODUCCIÓN

* **Cáncer gástrico:** En julio de 1994, la International Agency for Research on Cancer y la Organización Mundial para la Salud reconocieron la existencia de evidencia suficiente en humanos, e insuficiente en animales para clasificar a *H. pylori* como un carcinógeno categoría 1 (Serrano, 2009).

Durante el proceso carcinogénico se han detectado cambios histológicos que se inician con la inflamación, formación de gastritis no atrófica y luego atrófica, metaplasia intestinal, displasia y, finalmente, la presencia del adenocarcinoma gástrico; a esta serie de cambios histológicos se le conoce como secuencia de Correa (Correa, 2006). La secuencia de Correa se observa, frecuentemente, en cáncer gástrico tipo intestinal mientras que en aquellos de tipo difuso no siempre se detecta. *H. pylori* se relaciona, principalmente, con el desarrollo de cáncer gástrico de tipo intestinal, localizado con mayor frecuencia en el cuerpo y/o antro gástrico (Ando, 2006).

* **Linfoma gástrico tipo MALT:** Los linfomas MALT son un tipo de cáncer de células B clonales originados en el tejido linfoide asociado a las mucosas (*mucosa associated lymphoid tissue*). Se distinguen dos tipos, los de bajo y los de alto grado, diferenciándose los primeros de los segundos por contar con menos de un 20% de formas blásticas (Hall, 1988). Se han identificado en todo el tracto gastrointestinal y otras localizaciones, como las glándulas salivales, el tiroides, el pulmón, la mama, la conjuntiva, el hígado, la piel, el timo y el tracto genitourinario (Pelstring, 1991). Paradójicamente, se localizan con una elevada frecuencia en el estómago, donde en condiciones fisiológicas no existe tejido linfoide. Numerosas evidencias epidemiológicas, experimentales y clínicas apoyan una fuerte asociación entre los linfomas primarios MALT del estómago y la infección por *H. pylori*. Datos derivados de estudios epidemiológicos, biológicos y moleculares indican que los linfomas tipo

INTRODUCCIÓN

MALT serían el último estadio de la gastritis crónica inducida por *H. pylori* (Eidt, 1994). La evidencia definitiva que apoya esta relación entre infección por *H. pylori* y linfoma gástrico MALT es que la erradicación de *H. pylori* se sigue de la remisión mantenida del linfoma en un porcentaje variable de casos (Mégraud, 2007).

A día de hoy, según los resultados obtenidos por Kodaman y colaboradores (2014), se podría decir que la manifestación clínica es el resultado de la interacción genotipo patógeno-genotipo hospedador. Así aunque siempre se ha dicho que el genotipo de la cepa estaba involucrado en la gravedad de la sintomatología (Parra-Cid, 2013, Posselt, 2013), el cuadro patológico y la severidad de la clínica de cada paciente dependería de si la cepa de *H. pylori* que porta en su estómago pertenece a la ascendencia evolutiva correspondiente (Kodaman, 2014). Este reciente descubrimiento podría corroborar las controvertidas afirmaciones respecto a los beneficios que la infección por *H. pylori* puede aportar a determinados hospedadores. Afirmaciones como que su infección puede llegar a prevenir el reflujo gastroesofágico y sus secuelas, el síndrome de Barrett, adenocarcinoma de esófago (Blaser, 2004) y disminuir síntomas alérgicos como: asma, rinitis y dermatitis atópica (Salama 2013).

1.3.2 Manifestaciones extradigestivas.

* **Enfermedades dermatológicas:**

Urticaria crónica idiopática.

Diversos estudios han relacionado la infección por *H. pylori* y la etiopatogenia de la urticaria crónica idiopática (Kolibasova, 1994). Un estudio publicado demuestra que 21 pacientes diagnosticados de urticaria crónica asociada a gastritis crónica por *H. pylori* quedaron libres de infección, desapareciendo las lesiones de urticaria tras ser sometidos a tratamiento erradicador (Kolibasova, 1994).

INTRODUCCIÓN

Psoriasis.

Hay estudios que sugieren que *H. pylori* puede ser uno de los microorganismos causantes de psoriasis (Rosenberg, 1994), encontrando algunos autores una incidencia del 47% de infección en este grupo de pacientes.

* **Anemia ferropénica refractaria:** Diversos trabajos han demostrado una asociación entre la infección por *H. pylori* y la anemia ferropénica refractaria al tratamiento en niños pequeños como en adolescentes, y sobre todo en este último grupo de edad especialmente vulnerable por poseer unos depósitos de hierro relativamente bajos (Urruzunu, 2012). No está claro si se trata de un incremento en las pérdidas de hierro o de una disminución de la absorción, pero lo que si es cierto es que la erradicación de la bacteria permite la normalización de las cifras de la sideremia y de los valores de la ferritina en determinados pacientes con anemia ferropénica refractaria portadores de una gastritis por *H. pylori* (Choe, 2001).

* **Púrpura trombocitopénica idiopática (PTI):** Se ha observado que algunos pacientes portadores de una púrpura trombocitopénica idiopática crónica han respondido a la erradicación del *H. pylori* con un incremento en el número de plaquetas (Francini, 2003; Urruzunu, 2012). La explicación biológica de esta posible asociación es la similitud de los anticuerpos antiplaquetarios del suero con la citotoxina asociada al gen *cagA* del *H. pylori* (Jaing, 2003).

* **Otras manifestaciones extradigestivas:** También se ha asociado la infección por *H. pylori* con la alergia alimentaria, al encontrarse títulos elevados de anticuerpos específicos tipo IgG frente a *H. pylori* en algunos casos de pacientes con alergia a alimentos en mayor proporción que en otras situaciones como el asma o la enfermedad

INTRODUCCIÓN

inflamatoria intestinal. La atopia estaría relacionada con un incremento de la permeabilidad gástrica como consecuencia de la gastritis, y la asociación de ambas entidades se demostraría si estas alteraciones desaparecieran con la erradicación del *H. pylori* (Urruzuno, 2007).

1.4 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori*.

La infección por *H. pylori* puede diagnosticarse mediante métodos invasivos (que requieren realización de endoscopia con toma de biopsia gástrica) o no invasivos (métodos para los que no se requiere realización de endoscopia) (Glupczynski, 1999).

Todos ellos presentan ventajas e inconvenientes y ninguno de los que existen hasta este momento puede considerarse *gold standard* utilizado únicamente.

Un método de diagnóstico ideal es no invasivo o mínimamente invasivo, no caro, seguro, disponible en todos los centros y que sea capaz de diferenciar infección activa de infección pasada. El método debe ser capaz de diferenciar entre la infección por *H. pylori* y la enfermedad asociada a la bacteria. Ninguno de los métodos que existe actualmente cumple todos estos requisitos (Dzieranowska-Fangrat, 2006).

1.4.1 Métodos invasivos.

El diagnóstico definitivo de *H. pylori* y de las consecuencias de la infección sólo puede conseguirse mediante la endoscopia gástrica con toma de biopsias.

* **Histología y visión microscópica:** El estudio histológico de la biopsia permite conocer las lesiones de la mucosa además de detectar la infección por *H. pylori*. La

INTRODUCCIÓN

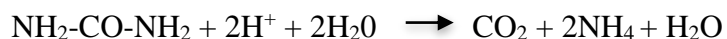
confirmación histológica de la inflamación de la mucosa es fundamental para el diagnóstico de la gastritis y su clasificación. Además permite detectar zonas de metaplasia intestinal (Correa, 1999).

La técnica de tinción es fácil, rápida, de bajo coste y de alta utilidad en el estudio de la infección por el microorganismo. Se han utilizado diferentes tinciones como la de Gram, Giemsa, Carbofuchina, Genta o tinciones inmunohistoquímicas. La visión microscópica tiene una sensibilidad y especificidad menor que la del cultivo (López-Brea, 2007).

Se ha utilizado hibridación *in situ* que permite detectar *H. pylori* y la resistencia a claritromicina directamente en las biopsias gástricas (Morris, 2005).

La mejor muestra para estudio histológico es la biopsia del antro gástrico. Se recomienda también una muestra de cuerpo gástrico o de la zona de transición si el paciente ha tomado recientemente medicación supresora de ácido (Gold, 2000, Saadah, 2010).

* **Prueba de la ureasa:** *H. pylori* posee una ureasa de estructura hexamérica, que le capacita para la colonización y para la persistencia en la cavidad gástrica. La prueba de la ureasa permite detectar la presencia de la descomposición de la urea en anhídrido carbónico y amoníaco, que se demuestra como un cambio de color en el medio que contiene un indicador de pH.



La prueba de la ureasa rápida se puede realizar directamente con la muestra de biopsia gástrica y existen diferentes reactivos comerciales que contienen urea a diferentes concentraciones y un indicador de pH (Laine, 1996).

INTRODUCCIÓN

Los resultados de sensibilidad y especificidad son en general superiores al 80% y 90%. Sin embargo, en niños, esta técnica tiene un bajo valor predictivo positivo (hasta el 50%) aunque sí tiene un alto valor predictivo negativo (97-98%) (Gold, 2000).

* **Cultivo de *H. pylori*:** El aislamiento mediante cultivo de *H. pylori* es sin duda el método más específico en el diagnóstico del microorganismo y presenta ventajas, como permitir el estudio de la sensibilidad a los diferentes antimicrobianos, la caracterización de factores de virulencia y la posibilidad de tipado de cepas con fines epidemiológicos (Pellicano, 2005; Martínez Gómez, 2010).

No obstante, su sensibilidad varía en relación con la recogida, transporte y almacenamiento de la muestra, los medios de cultivo utilizados y las condiciones de incubación. *H. pylori* es un microorganismo lábil y el procesamiento de la muestra debe realizarse de una forma rápida una vez que ha sido obtenida (Hua, 1998).

La identificación se realiza mediante visión en fresco con un microscopio de contraste de fases para ver la morfología o bien mediante una tinción de Gram. Las pruebas positivas de catalasa, ureasa y oxidasa confirma la identificación como *H. pylori* (López-Brea, 2007).

La muestra más habitual para el cultivo de *H. pylori* es la biopsia a partir de mucosa gástrica pero también se han utilizado otras como jugo gástrico, la prueba del hilo (“string test”) o vómitos.

* **Métodos moleculares:** En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas que permiten detectar la presencia del ADN de *H. pylori* directamente en la biopsia gástrica pero también en otro tipo de muestras como heces, saliva o agua (Simala-Grant, 2004).

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las técnicas se basan en la PCR tanto clásica como en tiempo real y presentan diferentes objetivos de diagnóstico, siendo los fundamentales los siguientes:

- Detección de genes específicos de la bacteria.
- Detección de factores de virulencia.
- Detección de mecanismos de resistencia.
- Como métodos de tipado para comparar aislamientos de *H. pylori* cultivados del mismo paciente o de familiares (López-Brea, 2007).

1.4.2 Métodos no invasivos.

El método de diagnóstico ideal para diagnosticar la infección sería uno no invasivo, o mínimamente invasivo, capaz de diferenciar infección activa de infección pasada.

* **Serología:** *H. pylori* provoca una respuesta inmunitaria, tanto local como sistémica, que comienza con un aumento transitorio de IgM, y posteriormente un aumento de IgG e IgA que persisten durante la infección. Los niños pequeños presentan menor respuesta de anticuerpos, por lo que la sensibilidad de las técnicas serológicas es baja en niños menores de 12 años (Sanz, 1999).

Existen numerosos métodos serológicos para detectar anticuerpos anti-*Helicobacter*, principalmente IgG. Los resultados pueden variar de acuerdo con la clase de antígeno y la técnica serológica que se utilice, pero además dependen del método diagnóstico considerado como referencia, así como de la población estudiada (Marchildon, 2003).

INTRODUCCIÓN

La detección de IgG mediante EIA cuantitativo es útil en el seguimiento de la respuesta al tratamiento, aunque se deben analizar simultáneamente los dos sueros del paciente (pre y postratamiento) y se observará un descenso significativo en el título de anticuerpos después de 3-6 meses de tratamiento, si se ha producido la erradicación (López-Brea, 2007).

Los métodos serológicos cualitativos muestran peores resultados. Existen kits rápidos que se aplican en sangre completa que presentan especificidad del 95% pero la sensibilidad varía del 43,3% al 80,2% (Marchildon 2003). En general, los EIA en suero o pruebas en sangre completa para su uso en la consulta del médico en niños sintomáticos en países desarrollados presentan una baja sensibilidad por lo que no son seguros para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* (Gold, 2000).

* **Prueba del aliento:** Es un método indirecto para detectar la ureasa de *H. pylori*. Si *H. pylori* se encuentra en el estómago, va a hidrolizar la urea ingerida previamente (marcada con ^{13}C o ^{14}C) y se va a liberar CO_2 marcado que se absorbe, difunde a sangre, es transportado a los pulmones y es liberado con el aliento. Se considera uno de los métodos no invasivos más seguros para detectar *H. pylori* (Mégraud, 2007). La descripción del método se realizó utilizando un isótopo radiactivo (^{14}C) pero actualmente se utiliza un isótopo no radiactivo (^{13}C). Algunas condiciones en la realización de la técnica no están completamente estandarizadas como el tipo de comida, la dosis de urea, el tiempo en el que se recogen las muestras o incluso el punto de corte (Pathak, 2004).

La prueba del aliento indica una infección actual por la bacteria, ya que en una infección pasada el resultado sería negativo. Por esto es útil como seguimiento del tratamiento realizado 4 a 6 semanas después de finalizado. El método tiene una

INTRODUCCIÓN

excelente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico (Gold, 2000). Además, es una prueba global que valora la presencia de *H. pylori* en todo el estómago, no es dependiente de las condiciones de transporte de la muestra, ni de la experiencia del personal técnico.

También se puede utilizar un analizador con espectrometría de infrarrojos que permite la realización de la técnica en la consulta del clínico en pocos minutos y los resultados se correlacionan con los obtenidos mediante espectrometría de masas (Kato, 2004).

* **Antígeno en heces:** Es un método directo que permite la detección de antígeno de *H. pylori* en muestras de heces (Andrews, 2001). El primer kit comercializado (Premier Platinum HpSA) es un ELISA con anticuerpos policlonales. Posteriormente se desarrolló un ELISA basado en anticuerpos monoclonales (Amplified IDEIA HpStAR o Femtolab). Actualmente también existen ensayos rápidos de inmunocromatografía basados en anticuerpos monoclonales (Immuno-Card STAT HpSA), que tienen la ventaja de ser rápidos (en 10 minutos) y fáciles de usar (López-Brea, 2007).

En poblaciones con baja prevalencia de *H. pylori* puede ser recomendable comprobar los resultados positivos con prueba del aliento o serología (Ito, 2005). Por otra parte, se han descrito resultados positivos de forma transitoria que podrían considerarse como falsos positivos (Haggerty, 2005), los autores consideran que un dato positivo aislado, obtenido mediante una prueba no invasiva en poblaciones con baja prevalencia de infección por *H. pylori* es probablemente un falso positivo y debe realizarse una prueba confirmatoria utilizando un método que detecte un parámetro diferente (Nugalieva, 2006).

1.5 TRATAMIENTO.

1.5.1 A quién tratar.

En general se recomienda que, una vez diagnosticada la infección por *H. pylori*, el tratamiento debe ser ofrecido a todos aquellos pacientes que presenten síntomas gastroduodenales, aun en ausencia de enfermedad ulcerosa (Martínez 2010).

Los pacientes con infección por *H. pylori* y enfermedad ulcerosa, así como con linfoma tipo MALT tienen indicación absoluta de tratamiento. Dado que no existe evidencia de la asociación entre infección por *H. pylori* y dolor abdominal recurrente, la presencia de éste no constituye indicación de tratamiento (Bourke, 2005).

Es aconsejable la realización previa de endoscopia con toma de biopsia para histología y cultivo microbiológico y con estudio de resistencias antibióticas. La endoscopia no sólo es útil para el diagnóstico de la patología gastroduodenal presente y, por tanto, para establecer la indicación de tratamiento, sino también para realizar cultivo con estudio de resistencias, lo que facilitará la instauración de un tratamiento correcto desde la primera pauta (Martínez, 2007).

El hallazgo de gastritis por *H. pylori* en ausencia de úlcera péptica y de sintomatología específica, durante la realización de una endoscopia por otro motivo, supone un dilema para el gastroenterólogo. Tanto en adultos como en niños, no existe evidencia del beneficio para el paciente de realizar tratamiento antibacteriano en esta situación.

Se ha especulado con la relación entre el reflujo gastroesofágico y la infección por *H. pylori* y sobre la conveniencia de tratar previamente el reflujo antes que la infección. En este momento se aconseja erradicar *H. pylori* previamente a la instauración de tratamiento prolongado con inhibidores de la bomba de protones (IBP) (Moayyedi, 2006).

INTRODUCCIÓN

La presencia de anemia ferropénica es indicación de tratamiento erradicador, ya que se ha demostrado que la desaparición de la bacteria supone la mejoría en todos los parámetros sanguíneos (Hacihanefloglu, 2004).

1.5.2 Cómo tratar.

El tratamiento ideal es aquel que consigue tasas de erradicación elevadas, superiores al 90%, de corta duración para asegurar el cumplimiento y con mínimos efectos secundarios.

En niños, igual que en adultos, se recomienda como primera línea de tratamiento la triple terapia (Collins, 2006; Bihn, 2014).

La triple terapia consiste en la administración asociada de dos antibióticos y un antisecreto, ya sea un inhibidor de la bomba de protones, un antagonista de los receptores de H₂ y/o un compuesto derivado de bismuto, según las recomendaciones del Consenso de Maastricht (Wu, 2014).

Son pocos los antibióticos capaces de ejercer su función en el lumen del estómago (De Francesco, 2011), de ahí que los antibióticos más ampliamente usados se reduzcan a seis: metronidazol, claritromicina, amoxicilina, tetraciclina (Samie, 2014), rifabutina y levofloxacino (Martínez Gómez, 2010).

Los inhibidores de bomba de protones (IBP) se encargan de disminuir la secreción de protones al lumen gástrico en las células parietales y los más utilizados en la actualidad son: omeprazol, lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol y esomeprazol, siendo el primero, el más utilizado. Los IBPs no sólo disminuyen la hiperacidez del estómago, sino que también aumenta la absorción, el transporte y la concentración de antibióticos en el moco gástrico, y disminuye la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los antagonistas de los receptores, son compuestos que, en presencia de

INTRODUCCIÓN

histidina, desencadenan la secreción de protones por las células parietales al lumen gástrico. Dentro de los antagonistas de los receptores H₂ más utilizados se encuentran: la cimetidina, famotidina, nizatidina y la ranitidina, esta última, es la más utilizada (Samie, 2014). Estos antisecretores pueden administrarse en compañía de subcitrato de bismuto, el derivado de bismuto más utilizado (Gisbert, 2013), que se encarga de formar una película protectora sobre la mucosa gástrica que la protege de la acción corrosiva del ácido gástrico.

A los pacientes adultos que son diagnosticados a través de pruebas no invasivas, no se les suele realizar cultivos a partir de una biopsia previamente a la administración de un primer tratamiento por lo que los gastroenterólogos han elaborado distintas líneas de tratamiento ordenadas prioritariamente, por si la anterior falla (Tabla 1.1) (Gisbert, 2013; Kanizaj, 2014; Wu, 2014).

Opción	Terapia	Tratamiento	Duración del tratamiento
Primera	Triple	BAM/OAM/OCM	14 días
	Concomitante	OCAM	3 a 7 días
Segunda	Cuádruple	BOMT	14 días
	Secuencial	OA + (OCTn/OCM)	5 + 5 días
Tercera	Rescate	OTM/BTM	10 a 12 días
Cuarta	Casos refractarios	OAR	14 días

Tabla 1.1 Pautas para el tratamiento de la infección por *H. pylori* en adultos. A: amoxicilina. B: compuesto derivado de bismuto. C: claritromicina. M: metronidazol. O: omeprazol. T: tetraciclinas. Tn: tinidazol. L: Levofloxacino. R: rifampicina/rifabutina (según lo revisado en Gisbert, 2013; Kanizaj, 2014; Wu, 2014).

INTRODUCCIÓN

Por el contrario, en pediatría gastroentelógica, aunque existen unas pautas de tratamiento de la infección en niños (Martínez, 2010) (Tabla 1.2), se realiza en la mayoría de los casos una endoscopia digestiva alta y, a partir de esta, se toma una biopsia (Urruzuno, 2012), por lo que se suele conocer la susceptibilidad antibiótica a través de los antibiogramas del aislado obtenido. Esto permite aplicar la triple terapia, utilizando los dos antibióticos para los cuales el aislado en concreto se muestre susceptible *in vitro* (Mégraud, 2007).

Opción	Terapia	Tratamiento	Duración del tratamiento
Primera	Triple	BAM/OAM	14 días
Segunda	Cuádruple	BOMT (<8años)	7 días
	Secuencial	OA + (OCTn/OCM)	5 + 5 días
Tercera	Terapia de rescate	OAR/OAL*	14 días

Tabla 1.2 Pautas para el tratamiento de la infección por *H. pylori* en niños. A: amoxicilina. B: compuesto derivado de bismuto. C: claritromicina. M: metronidazol. O: omeprazol. T: tetracilinas. Tn: tinidazol. L: levofloxacino. R: rifampicina/rifabutina. * Usado sólo en pacientes pediátricos mayores (modificado desde Martínez, 2010 según Gisbert 2013).

El fracaso del tratamiento puede estar influido por la resistencia antibiótica y también, a otros factores como: incumplimiento terapéutico (en duración y dosis), propiedades farmacológicas de los antibióticos, ausencia de penetración en la mucosa gástrica, desactivación por el pH estomacal, la no correspondencia entre *sensibilidad in vitro* e *in vivo* y las características de las lesiones gástricas (Alarcón, 1999).

Actualmente y debido a las crecientes tasas de resistencia a antibióticos, se están investigando nuevas fuentes de compuestos naturales eficaces en la erradicación de la infección por *H. pylori*. Así se han recopilado evidencias de que ciertas plantas y

INTRODUCCIÓN

frutos, como los arándanos y el ajo (Samie, 2014); algunos probióticos, como *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. busgaricus*, *L. casei*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infantis*, y *B. breve* (López-Brea 2008; Samie, 2014) y compuestos naturales como la miel (Manyi-Loh, 2010), podrían inhibir el crecimiento y contribuir en el tratamiento de la infección.

1.6 RESISTENCIA ANTIBIÓTICA.

H. pylori es sensible a un gran número de antibióticos *in vitro* (López-Brea, 1999) pero no todos presentan eficacia *in vivo*.

La resistencia antibiótica tiene múltiples consecuencias, ya que a causa de ella, las infecciones bacterianas son más difíciles de tratar, lo que a su vez puede generar procesos patológicos más largos y más graves, periodos de contagio mayores, efectos secundarios más frecuentes (debido al uso de antibiótico con un rango terapéutico menor, de dosis más altas o de tratamientos más largos) e ingresos hospitalarios más prolongados (Lázaro, 2006). Todo ello conlleva un aumento de costes sanitarios nacional y/o personal para los pacientes. Por todos esos motivos es más que necesario y urgente el estudio de las resistencias a antibióticos.

1.6.1 Amoxicilina.

Entre todos los betalactámicos ensayados *in vitro* sólo amoxicilina ha demostrado ser útil en el tratamiento de la infección por *H. pylori* y se utiliza en diferentes pautas de tratamiento asociado a metronidazol, tetraciclina o claritromicina. Es el betalactámico más estable en medio ácido y el que alcanza mayores concentraciones en tejidos después de una dosis oral. Los antibióticos betalactámicos

INTRODUCCIÓN

actúan inhibiendo la formación de la pared bacteriana de los microorganismos (Alarcón, 2007). Se han descrito alteraciones de las PBPs, concretamente mutaciones en el gen *pbp-1A* que se asocian con resistencia a este antimicrobiano (Megraud, 2004).

1.6.2 Claritromicina.

Claritromicina es el macrólido más utilizado, que presenta una excelente actividad *in vitro* frente a *H. pylori* y tiene modificaciones químicas con respecto a los macrólidos más antiguos, que le confieren mayor estabilidad en medio ácido (Czinn, 1986).

Los macrólidos inhiben la síntesis de proteínas mediante su acción a nivel de los ribosomas bacterianos. La función de los ribosomas consiste en la transducción en proteínas del mensaje genético expresado por el ARN mensajero (ARNm). El grupo formado por macrólidos, lincosamidas y estreptograminas tipo B inhiben la síntesis proteica mediante el bloqueo de la función de la región peptidil transferasa, impidiendo la extensión de las cadenas proteicas causando la liberación de los fragmentos de péptidos incompletos (Alarcón, 2007).

El mecanismo de resistencia a macrólidos observado en *H. pylori* y otras bacterias, como *Mycoplasma pneumoniae* y micobacterias atípicas, es el debido a una mutación en una secuencia de la región peptidiltransferasa 23S del ARN ribosómico, en la subunidad 50S (Versalovic, 1996).

1.6.3 Metronidazol.

Metronidazol es un antimicrobiano ampliamente utilizado en el tratamiento de la infección por *H. pylori* por conseguirse, junto con amoxicilina y sales de bismuto, tasas muy altas de erradicación. Metronidazol y otros antibióticos nitroimidazólicos son

INTRODUCCIÓN

activos después de la reducción del grupo nitro unido al anillo imidazólico. Este proceso genera compuestos intermediarios de vida corta y altamente tóxicos que producen daño en el ADN bacteriano y causan la muerte celular (Edwards, 1993).

Existen 2 genes que, están involucrados en la resistencia de *H. pylori* a este antibiótico, ellos son *rdxA* y *frxA*. El gen *rdxA*, codifica para una NADPH nitrorreductasa insensible al oxígeno que dona los electrones reduciendo al metronidazol y activándolo (Kaakoush, 2005). Uno de los mecanismos más importantes en la resistencia de *H. pylori* a metronidazol son las mutaciones que inactivan al gen *rdxA*.

El gen *frxA*, codifica para la enzima NADPH flavinoxidorreductasa que tiene un mecanismo similar a *rdxA* y constituye un importante factor en la activación del metronidazol en el interior celular. La resistencia debida a la disfuncionalidad de este gen se ha observado solo en algunas cepas (Chisholm, 2004).

1.6.4 Tetraciclina.

Tetraciclina presenta buena actividad *in vitro* (López-Brea, 1999) y ha demostrado su utilidad en la práctica clínica aunque tiene el inconveniente de no poderse utilizar en enfermos pediátricos. Las tetraciclinas son antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis proteica. El mecanismo de resistencia descrito consiste en mutaciones puntuales en el gen 16S rRNA en la posición 926-928 (cambio de AGA por TTC) (Gerrits, 2006). Cuando se lleva a cabo una única sustitución o sustituciones dobles se produciría resistencia de bajo nivel; sin embargo, si se presentan las 3 mutaciones la resistencia sería de alto nivel. También se ha propuesto como mecanismo de resistencia la reducción de la permeabilidad, ya que algunas cepas resistentes no

INTRODUCCIÓN

presentan las mutaciones descritas y muestran una disminución de la acumulación de tetraciclina (Gerrits, 2006).

1.6.5 Furazolidona.

Los nitrofuranos tienen también buena actividad frente a *H. pylori* (McNulty, 1988), siendo furazolidona el más eficaz en la curación de úlceras duodenales (Zhi-Tian, 1985) y en erradicar *H. pylori* de la mucosa gástrica. El mecanismo de acción es similar al del metronidazol: reducción de la prodroga llevando a la formación de radicales nitro aniónicos y se produce el daño del ADN. El mecanismo de resistencia no se conoce pero es diferente del de metronidazol porque no presentan resistencia cruzada (Gerrits, 2006).

1.6.6 Levofloxacino.

El rango inhibitorio de quinolonas como ciprofloxacino y ofloxacino frente a *H. pylori* es similar a betalactámicos y macrólidos (López-Brea, 1999). Sin embargo, las primeras quinolonas utilizadas no mostraron eficacia clínica, por la disminución de la actividad en pH ácido o por el desarrollo de resistencia después del tratamiento. Actualmente levofloxacino se ha utilizado con éxito en la erradicación de la bacteria.

Las quinolonas actúan inhibiendo la ADN girasa, un tetrámero con dos subunidades A y dos B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*. En *H. pylori* se han descrito al menos, cuatro tipos de mutaciones en el gen *gyrA* (Miyachi, 2006): cambio de Asn por Lys en el aminoácido 87, cambio de Ala por Val en el aminoácido 88, cambio de Asp por Gly, Tyr o Asn en el aminoácido 91 y mutaciones simultáneamente en 91 (Asp → Asn) y en 97 (Ala → Val).

INTRODUCCIÓN

1.6.7 Rifabutina.

Muestra buena actividad *in vitro* (López-Brea, 1999) y ha demostrado ser eficaz en la erradicación de la bacteria. Las resistencias descritas se producen por mutaciones puntuales en el gen *rpoB*, que codifica para la RNA polimerasa, y cuando se produce confiere resistencia cruzada a todas las rifamicinas. Las mutaciones descritas corresponden a los aminoácidos 149, 524-545 y 586 (Gerrits, 2006).

1.7 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE RESISTENCIAS.

La resistencia a antimicrobianos se puede detectar mediante diferentes métodos que se pueden clasificar en fenotípicos (basados en la apariencia macroscópica tras el cultivo de la bacteria) y genotípicos (basados en la detección de los genes y las mutaciones implicadas en la resistencia).

1.7.1 Dilución en agar.

Es el método de referencia, pero poco útil para realizar de forma rutinaria, aunque válido para confirmar los resultados obtenidos por otros métodos y para realizar estudios para conocer la tasa global de resistencia en un área determinada. Existen recomendaciones de Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) que aconseja el método de dilución en agar y recomienda punto de corte para claritromicina (CLSI, 2014).

1.7.2 Difusión con disco.

Es el método más fácil y barato para determinar la sensibilidad *in vitro*, pero los resultados que se obtienen no siempre se correlacionan con los obtenidos por el método

INTRODUCCIÓN

de dilución en agar, aunque algunos autores sí observan buena correlación y lo recomiendan como práctico, seguro y con aplicación para predecir los resultados clínicos (DeCross, 1993; McNulty, 2002).

1.7.3 Método del epsilómetro (E-test)

Es un método cuantitativo para realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* basado en la difusión. El método del epsilómetro está especialmente recomendado en organismos exigentes y cuando se deben probar pocos microorganismos o pocos antibióticos y tiene diferentes ventajas sobre los métodos tradicionales de dilución en agar, dilución en caldo o difusión en agar (King, 2001). La British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) y European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) recomiendan este método para detectar la resistencia en *H. pylori* (King, 2001; EUCAST, 2014).

1.7.4 Puntos de corte.

En la tabla 1.3 se muestra las recomendaciones de la EUCAST usando el método del E-test. El punto de corte de resistencia a claritromicina recomendado por la EUCAST considera que el antibiótico se utiliza en una de las pautas aprobadas por la FDA junto con un inhibidor de la bomba de protones o ranitidina citrato de bismuto (EUCAST, 2014).

INTRODUCCIÓN

Antibiótico	CMI (mg/L)	
	Sensible <=	Resistente >
Amoxicilina	0,12	0,12
Claritromicina	0,25	0,5
Levofloxacino	1	1
Metronidazol	8	8
Rifampicina	1	1
Tetraciclina	1	1

Tabla 1.3 Puntos de corte según EUCAST

1.7.5 Métodos moleculares.

La detección de las mutaciones que confieren resistencia a claritromicina en *H. pylori* se ha realizado mediante técnicas de microbiología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa. Versalovic y cols desarrollaron en 1996 (Versalovic, 1996) una PCR que amplificaba un fragmento de 1,4 Kpb de la región 23S del ARNr y posteriormente se detectaba la mutación en A2142G y A2143G tras digestión con las enzimas *MboII* y *BsaI*, respectivamente. Este método ha sido utilizado por muchos autores (Gerrits, 2006). Se han desarrollado otros métodos que permiten detectar una o varias de las mutaciones relacionadas con la resistencia como: secuenciación, PCR “mismatched” que permite detectar la mutación A2142C (Alarcón, 2000), PCR y posterior ensayo de unión con oligonucleótido (PCR-OLA) (Stone, 1997), hibridación en fase sólida (LIPA) (Van Doorn, 1998) o en fase líquida (Pina, 1998) e hibridación *in situ*, FISH (Trebesius, 2000).

También se ha utilizado la PCR en tiempo real, que permite detectar cualquier tipo de mutación, según el diseño de la sonda y tiene la ventaja de que se puede realizar en 1 hora (Lascols, 2003). La mayoría de los protocolos realizados mediante PCR en tiempo real se basan en la utilización de 2 sondas entre las que se produce transferencia

INTRODUCCIÓN

de energía cuando se encuentran hibridadas en el ADN diana (sondas FRET). Cuando se completa el proceso de amplificación se determina la temperatura de fusión (T_m) del ADN amplificado. Si existe una mutación puntual, la T_m del fragmento amplificado será unos grados más baja (al menos 4-5°C) que cuando no existe.

Esta metodología se ha utilizado con éxito en aislamientos clínicos, pero también directamente sobre muestras de biopsia gástrica. En algunos trabajos se ha aplicado sobre muestras de heces directamente, con muy buenos resultados para algunos autores pero no para otros, por la dificultad de realizar una extracción adecuada del ADN en este tipo de muestras (Schabereiter-Gurtner, 2004).

También existen kits comerciales diseñados para detectar la presencia de mutaciones relacionadas con resistencia a claritromicina (López-Brea, 2006). La ventaja de las técnicas moleculares es la rapidez en obtener resultados y la excelente correlación con la sensibilidad obtenida por métodos fenotípicos y que se pueden aplicar a diferentes muestras, sin necesidad de que el cultivo sea positivo. Por otra parte, los métodos moleculares permiten detectar infecciones mixtas con cepas sensibles y resistentes simultáneamente o infecciones por cepas heterogéneas (cepas con mutación en una de las dos copias de genes), que pueden pasar desapercibidas por los métodos fenotípicos.

1.8. VINO Y SALUD

El vino ha sido parte de la cultura humana desde hace unos 6000 años y los antecedentes históricos relacionan al vino con la salud y la longevidad, sobre todo en la cultura mediterránea. Efectivamente, en varios países del área mediterránea (Francia, España, Portugal, Italia y Grecia) el vino está integrado en el comportamiento habitual

INTRODUCCIÓN

de los pueblos que lo consumen con las comidas y en las celebraciones (Leighton, 1999).

El vino es un producto natural obtenido por fermentación directa de la uva o de su mosto; contiene alcohol y múltiples productos secundarios de su fermentación alcohólica, pero contiene además otras muchas sustancias procedentes de la uva, en las que radica especialmente su valor desde el punto de vista de la salud.

Estudios científicos muestran que beber moderadamente es beneficioso para la salud, en especial para la prevención de las enfermedades coronarias (Doll, 1995). En general, se encuentra una disminución del riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria de aproximadamente 30-40% y de 10-20% para mortalidad general, en hombres o mujeres que consumen vino de manera moderada (Gaziano, 1999). Este efecto beneficioso sería debido a que en la elaboración del vino tinto se incorporan la semilla y la piel de la uva, ambas con altas concentraciones de flavonoides, principalmente catequina, ácido gálico y epicatequina.

Según las investigaciones, se deduce que los beneficios que el vino aporta a la salud humana son (Val, 2003):

- a. Acción antiespasmódica
- b. Activación de la secreción biliar
- c. Acción antibacteriana
- d. Protección de las paredes arteriales, al fortalecer el colágeno y la elastina que las forman
- e. El vino aporta minerales y oligoelementos
 - Magnesio: disminuye el estrés
 - Zinc: mejora las defensas inmunitarias
 - Litio: equilibra el sistema nervioso

INTRODUCCIÓN

- Calcio y potasio: garantizan un adecuado equilibrio iónico y eléctrico
- Se recomienda en casos de anemia ya que el vino contiene siempre algunos miligramos por litro de hierro
- Acción fungicida
- Efectos positivos sobre la enfermedad de Alzheimer

La concentración de compuestos polifenólicos del vino varía entre 1,80 y 1,06 g/L, con un promedio de 2,57 g/L para el vino tinto y entre 0,16 y 0,30 g/L para el blanco (Díaz, 2001). Como el contenido total de fenoles de alimentos y bebidas se correlaciona muy fuertemente con su actividad antioxidante, por su composición en polifenoles y en términos del poder antioxidante, un vaso de vino tinto (150mL) equivale a 12 de vino blanco, o a 2 tazas de té, 4 manzanas, 5 porciones de cebolla, 3 vasos y medio de cerveza, 7 jugo de naranja o 20 manzanas (Papaganga, 1999).

1.9 COMPUESTOS FENÓLICOS.

Los compuestos polifenólicos agrupan un conjunto de sustancias que durante mucho tiempo fueron denominadas genéricamente “*Materias tanoides o Taninos*”.

Son compuestos que se encuentran muy difundidos en la naturaleza y juegan un papel muy importante en los caracteres organolépticos o sensoriales de los alimentos. Sufren modificaciones con mucha facilidad, como las oxidaciones que contribuyen al envejecimiento y madurez del vino, desarrollándose así su buen sabor a la vez que evitan la oxidación de otros componentes del mismo, que darían compuestos contrarios a la buena calidad (Leandro, 1985). Sufren también complejaciones con metales y cambios debidos a modificaciones del pH, por lo que participan en procesos que dan lugar a cambios organolépticos en muchos alimentos.

INTRODUCCIÓN

Su importancia en enología es muy significativa, ya que entre estas sustancias se encuentran las responsables en mayor medida del color de las uvas (particularmente de las tintas o negras), jugando un importante papel en la evolución de los vinos con el envejecimiento.

En el caso del vino también son los responsables de la sensación de astringencia en la lengua y de la sensación que se nota en la boca (impresión táctil de los vinos). Además contribuyen al sabor, especialmente a los sabores amargos y a la apreciación organoléptica, distinguiéndose así un vino blanco de uno tinto no sólo por su sabor sino también por su olor.

Otras propiedades que tienen los polifenoles son (Hidalgo, 2003):

- * Propiedades bactericidas o bacteriostáticas, frente a microorganismos patógenos que produciendo alteraciones fisiológicas se desarrollan, ocasionalmente, en el aparato digestivo y, de manera particular, en el intestino.

- * Propiedades antitóxicas, de manera concreta frente a la toxicidad de los alcoholes, demostrada experimentalmente en ensayos con animales de laboratorio.

- * Valor vitamínico P, frente a la fragilidad de los vasos sanguíneos capilares, que pueden ocasionar hemorragias en estos conductos.

Los polifenoles del vino varían desde compuestos relativamente sencillos producidos por las vides, hasta sustancias sumamente complejas formadas durante el envejecimiento, así como otras extraídas por el vino de la madera de los barriles. Proviene básicamente de las partes sólidas de la uva, y en menor medida de la pulpa, siendo su aportación diferente según procedan de hollejos, pepitas o raspones, ya que la composición polifenólica del vino varía según el tiempo de contacto de cada una de estas partes con el mosto (Rapisarda, 2000)

INTRODUCCIÓN

1.9.1 Compuestos puros.

Una sustancia pura es aquella que tiene unas propiedades específicas que la caracterizan y que sirven para diferenciarla de otras sustancias. Las sustancias puras pueden ser elementos o compuestos.

Los compuestos puros son sustancias puras que se pueden descomponer en otras más simples por métodos químicos (Ej. El agua es un compuesto que se puede descomponer en dos gases (hidrógeno y oxígeno).

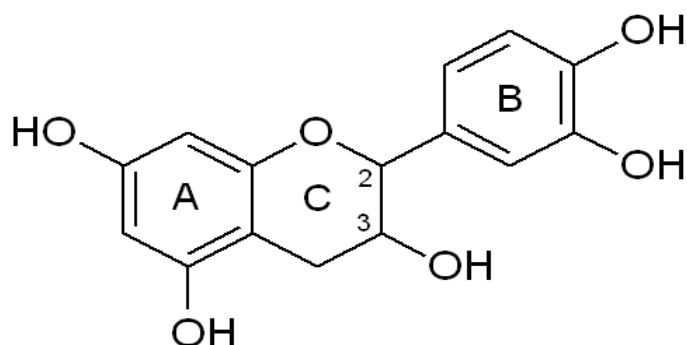
1.9.1.1 Catequina (C).

La catequina es un antioxidante polifenólico que procede de las plantas en las cuales aparece como un metabolito secundario. El término catequina se emplea comúnmente para referirse a la familia de los flavonoides y al subgrupo de los flavan-3-oles (o simplemente flavonoles). El nombre de catequina proviene de la familia de plantas denominada catechu (*Terra Japonica*) y concretamente del jugo extraído de la *Mimosa catechu*.

Se ha visto que la catequina entre otros compuestos fenólicos afectan en el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, aunque el mecanismo no está completamente estudiado (García-Ruiz, 2009).

La molécula de catequina posee dos anillos bencénicos (denominados los anillos A- y B-) y un heterociclo dihidropirano (el anillo C) con un grupo hidroxilo sobre el carbono 3. El anillo A es similar al grupo funcional del resorcinol mientras que el anillo B es similar al grupo funcional del catecol. Existen en la molécula dos centros de quiralidad, uno se encuentra en el carbono 2 y el otro sobre el 3. Por lo tanto, la catequina posee cuatro diastereoisómeros. Dos son isómeros trans y se denominan catequina y los otros dos son de configuración cis y se denominan epicatequina.

INTRODUCCIÓN



La catequina es el compuesto fenólico más abundante en el vino tinto (120-390 mg/L); en el vino blanco varía entre 16 y 46 mg/L (Frankel, 1995)

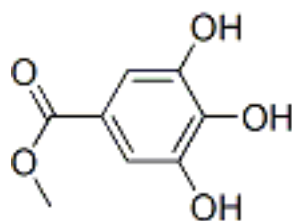
1.9.1.2 Metil galato (M)

El metil galato es un compuesto fenólico encontrado en *Terminalia myriocarpa* y *Geranium niveum*. También se encuentra en el vino.

Es un éster del ácido gálico

El punto de ebullición de esta molécula se encuentra entre 201-204°C, es soluble en etanol o en agua caliente.

Se ha visto que la catequina entre otros compuestos fenólicos afectan en el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, aunque el mecanismo no está completamente estudiado (García-Ruiz, 2009).



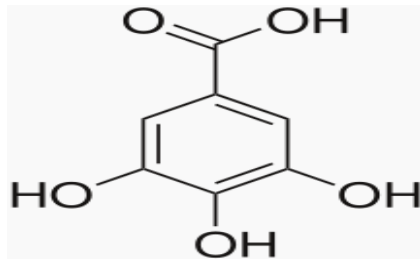
INTRODUCCIÓN

1.9.1.3 Ácido gálico (G)

El ácido gálico es un ácido orgánico también conocido como ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico, que se encuentra en las agallas, en las hojas de té, en la corteza de roble y otras plantas. El ácido gálico se encuentra tanto en su forma libre como formando taninos. Las sales y los ésteres del ácido gálico se denominan galatos.

Tiene usos en la industria farmacéutica como patrón para determinar el contenido de fenoles de diversos analitos mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. También se puede utilizar para sintetizar el alcaloide alucinógeno mescalina o 3,4,5-trimetoxifenetilamina.

El ácido gálico tiene propiedades antivíricas y antifúngicas, además actúa como antioxidante y protector de las células contra los oxidantes (Simonetti, 2014).



El ácido gálico es uno de los compuestos monoméricos más abundantes en el vino tinto (65-126 mg/L). Sin embargo, en el vino blanco varía entre 4-11 mg/L (Frankel, 1995).

1.9.1.4 Quercetina (Q).

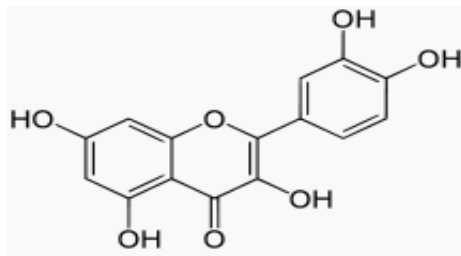
La quercetina es un flavonol que se encuentra presente en altas concentraciones tanto en frutas como en verduras. Es el flavonoide más abundante y el más habitual en la dieta humana, destacando por su elevada actividad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

Muchas plantas, ya sean consideradas medicinales o no, deben gran parte de sus beneficios a los altos niveles de quercetina que presentan. Por ejemplo, algunas clases de cebolla (como la roja) contienen tanta quercetina que el compuesto representa el 10% de su peso seco, siendo este hecho de donde derivan sus múltiples propiedades terapéuticas. Otros alimentos con niveles elevados de quercetina son otras clases de cebollas, lechugas, brócolis, arándanos, manzanas, aceite, té y vino tino (Rice-Evans, 1996).

Sus aplicaciones terapéuticas son diversas, siendo especialmente efectivo en el tratamiento y prevención de las enfermedades cerebrovasculares, la obesidad o el cáncer. Debido a su actividad antihistamínica hace que sea útil para la prevención de ataques alérgicos y de asma.

Un estudio realizado *in vitro* mostró que la quercetina y el resveratrol combinados inhiben la producción de células adiposas (Yang, 2010).



El contenido total de flavonoles, considerado como la suma de miricetina y quercetina, en vinos tintos varía entre 4,6 y 41,6 mg/L (McDonald, 1998). La miricetina y la quercetina se encuentran libres o conjugadas; la proporción de flavonoles libres varía entre un 20% y un 50% del total.

1.9.1.5 Taninos (Tan).

El término tanino fue originalmente utilizado para describir ciertas sustancias orgánicas que servían para convertir a las pieles crudas de animales en cuero, proceso

INTRODUCCIÓN

conocido en inglés como *tanning*. Se extraen de las plantas con agua o con una mezcla de agua y alcohol, que luego se decanta y se deja evaporar a baja temperatura hasta obtener el producto final. Los taninos tienen un ligero olor característico, sabor amargo y astringente, y su color va desde el amarillo hasta el castaño oscuro. Expuestos al aire se tornan oscuros y pierden su efectividad para el curtido. Los taninos se utilizan en el curtido porque reaccionan con las proteínas de colágeno presente en las pieles de los animales, uniéndolas entre sí, de esta forma aumenta la resistencia de la piel al calor, a la putrefacción por agua, y al ataque por microbios.

Químicamente son metabolitos secundarios de las plantas, fenólicos, no nitrogenados, solubles en agua y no en alcohol ni solventes orgánicos.

Los taninos poseen propiedades astringentes y antiinflamatorias, por lo tanto, son muy útiles ante diarrea o gastroenteritis.

Además, tienen acción antioxidante que protegen a las células ante los radicales libres y permiten reducir el riesgo de enfermedades degenerativas, sin embargo, no se debe abusar de los alimentos ricos en taninos, ya que en cantidades excesivas, pueden reducir la absorción de nutrientes como el hierro o las proteínas, y ser causante de carencias (Corder, 2001).

Podemos encontrar taninos en el vino tinto, las uvas, el té, el café, las espinacas, la granada, membrillo o manzana (Rice-Evans, 1996).

1.9.1.6 Resveratrol puro (RE)

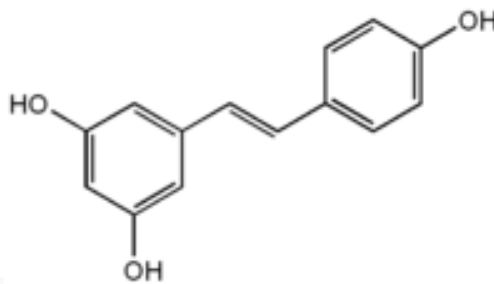
El resveratrol es una fitoalexina con varias propiedades biológicas y farmacológicas y del que depende el color característico del vino (Palmeri, 1999).

In vitro el resveratrol ha mostrado ser un fuerte antioxidante, un fitoestrógeno, un inhibidor de la tumorigénesis, un vasorelajador, un inhibidor de la agregación

INTRODUCCIÓN

plaquetaria, un inhibidor de la cicloxigenasa 2 y de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (Wang, 2002).

In vivo también se ha comprobado el efecto antioxidante del resveratrol con LDL de mujeres posmenopáusicas, el efecto antiinflamatorio y antiaterogénico al inhibir la expresión de moléculas de adhesión al endotelio en un modelo experimental murino (Bertelli, 2001), que tiene un efecto citostático sobre células tumorales colónicas a través de una supuesta inhibición de la ciclooxigenasa 2 y un efecto como antiagregante plaquetario en conejos hipercolesterolémicos y voluntarios humanos sanos (Wang, 2002)



La concentración del resveratrol, uno de los polifenoles del vino que más atención ha concitado, puede variar entre 0 y 2,9 mg/L en el vino tinto y entre 0 y 0,06 mg/L en el vino blanco (Frankel, 1995).

1.9.2 Extractos.

Un extracto es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua. Los extractos pueden comercializarse en forma de polvo. Los extractos están formados por distintos compuestos puros.

INTRODUCCIÓN

1.9.2.1 Extracto de semilla de uva (GSE).

La composición fenólica (mg/L) del extracto de semilla de uva (GSE) se muestra en la siguiente tabla. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mg/L)
<u>Flavonoles</u>	
Quercetina-3-glucósido	46,5 \pm 0,1
Miricetina-3-glucósido	15,0 \pm 0,1
Kaempferon-3-glucósido	10,6 \pm 0,1
<u>Ácidos fenólicos</u>	
Ácido gálico	18,8 \pm 0,1
Ácido protocatéquico	23,2 \pm 0,1
Ácido caftárico	193,4 \pm 0,9
Ácido clorogénico	22,9 \pm 0,1
<u>Catequinas y proantocianidinas</u>	
Dimero B1 (Ec-Cat)	111,6 \pm 0,3
Trímero (Ec-Ec-Cat)	319,9 \pm 4,0
Catequina (Cat)	182,7 \pm 1,1
Dímero B2 (Ec-Ec)	311,5 \pm 4,7
Epicatequina (Ec)	251,6 \pm 2,6
<u>Antocianinas</u>	
Delfinidina-3-glucósido	1,9 \pm 0,1
Peonidina-3-glucósido	6,1 \pm 0,1
Malvidina-3-glucósido	0,1 \pm 0,0
Malvidina-3-acetato	0,1 \pm 0,0
CFT^a	2478,4 \pm 6,1

^a Contenido fenólico total (CFT) (mg EAG/L) EAG: equivalentes de ácido gálico.

INTRODUCCIÓN

1.9.2.2 Extracto de uva (Pu).

La composición fenólica (mg/L) del extracto de uva se muestra en la siguiente tabla. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mg/L)
<u>Flavonoles</u>	
Quercetina-3-glucósido	4 \pm 0,0
Quercetina	7 \pm 0,0
<u>Ácidos fenólicos</u>	
Ácido gálico	37 \pm 0,1
Ácido homogentísico	21 \pm 0,0
Ácido protocatéquico	27 \pm 7,0
Ácido clorogénico	6 \pm 0,1
Ácido homovanílico	72 \pm 4,6
Ácido vanílico	41 \pm 2,0
Ácido p-cumárico	12 \pm 0,0
Ácido p-hidroxibenzoico	21 \pm 1,6
Ácido Sinápico	31 \pm 1,0
<u>Catequinas y proantocianidinas</u>	
Dímero B1 (Ec-Cat)	66 \pm 1,3
Catequina (Cat)	680 \pm 4,4
Dímero B2 (Ec-Ec)	130 \pm 23,1
Epicatequina (Ec)	806 \pm 8,1
TOTAL	3600^a \pm 0,0

^aTotal de contenido fenólico (mg GAE/L)

INTRODUCCIÓN

1.9.2.3 Resveratrol 1 (R1).

La composición fenólica (mg/L) del Resveratrol 1 se muestra en la siguiente tabla. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mg/L)
Gálico	23,53 \pm 1,39
Resveratrol	94,58 \pm 5,09
Malvidina	8,48 \pm 0,20

1.9.2.4 Resveratrol 2 (R2).

La composición fenólica (mg/L) del Resveratrol 2 se muestra en la siguiente tabla. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar.

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN (mg/L)
Gálico	12 \pm 2,08
Dímero B1 (Ec-Cat)	23,06 \pm 0,34
Catequina (Cat)	204,09 \pm 11,51
Dímero B2 (Ec-Ec)	26,21 \pm 2,32
Epicatequina (Ec)	147,4 \pm 11,96
Resveratrol	65,76 \pm 2,89
Malvidina	2,22 \pm 0,03

INTRODUCCIÓN

1.9.2.5 Extracto de semilla de uva (SCOM).

La composición fenólica (mg/L) del SCOM se muestra en la siguiente tabla.

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mg/L)
<u>Flavonoles</u>	
Quercetina-3-glucósido	71,7 \pm 0,5
Miricetin-3-glucósido	22,5 \pm 1,4
Kaempferol-3-glucósido	16,4 \pm 1,2
<u>Ácidos fenólicos</u>	
Ácido gálico	29,1 \pm 0,7
Ácido protocatéquico	36,1 \pm 1,3
Ácido clorogénico	35,5 \pm 0,1
Ácido homovanílico	2,9 \pm 0,1
Ácido caftárico	299,8 \pm 4,8
<u>Catequinas y proantocianidinas</u>	
Dímero B1 (Ec-Cat)	167,4 \pm 3,6
Catequina (Cat)	274,1 \pm 3,1
Dímero B2 (Ec-Ec)	486,2 \pm 4,7
Epicatequina (Ec)	381,5 \pm 5,6
Galato de epicatequina	6,4 \pm 0,6
<u>Antocianinas</u>	
Delfinidin-3-glucósido	2,8 \pm 0,2
Peonidin-3-glucósido	9,1 \pm 0,1
Malvidin-3-glucósido	0,2 \pm 0,0
TOTAL	3810,67 \pm 48,61

1.10 TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.

Se han utilizado diferentes técnicas para estudiar la acción de los compuestos fenólicos, la mayoría de ellos similares a los utilizados para el estudio de antibióticos como métodos de dilución y difusión, curvas de muerte, etc.

También se han utilizado técnicas que permiten detectar la posible permeabilidad de membrana o los cambios en el patrón de proteínas ribosomales que se producen al actuar el compuesto fenólico.

1.10.1 Estudio del daño de membrana mediante yoduro de propidio.

Yoduro de propidio es un agente de intercalación y una molécula fluorescente con una masa molecular de 668,4 Da que se puede utilizar para teñir las células. Cuando está ligada a los ácidos nucleicos, la excitación de la fluorescencia máxima es de 535 nm y la emisión máxima es de 617 nm. La energía de excitación puede ser suministrada con una lámpara de xenón o de arco de mercurio o con la línea de un láser de iones de argón 488. Yoduro de propidio se utiliza como una mancha de ADN, tanto para citometría de flujo, para evaluar la viabilidad celular o contenido de ADN en el análisis del ciclo celular, y la microscopía para visualizar el núcleo y otro ADN que contiene orgánulos. Se puede utilizar para diferenciar las células necróticas, apoptóticas y normal (Ganan, 2009).

Yoduro de propidio es el tinte más utilizado para evaluar cuantitativamente el contenido de ADN.

Yoduro de propidio se une al ADN por intercalación entre las bases con poca o ninguna secuencia de preferencia y con una estequiometría de un colorante por 4-5 pares de bases de ADN. También se une al ARN, que requiere tratamiento con

INTRODUCCIÓN

nucleasas para distinguir entre el ARN y la tinción de ADN. Una vez que el colorante se une a los ácidos nucleicos, su fluorescencia se ve reforzada 20 a 30 veces, la excitación de fluorescencia máxima se desplaza ~ 30-40 nm para el rojo y la emisión de fluorescencia máxima se desplaza ~ 15 nm para el azul (Lecoeur, 2002).

El yoduro de propidio es impermeable a la membrana y generalmente excluido de las células viables. Se utiliza comúnmente para la identificación de células muertas en una población y como un colorante de contraste en técnicas fluorescentes multicolores. Los protocolos de tinción de contraste a continuación son compatibles con una amplia gama de técnicas de etiquetado citológico-directa o métodos de detección basados en anticuerpos indirectos, ARNm hibridación in situ, o tinción con reactivos fluorescentes específicos para las estructuras celulares. Estos protocolos pueden ser modificados para la tinción de tejidos.

1.10.2 MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*).

El MALDI-TOF es una técnica de ionización suave que consiste en un espectrómetro de masas con un analizador de tiempo de vuelo.

Un espectrómetro de masas es un instrumento que separa los iones que se desplazan rápidamente según su relación masa/carga, m/z . La mayoría de los iones que se estudian presentan una sola carga, de modo que la relación es sencillamente la masa del ión.

El objetivo del sistema de entrada es introducir una cantidad muy pequeña (microgramos) en la fuente de iones, donde los componentes de la muestra se convierten en iones gaseosos mediante el bombardeo con electrones, fotones, iones o moléculas. Alternativamente, la ionización se puede conseguir con energía térmica o

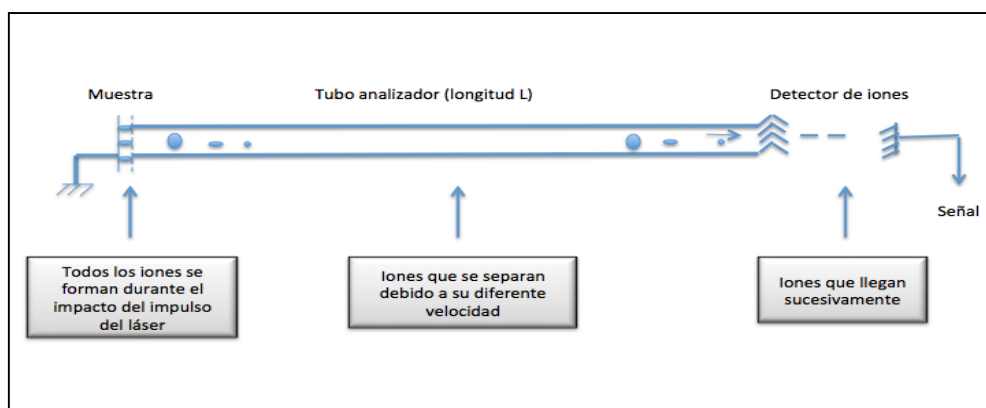
INTRODUCCIÓN

eléctrica. La señal de salida de la fuente de iones es un flujo de iones positivos (generalmente) o iones negativos gaseosos que son acelerados en el analizador de masas.

La función del analizador de masas es análoga a la de un monocromador en un espectrómetro óptico. En el primer caso, sin embargo, la dispersión se realiza en función de la relación m/q de los iones del analito, en vez de en la longitud de onda de los fotones.

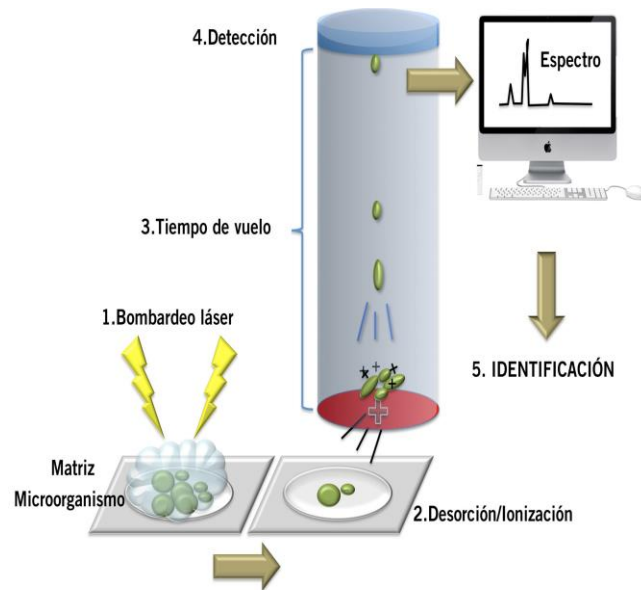
En los instrumentos de tiempo de vuelo (TOF), los iones positivos se producen periódicamente mediante el bombardeo de la muestra con impulsos cortos de electrones, iones secundarios o fotones generados por láser. Estos impulsos suelen tener frecuencias de 10 a 50 KHz y un tiempo de vida de 0,25 μ s. Los iones producidos de esta manera son acelerados después mediante un impulso de campo eléctrico de 10^3 a 10^4 V que tiene la misma frecuencia que el impulso de ionización, pero desfasada. Las partículas aceleradas pasan al tubo analizador de aproximadamente un metro de longitud y que no está sometido a ningún campo (Sauer, 2010).

Debido a que todos los iones que entran en el tubo idealmente tienen la misma energía cinética, sus velocidades dentro del tubo deben variar inversamente con sus masas, llegando al detector antes las partículas más ligeras, que las más pesadas.



INTRODUCCIÓN

El estudio directo bacteriano usando MALDI-TOF es una técnica rápida e innovadora para la identificación bacteriana (Sauer, 2008). Se basa en la comparación del espectro de masas de los componentes celulares, principalmente proteínas y péptidos.



1.10.2.1 Aplicaciones de MALDI-TOF en Microbiología Clínica.

La irrupción de MALDI-TOF en los laboratorios de diagnóstico microbiológico clínico, ha sido descrita por algunos autores como verdaderamente revolucionaria (Seng, 2009). A su facilidad de manejo y rapidez en la obtención de resultados, se une su versatilidad para identificar un gran número de microorganismos diferentes, desde bacterias hasta hongos. A todo esto hay que añadir otras aplicaciones que se están empezando a desarrollar que amplían enormemente su utilidad en la práctica clínica; detección directamente en muestras, estudios de sensibilidad y estudios de tipificación (Murray, 2010).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal va dirigido al estudio de la capacidad de inhibición que pueden presentar los compuestos fenólicos en aislamientos clínicos de *H. pylori*. Para ello se plantean los siguientes objetivos:

1. Caracterizar los aislamientos de *H. pylori* de un periodo de 4 años según el patrón de sensibilidad a amoxicilina, tetraciclina, claritromicina, levofloxacino, metronidazol y rifampicina y sus factores de virulencia.

2. Determinar la actividad de diferentes compuestos fenólicos extraídos del vino (extracto de semilla de uva, extracto de uva, catequina, metil galato, gálico, resveratrol, quercetina) mediante difusión con disco sobre aislamientos clínicos de *H. pylori*.

3. Estudiar la actividad de los compuestos fenólicos sobre *H. pylori* con diferentes factores de virulencia como los genes *cagA* y *vacA* y estudiar su comportamiento en cepas resistentes y sensibles a claritromicina.

4. Estudiar la actividad inhibitoria (CMI) mediante microdilución en caldo y la actividad bactericida mediante la realización de curvas de muerte de diferentes compuestos fenólicos en aislamientos clínicos de *H. pylori*.

5. Estudiar el mecanismo de acción que ejercen los compuestos fenólicos en *H. pylori*, mediante estudios de permeabilidad de membrana y estudios de proteínas ribosomales utilizando MALDI-TOF.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 *Helicobacter pylori*.

3.1.1 Número de cepas estudiadas.

Se estudiaron un total de 439 cepas de aislamientos clínicos de *H. pylori*, tanto de niños como de adultos desde el 1 de enero del 2010 hasta el 31 de diciembre del 2013. De ellas, en 86 aislamientos no se registró la edad de los pacientes. De las 353 cepas restantes, 315 correspondieron a niños (151 hombres y 164 mujeres) y 38 a adultos (19 hombres y 19 mujeres).

3.1.2 Procedencia de los microorganismos.

Todos los aislamientos clínicos de *H. pylori* se obtuvieron de muestras de biopsia gástrica de pacientes sometidos a endoscopia en los hospitales del Niño Jesús, Fuenlabrada, Doce de Octubre, La Mancha-Centro y La Princesa.

3.1.3 Transporte de las muestras.

Las biopsias obtenidas por endoscopia se depositaron en las paredes de un tubo estéril con 1 ml de solución salina para impedir su desecación y se enviaron rápidamente al laboratorio de Microbiología para ser procesadas, o bien se congelaron a -80° C y se enviaron por lotes.

Las muestras de La Mancha-Centro se enviaron en medio de transporte Porta-Germ.

3.1.4 Procesamiento de las muestras.

Las biopsias se recogieron del tubo con una torunda estéril y se rodaron repetidas veces sobre la superficie de una placa de agar Columbia con 5% de sangre de cordero (Biomèrieux) y de una placa de medio selectivo de agar PYLORI que se

MATERIALES Y MÉTODOS

incubaron en atmósfera microaerofílica a 37°C (Fig 1). La torunda se introdujo en 0,5 mL de caldo de urea de Christensen y se dejó a temperatura ambiente hasta 24 horas.

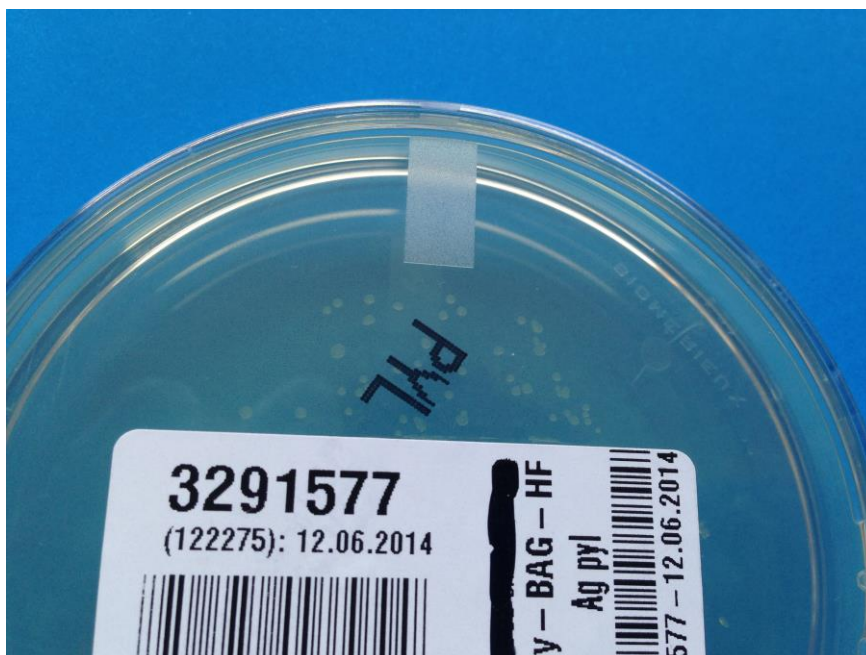


Fig 1. Placa de medio selectivo de agar PYLORI con crecimiento de la bacteria.

Las placas incubadas en microaerofilia se colocaron en una jarra para cultivo de anaerobios, donde se introdujo un sobre de GENbox microaer (Biomérieux) y se mantuvieron en estufa de 37°C durante un tiempo que osciló entre 4-14 días con revisión de las placas cada 48 horas.

3.1.5 Identificación de los microorganismos.

Las colonias con crecimiento pequeño y brillante con apariencia de *H. pylori* se subcultivaron en placas de agar Columbia con 5% de sangre de carnero y se identificaron por la metodología habitual: morfología de la colonia, tinción de Gram y la positividad de la ureasa, la catalasa y la oxidasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.6 Cepas control.

En este estudio se incluyó la cepa patrón *H. pylori* 146128 (Aznar, 2013).

3.1.7 Conservación de las cepas.

Las cepas se conservaron congeladas a -80°C . Para ello se recogieron el máximo número de colonias de una placa de Petri con una torunda y se depositaron en caldo de tripticasa de soja con 15% de glicerol.

Cuando una cepa fue requerida para posteriores estudios, se descongeló y se cultivó en placas de agar sangre, incubándose durante 4-5 días en estufa de CO_2 hasta obtener abundante crecimiento. A partir de ahí se subcultivaron cada 48 o 72 horas, dándoles pases a los medios necesarios según el estudio a realizar.

3.2 COMPUESTOS FENÓLICOS.

Los compuestos fenólicos fueron suministrados por el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL).

El CIAL es un instituto mixto perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Su objetivo es el desarrollo de la investigación científica de calidad en el área de Ciencia y Tecnología de Alimentos, así como la participación en la formación de jóvenes investigadores y profesionales, y en la transmisión de conocimiento a la sociedad.

En la siguiente tabla se muestra la composición de los extractos, teniendo en cuenta sólo, los compuestos puros estudiados y sus concentraciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracto	Compuesto puro	Concentración (mg/L)
Extracto de semilla de uva (GSE)	Ácido gálico	18,8
	Catequina	182,7
Extracto de uva (Pu)	Ácido gálico	37
	Catequina	680
	Quercetina	7
Resveratrol 1 (R1)	Ácido gálico	25,53
	Resveratrol	94,58
Resveratrol 2 (R2)	Ácido gálico	12
	Catequina	204,09
	Resveratrol	65,76
Extracto de semilla de uva (SCOM)	Ácido gálico	29,1
	Catequina	274,1

3.2.1 Preparación de catequina

400 mg de C (Sigma Aldrich) se disolvió en 10 ml de DMSO al 8% y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La dilución obtenida se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se cogió con una pipeta y se esterilizó mediante filtración con un filtro de membrana de 0,22 µm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

Posteriormente, se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.2 Preparación de metil galato

400 mg de M (Sigma Aldrich) se disolvió en 10 ml de DMSO al 8% y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La dilución obtenida se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se cogió con una pipeta y se esterilizó mediante filtración con un filtro de membrana de 0,22 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

Posteriormente, se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf.

3.2.3 Preparación del ácido gálico

400 mg de G (Sigma Aldrich) se disolvió en 10 ml de DMSO al 8% y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La dilución obtenida se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se cogió con una pipeta y se esterilizó mediante filtración con un filtro de membrana de 0,22 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

Posteriormente, se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf.

3.2.4 Preparación de quercetina

130 mg de Q (Sigma Aldrich) se disolvió en 10 ml de etanol al 100% y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La dilución obtenida se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se cogió con una pipeta y se esterilizó mediante filtración con un filtro de membrana de 0,22 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

Posteriormente, se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.5 Preparación de Resveratrol puro

80 mg de Re (Sigma Aldrich) se disolvió en 10 ml de DMSO al 100% y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La dilución obtenida se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se cogió con una pipeta y se esterilizó mediante filtración con un filtro de membrana de 0,22 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

Posteriormente, se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf.

3.2.6 Preparación de Taninos

400 mg de T obtenidos en el CIAL se disolvió en 10 ml de agua destilada y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La dilución obtenida se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se cogió con una pipeta y se esterilizó mediante filtración con un filtro de membrana de 0,22 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

Posteriormente, se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf.

3.2.7 Preparación de GSE

50 mg de extracto de semilla de uva (Laboratorios GSN, Madrid) se disolvió en 10 ml de agua destilada y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La dilución obtenida se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se cogió con una pipeta y se esterilizó mediante filtración con un filtro de membrana de 0,22 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) (Silván, 2013)

Posteriormente, se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.8 Preparación de Pu

400 mg de extracto de uva obtenidos en el CIAL se disolvió en 10 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) al 8% y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La dilución obtenida se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se cogió con una pipeta y se esterilizó mediante filtración con un filtro de membrana de 0,22 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

Posteriormente, se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf.

3.2.9 Preparación de SCOM

400 mg de SCOM (Laboratorios GSN, Madrid) se disolvió en 10 ml de agua destilada y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La dilución obtenida se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se cogió con una pipeta y se esterilizó mediante filtración con un filtro de membrana de 0,22 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany).

Posteriormente, se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf

3.2.10 Preparación del Resveratrol 1

400 mg de R1 obtenidos en el CIAL se disolvió en 10 ml de agua destilada y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La dilución obtenida se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se cogió con una pipeta y se esterilizó mediante filtración con un filtro de membrana de 0,22 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

Posteriormente, se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.11 Preparación del Resveratrol 2

400 mg de R2 obtenidos en el CIAL se disolvió en 10 ml de agua destilada y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La dilución obtenida se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se cogió con una pipeta y se esterilizó mediante filtración con un filtro de membrana de 0,22 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

Posteriormente, se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf.

En la siguiente tabla se muestra la concentración final en mg/ml de los distintos compuestos puros y extractos:

Compuestos puros	C	40 mg/ml
	M	40 mg/ml
	G	40 mg/ml
	Q	13 mg/ml
	RE	8 mg/ml
	Tan	40 mg/ml
Extractos	GSE	5 mg/ml
	Pu	40 mg/ml
	SCOM	40 mg/ml
	R1	40 mg/ml
	R2	40 mg/ml

MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.12 Conservación de los compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos se conservaron en eppendorf de 1 ml, congelados a -20°C, hasta que fueron utilizados.

3.3 ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO DE *H. pylori*.

3.3.1 Difusión en agar usando E-test.

Se probaron los antibióticos amoxicilina, claritromicina, rifampicina, levofloxacino, tetraciclina y metronidazol por E-test, y para ello se utilizaron tres placas de agar sangre; una para claritromicina y rifampicina, otra para metronidazol y levofloxacino y otra para amoxicilina y tetraciclina.

La tira de E-test con 15 diluciones seriadas desde 0,016 µg/ml hasta 256 µg/ml para AMX, CLA, TET Y MET y desde 0,002 µg/ml hasta 32 µg/ml para LEV Y RIF, se colocó sobre la superficie de una placa de agar sangre previamente inoculada con una torunda empapada en un cultivo fresco de *H. pylori* de 48-72 horas, ajustado a un inóculo de concentración 3 MacFarland. El antibiótico difunde de forma inmediata desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo, a lo largo de la tira, un gradiente exponencial de las concentraciones del antibiótico.

Tras la incubación de las placas durante 3-5 días a 37°C con 10% de CO₂ y 95% de humedad, la concentración mínima inhibitoria (CMI) se calculó como el valor obtenido en el punto donde intersecciona el extremo de la elipse de inhibición con la tira de E-test.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.2 Puntos de corte.

Se siguieron los puntos de corte recomendados por EUCAST en el 2011 usando el método del E-test, que son los que se emplean actualmente (EUCAST, 2014).

Antibiótico	Punto de corte CMI (mg/L)		NOTA
	S \leq	R $>$	
			1. Los puntos de cortes están basados en valores epidemiológicos cut-off (ECOFFs), los cuales distingue los aislados salvajes de aquellos con sensibilidad reducida
Amoxicilina	0,12 ¹	0,12 ¹	
Claritromicina	0,25 ¹	0,5 ¹	
Rifampicina	1 ¹	1 ¹	
Levofloxacino	1 ¹	1 ¹	
Tetraciclina	1 ¹	1 ¹	
Metronidazol	1 ¹	1 ¹	

En nuestro estudio, usamos los puntos de corte actuales en las cepas anteriores al 2011.

3.4 ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE LOS GENES *vacA* Y *cagA*.

3.4.1 Extracción del DNA cromosómico de *H. pylori*.

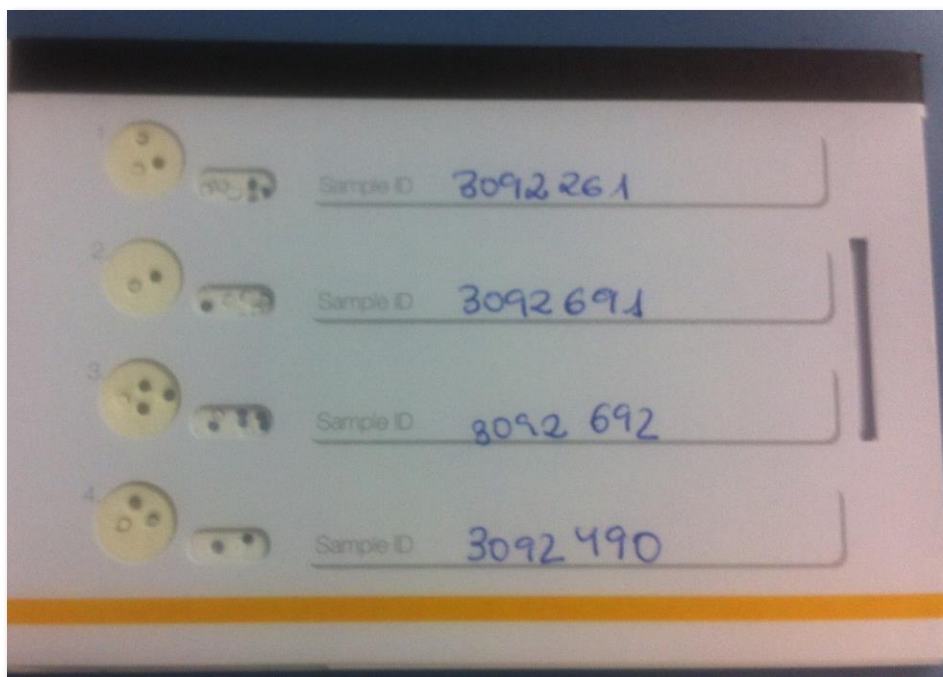
Se seleccionaron 53 cepas de *H. pylori*, se procedió a la extracción de su DNA y a realizar el estudio de la presencia de los genes *vacA* y *cagA*.

La extracción del DNA se realizó utilizando un novedoso sistema de tarjeta.

Se descongelaron los tubos con glicerina que contenía el microorganismo almacenado en el congelador a – 80 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se depositaron 20 μl de glicerina con el microorganismo en el círculo de la tarjeta whatman 2B BlackLight® Card (2B BlackBio, Biotools, Madrid, España). Estas tarjetas contienen productos químicos que conservan el DNA de la muestra durante 15 años a temperatura ambiente.



Posteriormente, se recoge el DNA del microorganismo mediante un punzón, pinchando en el círculo. Este punzón permite perforar pequeños discos y equivale a 5 μl de extracto de DNA.



MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.2 Detección del gen *vacA*.

3.4.2.1 Primers utilizados:

vacA s Forward-5' ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC 3' Tm 54°C

vacA s Reverse-5' CCT GAG ACC GTT CCT ACA GC 3' Tm 63°C

Que amplifica una secuencia de 176/200 pares de bases (pb) para *vacA s1/s2*.

3.4.2.2 Mastermix

Se utilizó el kit comercial illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare companies). Dicho kit contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ± 2,5 unidades de pureTaq polimerasa y buffer de reacción que deben reconstituirse para conseguir un volumen final de 25 µl. Para ello, además de un disco de la tarjeta con ADN, son necesarios 24 microlitros de una mezcla compuesta por:

	Volumen para cada muestra	Concentración final en la Mastermix
Primer <i>vacA s</i> Forward	0,625 µl	0,5 µM
Primer <i>vacA s</i> Reverse	0,625 µl	0,5 µM
Agua	22,75 µl	-

La reacción se llevó a cabo en el termociclador PCR Express GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer).

MATERIALES Y MÉTODOS

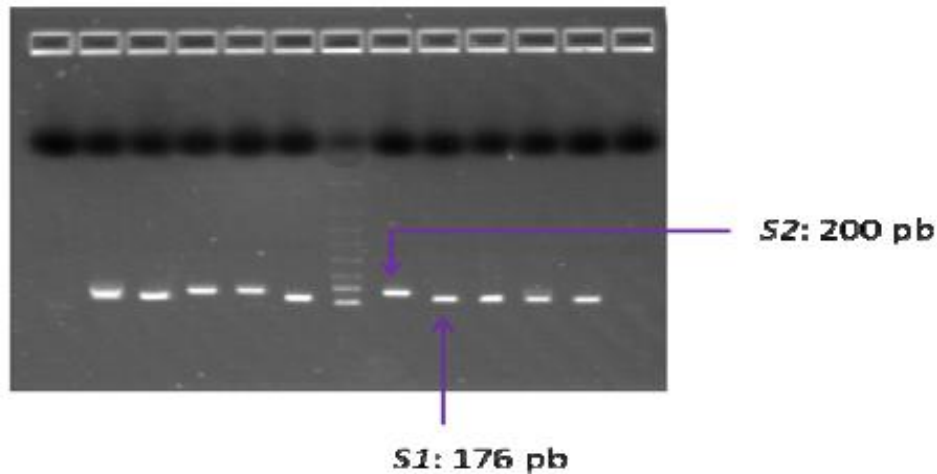
3.4.2.3 Condiciones de la PCR:

Condiciones de la PCR <i>vacA s</i>			
Pasos	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 minutos	1
Desnaturalización	94	45 segundos	30
Hibridación	52	45 segundos	
Extensión	72	45 segundos	
Extensión final	72	7 minutos	1

Temperatura final de mantenimiento 4°C.

3.4.2.4 Revelado de la PCR por electroforesis en gel de agarosa.

Se utilizaron geles de agarosa (Roche Diagnostics) al 2% en TBE-buffer (Merck KGaA) y como marcador de peso molecular se empleó el 50 pb ladder (Novagen).



3.4.3 Detección del gen *cagA*.

3.4.3.1 Primers utilizados:

cagA Forward-5' **ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA GCA A** 3' Tm 63°C

cagA Reverse-5' **TTA GAA TAA TCA ACA AAC ATC ACG CCA T** 3' Tm 63°C

Que amplifica una secuencia de 297 pares de bases (pb).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.3.2 Mastermix.

Se utilizó el kit comercial illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare companies). Dicho kit contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP, $\pm 2,5$ unidades de pureTaq polimerasa y buffer de reacción que deben reconstituirse para conseguir un volumen final de 25 μ l. Para ello, además de un disco de la tarjeta con ADN, son necesarios 24 microlitros de una mezcla compuesta por:

	Volumen para cada muestra	Concentración final en la Mastermix
Primer <i>cagA</i> Forward	0,375 μ l	0,3 μ M
Primer <i>cagA</i> Reverse	0,375 μ l	0,3 μ M
Agua	23,25 μ l	-

La reacción se llevó a cabo en el termociclador PCR Express GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer).

3.4.3.3 Condiciones de la PCR:

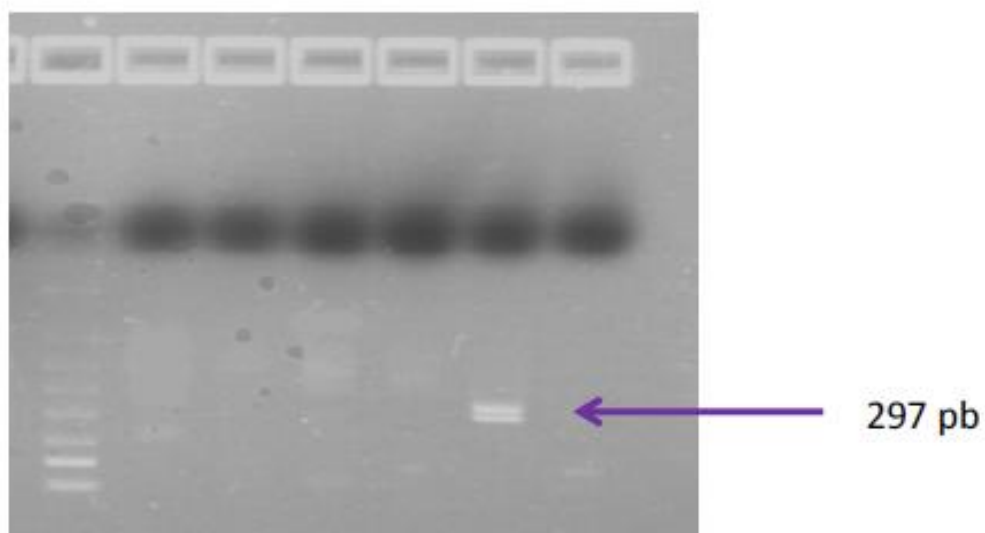
Condiciones de la PCR <i>cagA</i>			
Pasos	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	2 minutos	1
Desnaturalización	94	1 minuto	38
Hibridación	60	1 minuto	
Extensión	72	1 minuto	
Extensión final	72	5 minutos	1

Temperatura final de mantenimiento 4°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.3.4 Revelado de la PCR por electroforesis en gel de agarosa.

Se utilizaron geles de agarosa (Roche Diagnostics) al 2% en TBE-buffer (Merck KGaA) y como marcador de peso molecular se empleó el 50 pb ladder (Novagen).



3.5 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE DIFUSIÓN EN AGAR.

Se utilizaron discos blancos que se impregnaron con 10 μ l de compuesto fenólico. Se usaron 9 discos para cada uno de los siguientes compuestos: extracto de semilla de uva (GSE), extracto de uva, catequina, metil galato, resveratrol 1, resveratrol 2, quercetina y resveratrol puro.

El disco con el compuesto fenólico se colocó sobre la superficie de la placa inoculada con cultivo fresco de *H. pylori*, de la misma forma que para la sensibilidad a antibiótico. El compuesto difunde a través del agar, originándose concentraciones del mismo cada vez menores a medida que el agar está más alejado del disco. Si el microorganismo es sensible al compuesto del disco, no se produce crecimiento, lo que se traduce en la aparición de un halo de inhibición alrededor del disco. El diámetro de

MATERIALES Y MÉTODOS

este halo es proporcional a la sensibilidad del microorganismo probado. La lectura se realiza midiendo el diámetro del halo en milímetros.

Los discos blancos se conservaron a 2-8°C protegidos de la humedad.

3.6 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

FRENTE A *H. pylori*.

3.6.1 Curvas de muerte.

Es un método cinético de determinación del poder bactericida. Se valora la capacidad de matar en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de antimicrobiano enfrentando un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo. El poder bactericida se determina en la caída de 3 logaritmos decimales en un tiempo determinado.

En nuestro estudio se eligieron los siguientes compuestos fenólicos: Extracto de semilla de uva (GSE), el extracto de semilla de uva (SCOM), Resveratrol 1 y Resveratrol 2 y como microorganismos usamos 2 aislamientos clínicos de *H. pylori* y la cepa secuenciada HP 146128 a concentración 3 MacFarland, con las siguientes características de sensibilidad y patogenicidad. La concentración de los distintos compuestos fenólicos se encuentra en el apartado 3.2 de este trabajo.

CEPA	CLARITROMICINA	METRONIDAZOL	<i>vacA</i>	<i>cagA</i>
3166912	S	S	s2	neg.
3177553	R	S	s1	neg.
HP 146128	S	R	s2	neg.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron placas de 24 pocillos con capacidad de 2 ml cada uno, por cada cepa de *H. pylori* se usaron 5 pocillos. Todos contenían caldo compuesto por BHI suplementado con 10% de suero fetal bovino, extracto de levadura a concentración 5g/l, 20 mg/L de Ca^{2+} y 12,5 mg/L de Mg^{2+} y *H. pylori* a concentración 3 MacFarland, posteriormente se añadió 40 μl de cada uno de los compuestos fenólicos a 4 pocillos distintos y el quinto se dejó como control de crecimiento del *H. pylori*.

La placa se incubó en estufade CO_2 a 37°C y a horas predeterminadas (0, 16h, y 24 h) se depositaron 100 μl en una placa de micropocillos en la que se realizaron diluciones seriadas 1:10 para realizar recuento del número de colonias. En una placa de agar sangre dividida en 8 porciones se depositaron 10 μl procedentes de cada pocillo conteniendo diferentes diluciones.



Se incubaron a 37°C durante 3-5 días, para posteriormente realizar el recuento de colonias viables, y los resultados se representaron en una gráfica con el logaritmo del número de ufc/ml (eje Y) respecto a tiempo (número de horas, eje X).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.6.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI).

La CMI es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación. La CMI es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos.

La CMI puede ser determinada mediante métodos de microdilución en caldo, normalmente siguiendo las directrices de centros de referencia tales como el CLSI, BSAC o EUCAST.

En nuestro estudio utilizamos los siguientes compuestos fenólicos, que fueron el mayor número de compuestos que nos pudieron proporcionar el CIAL para obtener una mayor visión de cómo actuaban: GSE, extracto de uva, catequina, metil galato, galico, Resveratrol 1, Resveratrol 2, quercetina, Resveratrol puro, y taninos, y como microorganismos usamos 3 aislamientos clínicos de *H. pylori* a concentración 3 MacFarland, con las siguientes características de sensibilidad y patogenicidad.

CEPA	CLARITROMICINA	METRONIDAZOL	vacA	cagA
3180768	R	R	s2	neg.
3181005	R	S	s2	neg.
3181006	S	R	s1	pos.

Para la realización de la microdilución, preparamos caldo compuesto por BHI suplementado con 10% de suero fetal bovino, extracto de levadura a concentración 5g/l, 2 µl/ml de Ca²⁺ y 1 µl/ml de Mg²⁺. El microorganismo se diluyó en el caldo preparado a una concentración de 3 MacFarland. Se preparó 1 ml de los distintos compuestos

MATERIALES Y MÉTODOS

fenólicos disueltos en el caldo anterior, hasta conseguir una concentración final de 2048 µg/ml.

En el primer pocillo de una placa microtiter, se añadió 200 µl de compuesto fenólico a la concentración de 2048 µg/ml y en el resto de los pocillos se añadió 100 µl de caldo BHI preparado anteriormente. A continuación, se realizó diluciones seriadas 1:2 de cada compuesto y se añadió 100 µl de *H. pylori* 3 MacFarland a cada pocillo.

Se incluyó un pocillo como control de esterilidad (sólo con caldo) y otro como control de crecimiento (caldo y *H. pylori*).

Se incubó de 5 a 7 días, y se leyó según la turbidez observada en los pocillos.

3.6.3 Estudio del daño de membrana mediante yoduro de propidio.

3.6.3.1. Preparación del yoduro de propidio.

Se pesó 2 mg de yoduro de propilo y se disolvió en 1 ml de PBS. Esta solución puede mantenerse 1 mes a la temperatura de 4°C.

3.6.3.2. Protocolo.

Para este estudio utilizamos los siguientes compuestos fenólicos: GSE, catequina, metil galato, galico, Resveratrol 1, Resveratrol 2, quercetina, Resveratrol puro y SCOM y como microorganismos usamos 4 aislamientos clínicos de *H. pylori* y la cepa secuenciada HP 146128 a concentración 3 MacFarland, con las siguientes características de sensibilidad y patogenicidad.

CEPA	CLARITROMICINA	METRONIDAZOL	<i>vacA</i>	<i>cagA</i>
------	----------------	--------------	-------------	-------------

MATERIALES Y MÉTODOS

3167664	S	S	s1	neg.
3166912	S	S	s2	neg.
3175144	S	R	s2	neg.
3177553	R	S	s2	neg.
HP 146128	S	R	s2	neg.

Para la realización de este estudio, se preparó caldo compuesto por BHI suplementado con 10% de suero fetal bovino, extracto de levadura a concentración 5g/l, 2 $\mu\text{l/ml}$ de Ca^{2+} y 1 $\mu\text{l/ml}$ de Mg^{2+} . El microorganismo se diluyó en el caldo preparado a una concentración de 3 MacFarland.

Se prepararon 8 tubos eppendorf de 1 ml para cada uno de los microorganismos, a los que se le añadió 1 ml de microorganismo a la concentración de 3 MacFarland y 40 μl compuesto fenólico (un compuesto para cada eppendorf).

Se centrifugaron todos los tubos a 1300 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y posteriormente se añadió 1 ml de PBS. Esta operación se realizó dos veces más. Posteriormente se resuspendió la solución y se añadió 1 μl de yoduro de propidio a una concentración de 2mg/ml. Se almacenaron durante 10 minutos en la oscuridad. A continuación, se centrifugaron todos los eppendorf a 1300 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de PBS. Esta operación se realizó dos veces más. Posteriormente se resuspendió la solución y se depositaron 100 μl de cada uno de los tubos en una placa de microtiter, donde se midió la fluorescencia en un lector de microplacas Biotek Synergy HT Multi-Mode con una longitud de onda de excitación de 495 nm y una longitud de onda de emisión de 615 nm. Los datos de fluorescencia para cada muestra fueron normalizados con la densidad óptica a 600 nm.

3.6.4. Estudio sobre el efecto proteínico en *H. pylori* mediante MALDI-TOF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio utilizamos los siguientes compuestos fenólicos: GSE, Resveratrol 1, Resveratrol 2, y SCOM y como microorganismos usamos 3 aislamientos clínicos de *H. pylori* a concentración 3 MacFarland, con las siguientes características de sensibilidad y patogenicidad:

CEPA	CLARITROMICINA	METRONIDAZOL	vacA	cagA
3167664	S	S	s1	neg.
3166912	S	S	s2	neg.
3175144	S	R	s2	neg.

3.6.4.1 Extracción de la muestra.

Se prepararon 4 tubos eppendorf para cada uno de los microorganismos, a los que se le añadió 1 ml de microorganismo a la concentración de 3 MacFarland y 40 µl compuesto fenólico (un compuesto para cada eppendorf).

El tubo con 1 ml de la solución de *H. pylori* y 3 MacFarland y compuesto fenólico se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto, se eliminó el sobrenadante utilizando una pipeta, se le añadió 1 ml de PBS y se agitó en vórtex. Esta operación se realizó 3 veces.

Se cogió 300 µl de la solución final y se le añadió 900 µl de etanol y se agitó en vortex. Se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto, se eliminó el sobrenadante utilizando una pipeta y se añadió un volumen de ácido fórmico al 70% proporcional al tamaño del sedimento. Se agitó intensamente en vórtex y se añadió el mismo volumen de acetonitrilo que de ácido fórmico al 70%. Se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto y se analizó el sobrenadante.

3.6.4.2 Analisis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se depositó 1 μ l del sobrenadante en una placa metálica MALDI (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), que se dejó secar completamente. Posteriormente se añadió 1 μ l de Matriz HCCA y se dejó secar completamente.

La identificación de la bacteria se realizó mediante la obtención de espectros que fueron comparados con una base de datos (Biotyper). La identificación se dio válida cuando obtuvo un score mayor o igual a 2.

Los espectros fueron obtenidos con un Microflex LT espectrómetro de masas, que se analizó con un software Bruker Daltonics Biotyper 3.0, que permitió obtener el índice de correlación (CCI). Este índice permite hacer análisis estadísticos, para el estudio de la relación entre espectros.

3.7 ESTUDIO ESTADÍSTICO.

Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statics 20.0 para Mac.

Para evaluar el grado de asociación entre variables cualitativas entre sí se utilizó el estadístico Chi cuadrado, considerándose una diferencia estadísticamente significativa cuando $p \leq 0.05$.

La comparación de medias cuantitativas se realizó usando el estadístico t-student, previa comprobación de igualdad de varianzas mediante el test de Levene. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

4.1 ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO DE *H. pylori*.

4.1.1 Sensibilidad global a antibióticos

Los datos de sensibilidad global a amoxicilina, claritromicina, rifampicina, levofloxacino, tetraciclina y metronidazol, se muestra en la tabla 4.1 y figura 4.1.

ANTIBIÓTICO	N° TOTAL DE AISLAMIENTOS	RESISTENTES n (%)	SENSIBLES n (%)
AMOXICILINA	435	58 (13,3%)	377 (86,7%)
CLARITROMICINA	436	230 (52,8%)	206 (47,2%)
RIFAMPICINA	420	130 (31%)	290 (69%)
LEVOFLOXACINO	397	26 (6,5%)	371 (93,5%)
TETRACICLINA	431	3 (0,7%)	428 (99,3%)
METRONIDAZOL	435	150 (34,5%)	285 (65,5%)

Tabla 4.1. Número y porcentaje de cepas sensibles y resistentes a los 6 antibióticos probados.

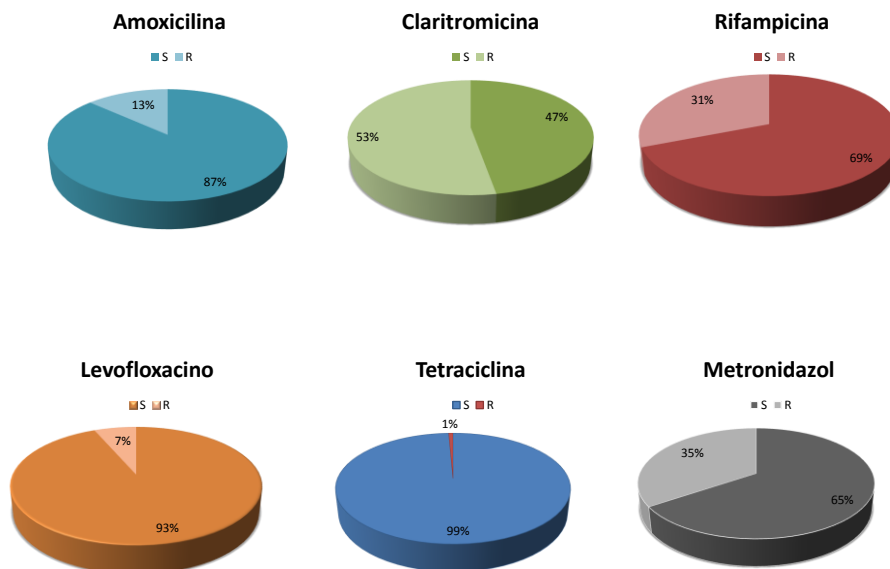


Fig 4.1. Porcentajes de resistencia y sensibilidad a AMX, CLA, RIF, LEV, TET y MET por difusión en agar con E-test.

RESULTADOS

4.1.2 Sensibilidad a antibióticos según la edad.

Se agruparon a los pacientes en 3 grupos según la edad: de 0 a 10 años, de 11 a 17 años y mayor de 18 años. Para amoxicilina hubo 28 cepas resistentes (15,7%) y 150 sensibles (84,3%) en niños de 0 a 10 años, entre 11 y 17 años, hubo 17 cepas resistentes (12,7%) y 117 cepas sensibles (87,3%) y para mayores o igual a 18 años hubo 10 resistentes (26,3%) y 28 sensibles (73,7%).

Para claritromicina, en niños de 0 a 10 años hubo 99 cepas resistentes (55,3%) y 80 cepas sensibles (44,7%), entre 11 y 17 años hubo 63 resistentes (47%) y 71 sensibles (53%) y en mayores o igual a 18 años hubo 25 resistentes (65,8%) y 13 sensibles (34,2%).

Para rifampicina, en niños de 0 a 10 años hubo 59 cepas resistentes (33,3%) y 118 cepas sensibles (66,7%), entre 11 y 17 años hubo 26 resistentes (20,3%) y 102 sensibles (79,7%) y en mayores o igual a 18 años hubo 17 resistentes (47,2%) y 19 sensibles (52,8%).

Para levofloxacino, en niños de 0 a 10 años hubo 4 cepas resistentes (2,7%) y 142 cepas sensibles (97,3%), entre 11 y 17 años hubo 5 resistentes (4,9%) y 98 sensibles (95,1%) y en mayores o igual a 18 años hubo 6 resistentes (26,1%) y 17 sensibles (73,9%).

Para tetraciclina, en niños de 0 a 10 años hubo 1 cepa resistente (0,6%) y 176 cepas sensibles (99,4%), entre 11 y 17 años no hubo ninguna cepa resistente, hubo 133 cepas sensibles y en mayores o igual a 18 años hubo 1 resistente (2,6%) y 37 sensibles (97,4%).

Para metronidazol, en niños de 0 a 10 años hubo 72 cepas resistentes (40%) y 108 cepas sensibles (60%), entre 11 y 17 años hubo 39 resistentes (29,1%) y 95

RESULTADOS

sensibles (70,9%) y en mayores o igual a 18 años hubo 23 resistentes (60,5%) y 15 sensibles (39,5%). (Fig 4.2).

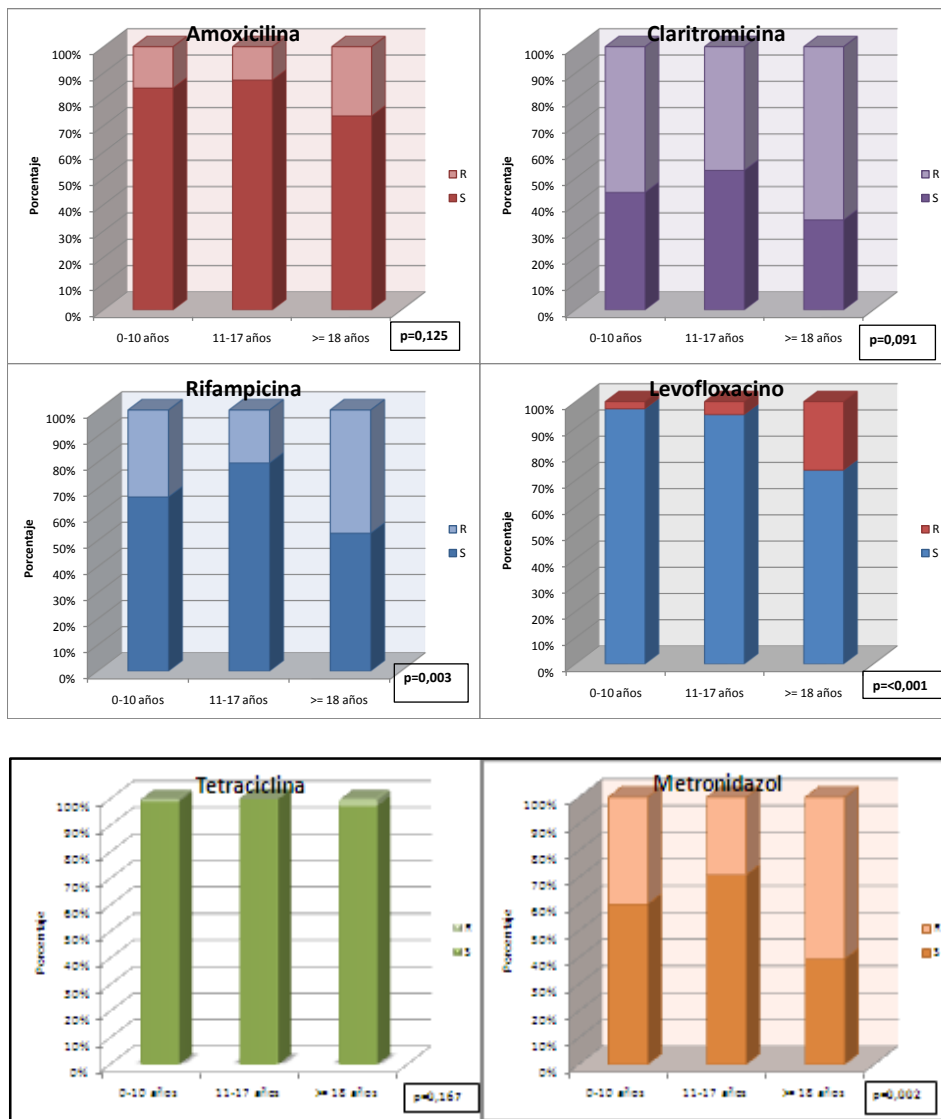


Fig 4.2. Porcentaje de resistencia y sensibilidad a AMX, CLA, RIF, LEV, TET y MET.

RESULTADOS

4.1.3 Sensibilidad a antibióticos según el sexo.

De las 439 cepas estudiadas, 227 correspondían a mujeres (51,7%) y 212 a hombres (48,3%).

La sensibilidad global a amoxicilina, claritromicina, rifampicina, levofloxacino, tetraciclina y metronidazol según el sexo, se muestra en la tabla 4.2 y en la figura 4.3.

ANTIBIOTICO	SEXO	n° R (%)	n° S (%)	p
AMOXICILINA	MUJERES	25 (11,1%)	201 (88,9%)	0,147
	HOMBRES	33 (15,8%)	176 (84,2%)	
CLARITROMICINA	MUJERES	123 (54,2%)	104 (45,8%)	0,532
	HOMBRES	107 (51,2%)	102 (48,8%)	
RIFAMPICINA	MUJERES	68 (31,3%)	149 (68,7%)	0,860
	HOMBRES	62 (30,5%)	141 (69,5%)	
LEVOFLOXACINO	MUJERES	10 (6,4%)	146 (93,6%)	0,795
	HOMBRES	10 (6,9%)	135 (93,1%)	
TETRACICLINA	MUJERES	1 (0,4%)	223 (99,6%)	0,517
	HOMBRES	2 (1%)	205 (99%)	
METRONIDAZOL	MUJERES	74 (32,7%)	152 (67,3%)	0,427
	HOMBRES	76 (36,4%)	133 (63,6%)	

Tabla 4.2. Número y porcentaje de cepas resistentes y sensibles a cada antibiótico en hombres y mujeres.

RESULTADOS

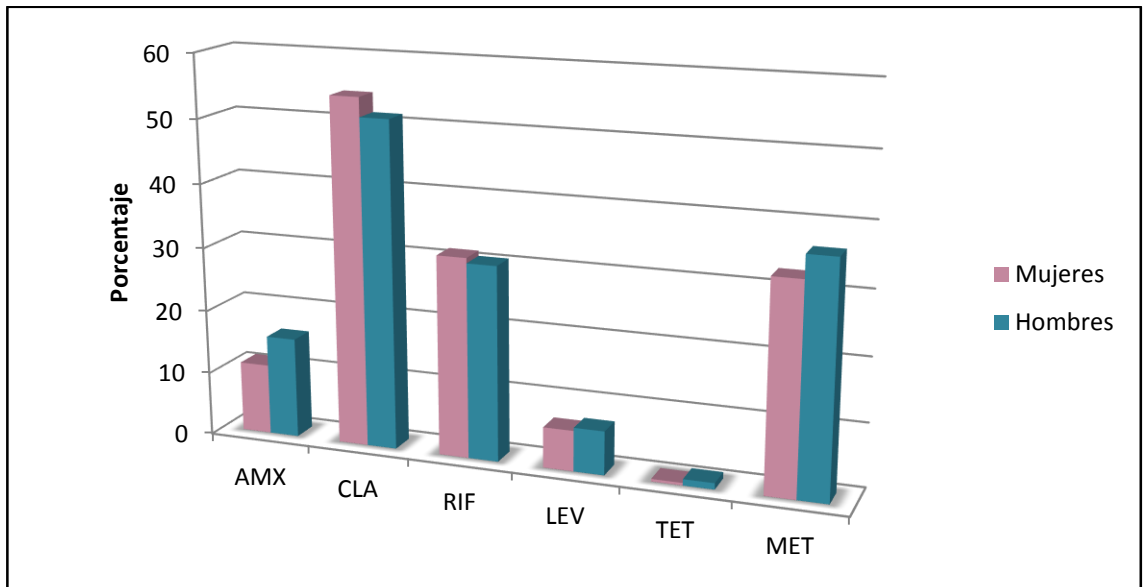


Fig 4.3. Porcentaje global de resistencia (R) a AMX, CLA, RIF, LEV, TET y MET según el sexo

4.1.4 Resistencia a antibióticos por cada año del estudio.

a) Resistencia global.

Si miramos cada año del estudio, desde 2010 hasta 2013, con datos globales, la resistencia a amoxicilina en el año 2010 fue del 20,2%, en 2011 del 14,3%, en 2012 del 5,2 y en 2013 del 10,3%. Para claritromicina, la resistencia en 2010 fue del 53,9%, en 2011 del 58%, en 2012 del 50,6% y en 2013 del 47,9%. Para rifampicina, la resistencia en 2010 fue del 25,8%, en 2011 del 33,9%, en 2012 del 27,6% y en 2013 del 36,1%. Para levofloxacino, la resistencia en 2010 fue del 5%, en 2011 del 9%, en 2012 del 8,3% y en 2013 del 5,9%. Para tetraciclina, la resistencia en 2010 fue del 0,8%, en 2011 del 0%, en 2012 del 1,3% y en 2013 del 0,9%. Para metronidazol, la resistencia en 2010 fue del 38,3%, en 2011 del 33%, en 2012 del 31,6% y en 2013 del 33,6%. (Fig 4.4).

RESULTADOS

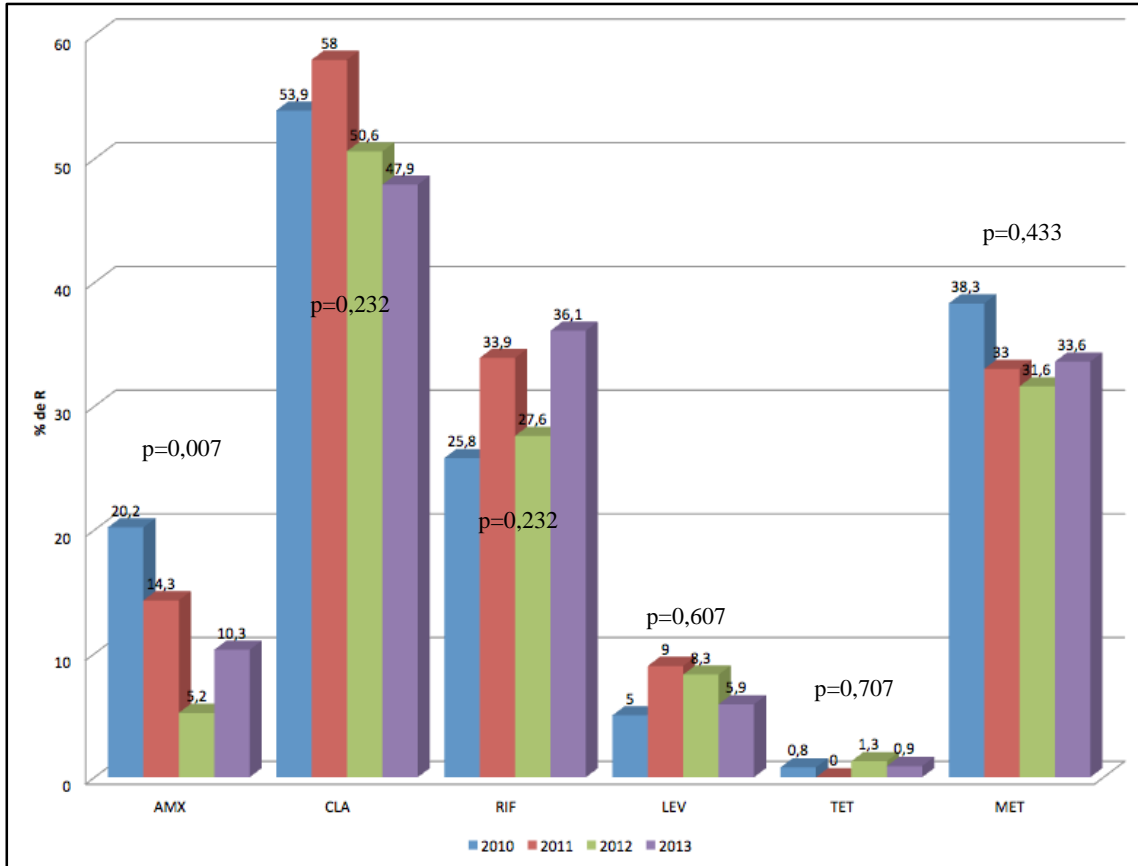


Fig 4.4. Porcentaje de resistencia global a AMX, CLA, RIF, LEV, TET y MET.

Aunque se observa una disminución de la resistencia para amoxicilina, claritromicina y metronidazol, sólo fue estadísticamente significativo con amoxicilina ($p < 0,01$)

b) Resistencia según la edad.

Separando los datos por años en cuanto a la edad, en los niños la evolución de la resistencia a amoxicilina en el año 2010 fue del 20,7%, en 2011 del 13,2%, en 2012 del 3,6% y en 2013 del 14%. Para claritromicina, la resistencia en 2010 fue del 50,4%, en 2011 del 57,1%, en 2012 del 43,9% y en 2013 del 54%. Para rifampicina, la resistencia en 2010 fue del 24,8%, en 2011 del 34,1%, en 2012 del 23,6% y en 2013 del 28,3%. Para ciprofloxacino, la resistencia en 2010 fue del 0,9%, en 2011 del 4,4%, en 2012 del 8,7% y en 2013 del 4,7%. Para tetraciclina, la resistencia en 2010 fue del 0,9%, y en

RESULTADOS

2011, 2012 y 2013 del 0%. Para metronidazol, la resistencia en 2010 fue del 34,8%, en 2011 del 33%, en 2012 del 36,8% y en 2013 del 39,2%. (Fig 4.5).

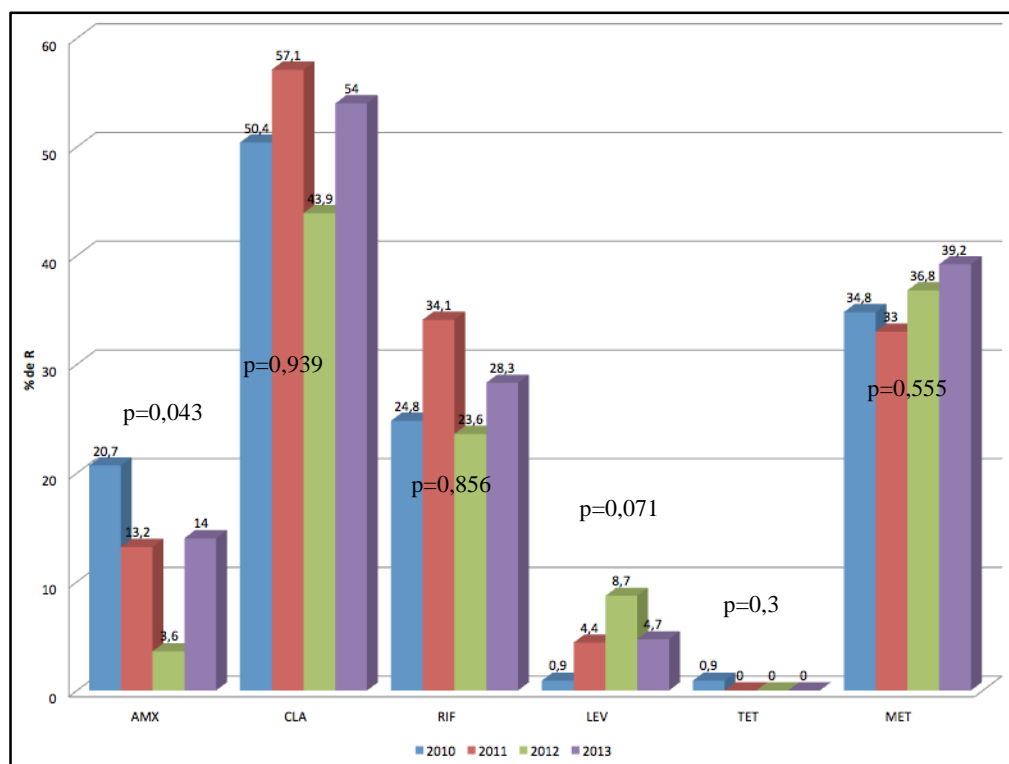


Fig 4.5. Porcentaje de resistencia por años a AMX, CLA, RIF, LEV, TET y MET en aislamientos de *H. pylori* obtenidos de niños.

En niños hay una disminución estadísticamente significativa de la resistencia a amoxicilina ($p < 0,05$), sin embargo, se observa un aumento de la resistencia para levofloxacino, aunque no es estadísticamente significativo.

En los adultos, la resistencia a amoxicilina en el año 2010 fue del 14,3%, en 2011 del 33,3%, en 2012 del 20% y en 2013 del 26,7%. Para claritromicina, la resistencia en 2010 fue del 85,7%, en 2011 del 66,7%, en 2012 del 80% y en 2013 del 53,3%. Para rifampicina, la resistencia en 2010 fue del 16,7%, en 2011 del 33,3%, en 2012 del 40% y en 2013 del 71,4%. Para levofloxacino, la resistencia en 2010 fue del

RESULTADOS

28,6%, en 2011 del 33,3%, en 2012 del 25% y en 2013 del 33,3%. Para tetraciclina, la resistencia en 2010 fue del 0%, en 2011 del 0%, en 2012 del 0% y en 2013 del 6,7%. Para metronidazol, la resistencia en 2010 fue del 85,7%, en 2011 del 50%, en 2012 del 60% y en 2013 del 60%. (Fig 4.6).

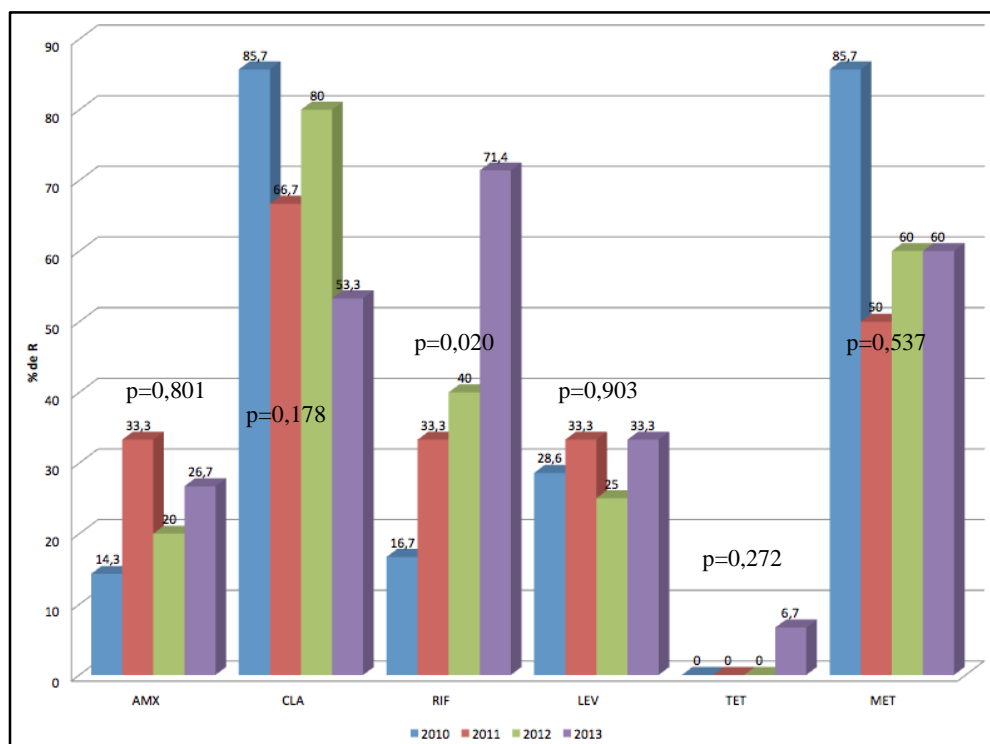


Fig 4.6. Porcentaje de resistencia por años a AMX, CLA, RIF, LEV, TET y MET en aislamientos de *H. pylori* obtenidos de adultos.

Se observa un aumento estadísticamente significativo de la resistencia a rifampicina en adultos.

4.2 ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE LOS GENES *vacA* y *cagA*.

4.2.1 Presencia de los alelos *s1* y *s2* del gen *vacA*.

La secuencia señal del gen *vacA* se presentó como forma *s1* en el 18,9% de las cepas probadas (10 de 53 probadas), mientras que el 81,1% de las cepas (43 de 53 probadas) presentaban el alelo *s2* (Fig 4.7).

RESULTADOS

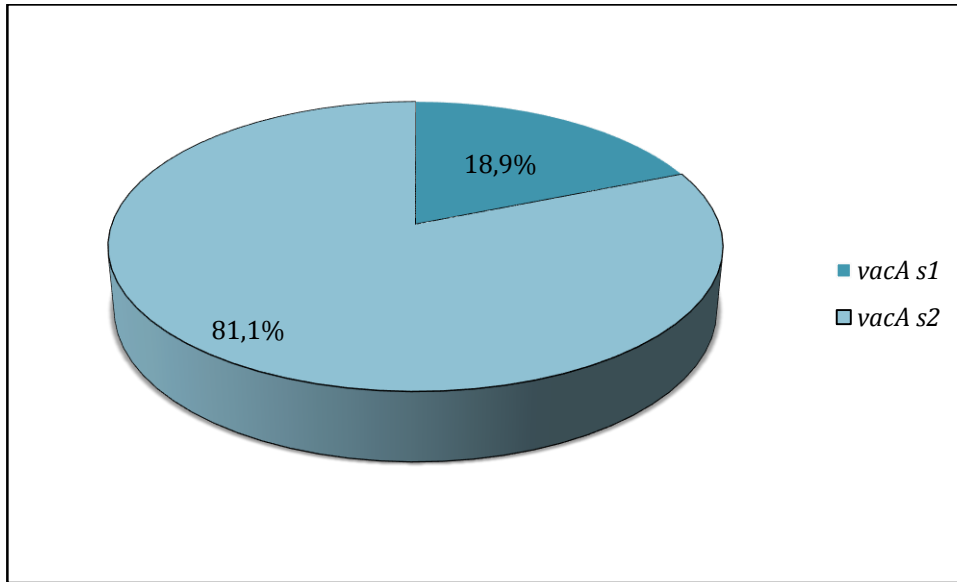


Fig. 4.7. Presencia de los alelos *s1* y *s2* del gen *vacA*

4.2.2 Presencia del gen *cagA*.

El 18,9 % de las cepas presentaron el gen *cagA* (10 de 53 probadas *cagA+*). El 81,1% no lo presentaron (43 de 53 probadas *cagA-*). (Fig. 4.8).

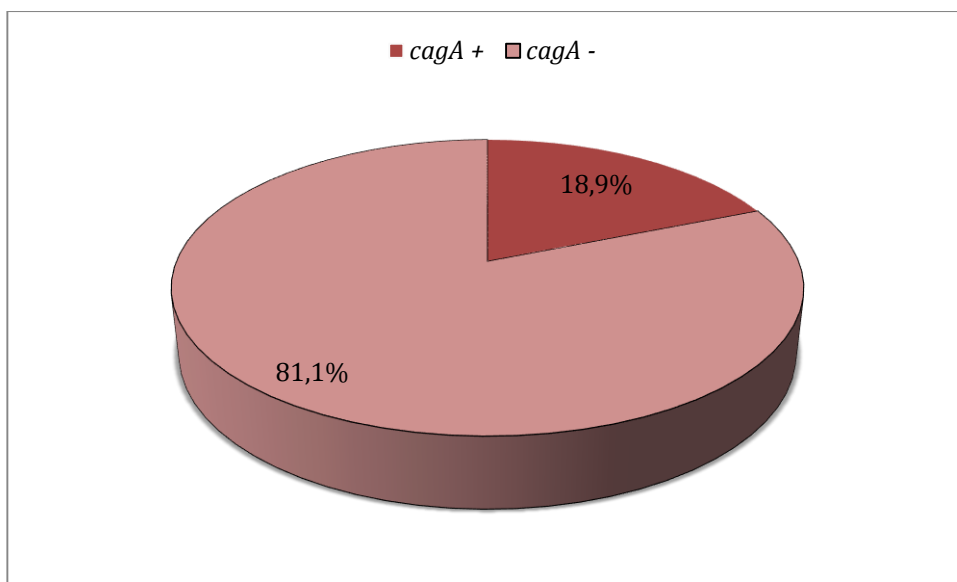


Fig 4.8. Presencia del gen *cagA*.

RESULTADOS

4.2.3. Relación entre la presencia del gen *vacA* y el gen *cagA*.

En la tabla 4.3 se muestra el número y el porcentaje de cepas con gen *vacA* y *cagA* (Fig 4.9):

	<i>vacA s1</i> n (%)	<i>vacA s2</i> n (%)	p
<i>cagA</i> -	4 (9,3)	39 (90,7%)	<0,001
<i>cagA</i> +	6 (60)	4 (40)	Odd: 0,068 IC95%:0,013-0,349

Tabla 4.3. Número y porcentaje de cepas con gen *vacA* y *cagA*.

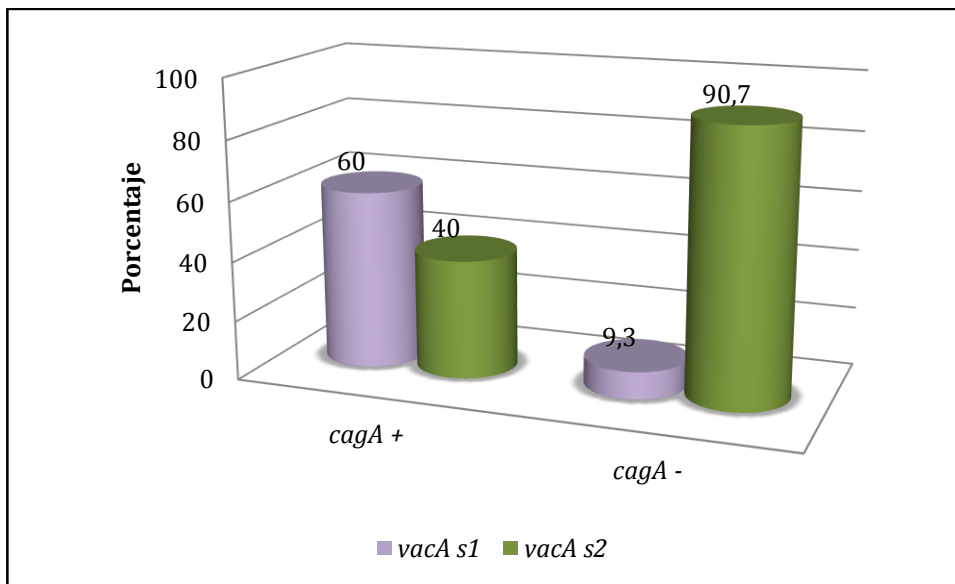


Fig 4.9. Relación entre los genes *vacA* y *cagA*.

4.2.4 Relación entre los alelos del gen *vacA* y la edad.

De las 53 cepas a las que se le hizo el estudio de la presencia de los alelos del gen *vacA*, 27 correspondieron a niños entre 0 y 10 años, 23 cepas correspondieron a adolescentes entre 11 y 17 años, 2 a adultos y una se desconocía la edad.

RESULTADOS

En los niños con edades comprendidas entre 0 y 10 años, de las 27 cepas con presencia del gen *vacA*, 5 correspondieron al alelo *s1* (18,5% de las cepas *vacA s1*) y 22 al alelo *s2* (81,5% de las cepas *vacA s2*).

En los adolescentes con edades comprendidas entre 11 y 17 años, de las 23 cepas con presencia del gen *vacA*, 5 correspondieron al alelo *s1* (21,7% de las cepas *vacA s1*) y 18 al alelo *s2* (78,3% de las cepas *vacA s2*).

En los adultos, las dos cepas correspondieron al alelo *s2* (100% de las cepas *vacA s2*). (Fig 4.10).

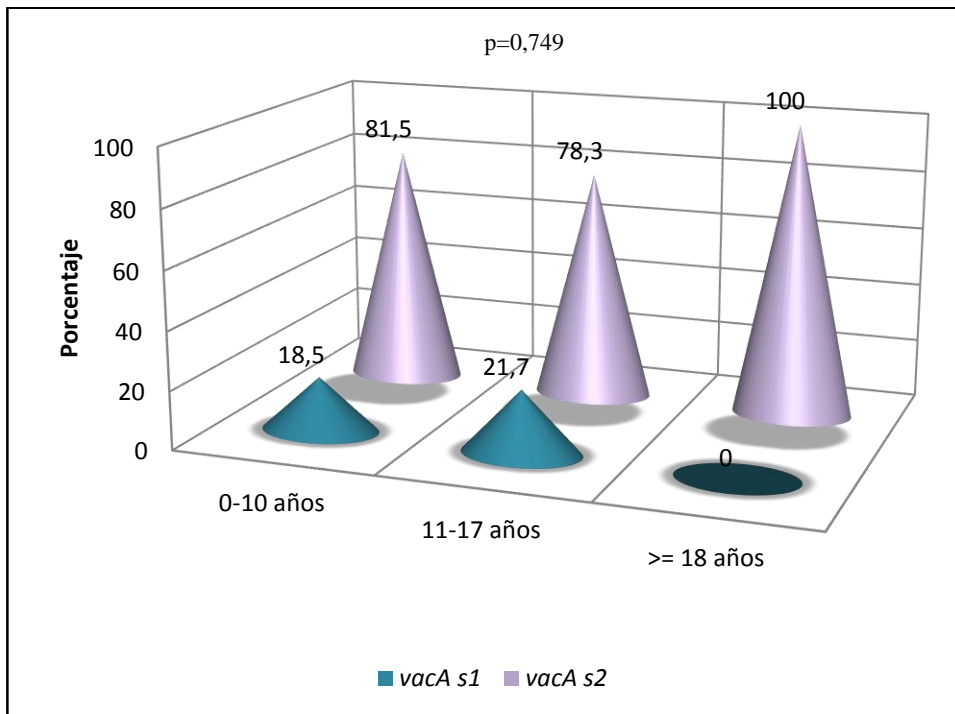


Fig 4.10. Relación entre los alelos del gen *vacA* y la edad.

4.2.5 Relación entre la presencia del gen *cagA* y la edad.

En los niños con edades comprendida entre 0 y 10 años, de las 27 cepas estudiadas, 3 presentaron el gen *cagA* (11,1% de las cepas *cagA+*) y 24 no (88,9% de las cepas *cagA-*).

RESULTADOS

En los adolescentes con edades comprendida entre 11 y 17 años, de las 23 cepas estudiadas, 7 presentaron el gen *cagA* (30,4% de las cepas *cagA+*) y 16 no (69,6% de las cepas *cagA-*).

En los adultos, las dos cepas no presentaron el gen *cagA* (100% de las cepas *cagA-*). (Fig 4.11).

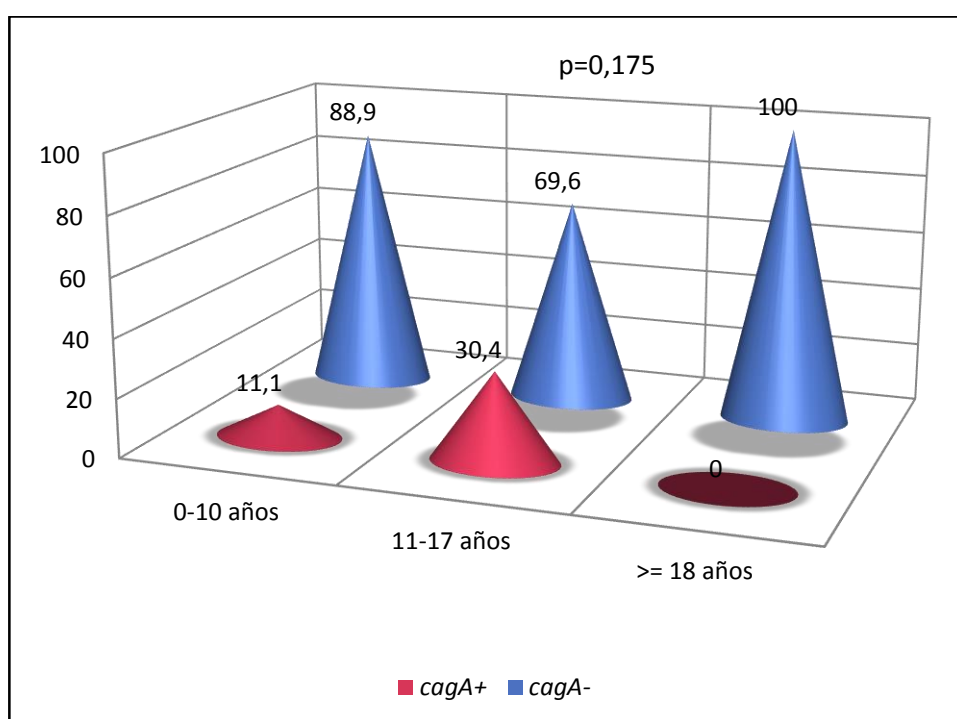


Fig 4.11. Relación entre el gen *cagA* y la edad.

4.3 ESTUDIO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.

4.3.1 Halos de inhibición

Se estudiaron los halos producidos en 21 cepas de *H. pylori*. Para el extracto de semilla de uva (GSE), se observó un halo mínimo de 6 mm y un halo máximo de 18 mm, para el extracto de uva, el halo mínimo fue de 13 mm y el máximo de 33, para la catequina el mínimo fue de 11 y el máximo de 48 para metil galato el mínimo fue de 21

RESULTADOS

y el máximo de 56, para el resveratrol 1, el mínimo fue de 6 y el máximo de 30, y para el resveratrol 2 el mínimo fue de 6 y el máximo fue de 31. Con quercetina y resveratrol puro se estudiaron 20 cepas, siendo el halo mínimo de quercetina de 14 y el máximo de 27 y para el resveratrol puro el mínimo fue de 6 y el máximo de 24 (Fig 4.12) (Fig 4.13).

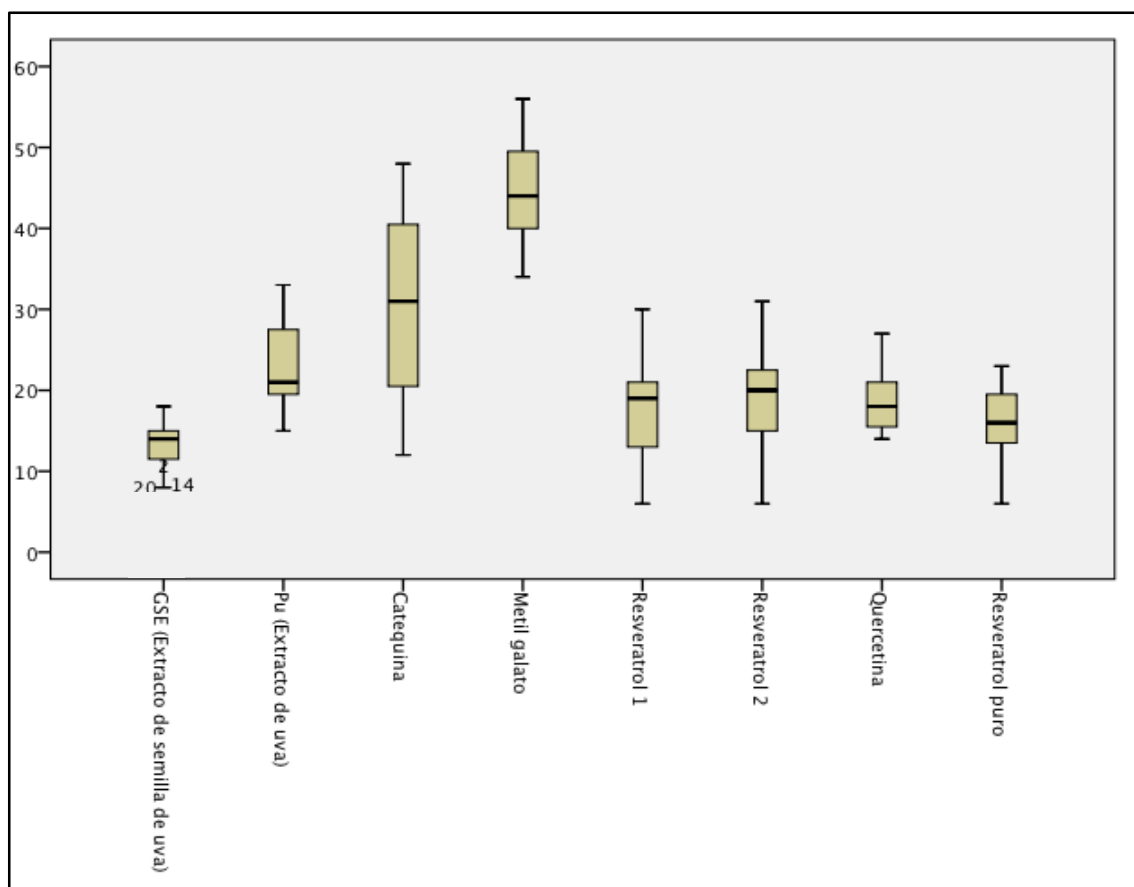


Fig 4.12. Diagrama de caja de los halos producidos por GSE, Pu, C, M, R1, R2, Q y RE.



Fig 4.13. Placa de agar sangre con discos inoculados con compuesto fenólico. Se observa el crecimiento de *H. pylori* y el halo de inhibición.

RESULTADOS

4.3.2 Relación entre los alelos del gen *vacA* y los halos producido por los compuestos fenólicos.

En la tabla 4.4 se muestra los halos medios producidos en mm por los compuestos: GSE, Pu, C, M, R1, R2, Q y RE, en las cepas *vacA s1* y *vacA s2* (Fig 4.14).

COMPUESTO	Cepas <i>vacA s1</i> media(DS)	Cepas <i>vacA s2</i> media(DS)	p	IC (95%)
GSE	10 (5,7)	11,7 (3,9)	0,625	-4,73 a 7,27
Pu	19,5(0,7)	22,2(5,7)	0,039	-6,34 a 10,65
C	20,5(6,4)	26,9(12,7)	0,125	-13,01 a 24,85
M	41,5(3,5)	43,2(7,3)	0,379	-9,99 a 11,84
R1	9,5(4,9)	16,2(7,5)	0,442	-4,41 a 17,95
R2	27,5(16,2)	16,71(7,9)	0,142	-23,54 a 1,85
Q	16(1,4)	17,13(5,5)	0,277	-7,23 a 9,23
RE	23,5(12,0)	13,8(6,5)	0,245	-20,02 a 0,71

Tabla 4.4. Valor medio y desviaciones estándar de los halos de inhibición en cepas según el gen *vacA* en mm.

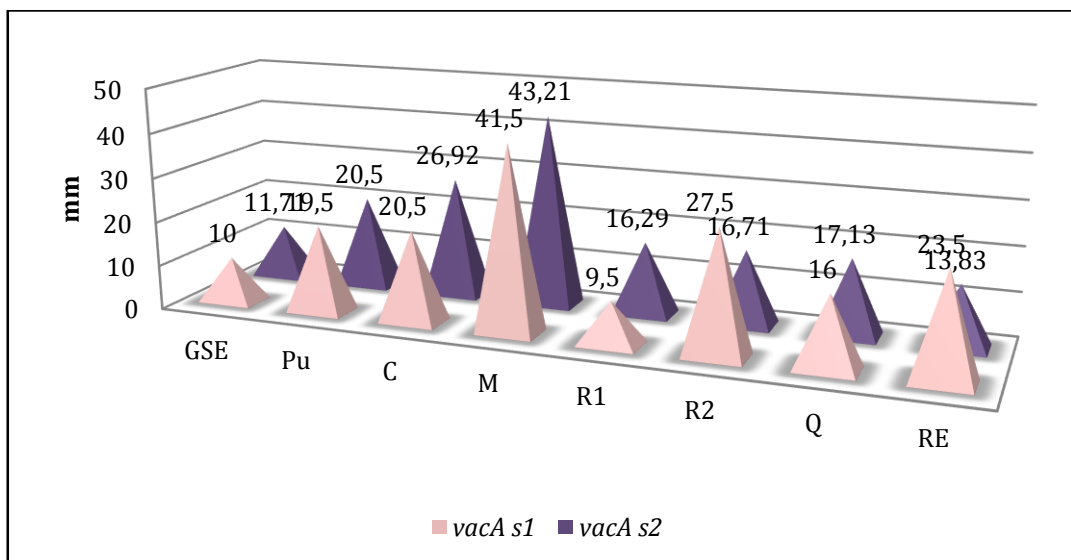


Fig 4.14. Relación entre los alelos del gen *vacA* y los halos producido por GSE, Pu, C, M, R1, R2, Q y RE.

RESULTADOS

4.3.3 Relación entre la presencia del gen *cagA* y los halos producido por los compuestos fenólicos.

En la tabla 4.5 se muestra los halos medios producidos en mm por los compuestos: GSE, Pu, C, M, R1, R2, Q y RE, en las cepas *cagA+* y *cagA-* (Fig 4.15).

COMPUESTO	Cepas <i>cagA</i> - media(DS)	Cepas <i>cagA</i> + media(DS)	p	IC(0,95%)
GSE	11,3(3,9)	10,8(3,9)	0,906	-4,93 a 3,93
Pu	21,7 (5,8)	20,5(4,7)	0,313	-7,43 a 5,09
C	26,9(12,8)	24(11,6)	0,450	-16,34 a 11,68
M	43(7,6)	43,25(3,775)	0,239	-6,99 a 9,07
R1	16,4(7,6)	12,5(6,9)	0,708	-12,16 a 4,49
R2	16,7(8,1)	22(12,2)	0,426	-4,31 a 14,98
Q	17,5(5,7)	14,78(2,0)	0,180	-8,54 a 3,43
RE	14,5(6,4)	14,7 (12,3)	0,117	-7,95 a 8,41

Tabla 4.5. Valor medio de los halos de inhibición en cepas según el gen *cagA*.

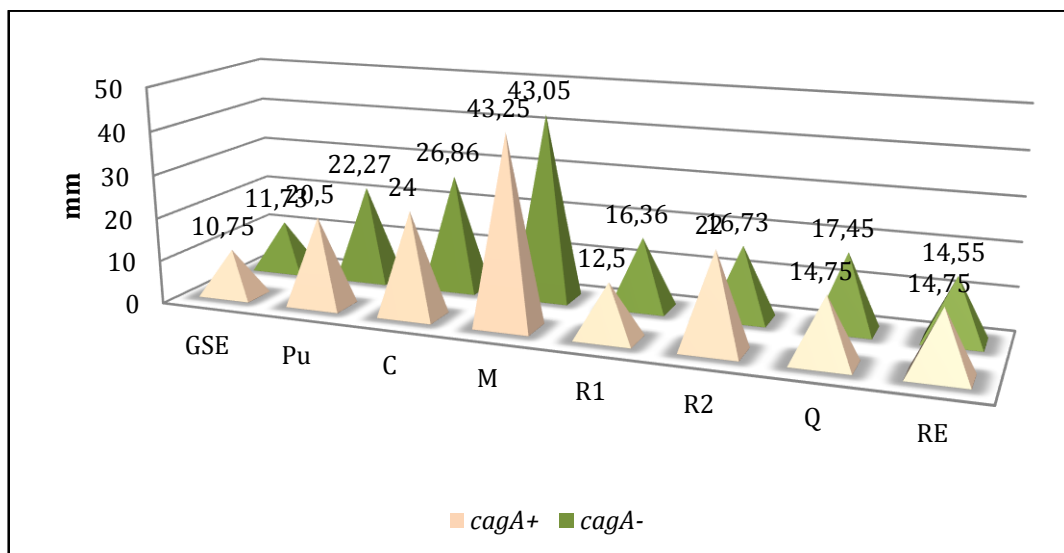


Fig 4.15. Relación entre la presencia del gen *cagA* y los halos producido por GSE, Pu, C, M, R1, R2, Q y RE.

RESULTADOS

4.3.4 Relación entre la resistencia a claritromicina y los halos producidos por los compuestos fenólicos.

En la tabla 4.6 se muestra los halos medios en mm producidos por los compuestos: GSE, Pu, C, M, R1, R2, Q y RE en las cepas sensibles y resistentes a claritromicina (Fig 4.16).

COMPUESTO	Sensible media(DS)	Resistente media(DS)	p	IC(0,95%)
GSE	11,6 (4,3)	12 (3,8)	0,781	-3,28 a 4,10
Pu	21,7(5,0)	23 (6,2)	0,396	-3,87 a 6,47
C	31,1 (13,0)	27,7 (10,5)	0,619	-14,13 a 7,39
M	43,4 (5,4)	40,2 (8,1)	0,513	-13,61 a -0,83
R1	15,8 (7,5)	19,64 (7,3)	0,822	-12,90 a 10,58
R2	18,9 (4,8)	19,36 (7,2)	0,492	-5,22 a 6,15
Q	17,3 (3,1)	20,0 (4,8)	0,126	-1,09 a 6,49
RE	14,75(5,2)	13,2 (3,1)	0,192	-1,23 a 6,82

Tabla 4.6. Valor medio de los halos de inhibición en cepas sensibles y resistentes a claritromicina.

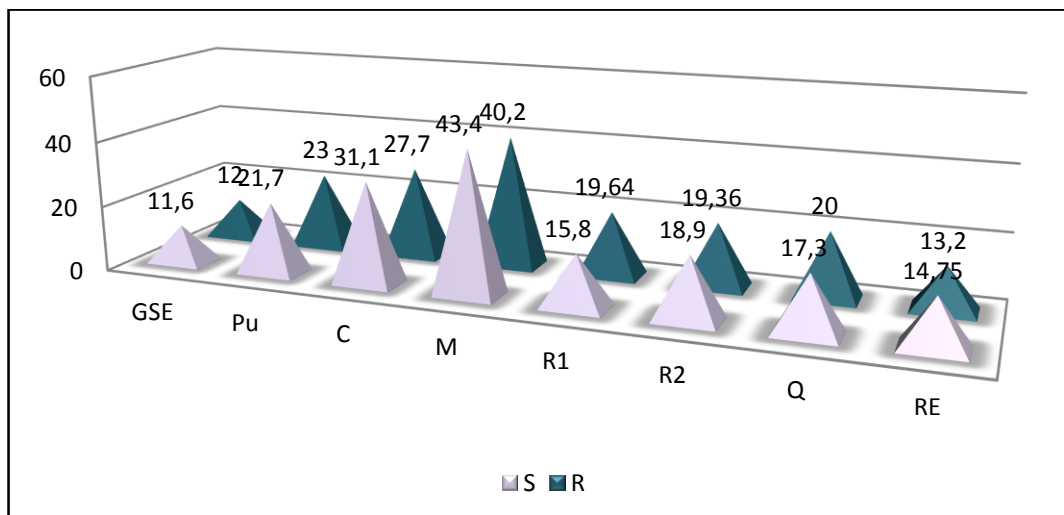


Fig 4.16. Relación entre la resistencia a claritromicina y los halos producidos por GSE, Pu, C, M, R1, R2, Q y RE.

RESULTADOS

4.4 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS COMPUESTOS

FENÓLICOS FRENTE A *H. pylori*.

4.4.1 Curvas de muerte.

Se estudió el efecto de 4 compuestos fenólicos (GSE, SCOM, R1 y R2) sobre 3 cepas de *H. pylori* que poseían diferentes características patogénicas y de sensibilidad antibiótica.

Tras el recuento de colonias después de 3-5 días de incubación, se pudo comprobar que el efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos se ejerce a las 24 horas de estar en unión con *H. pylori* y se obtuvieron los siguientes patrones de acción:

1. Los 4 compuestos fenólicos coincidieron con el mismo patrón de acción sobre la cepa 3177553. Al cabo de 24 horas, los compuestos fenólicos ejercieron su acción y disminuyeron el número de colonias de *H. pylori* hasta niveles por debajo del límite de detección, siendo todos bactericidas a las 24 horas (Fig 4.17).

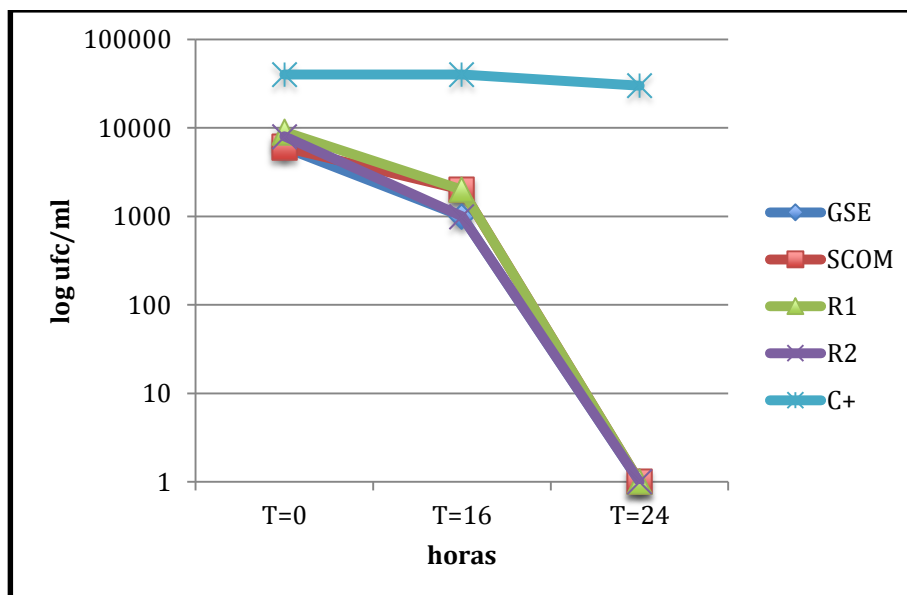


Fig 4.17. Patrón de curva de muerte para la cepa 3177553. Efecto de los compuestos fenólicos: GSE, SCOM, R1 y R2 en los tiempos 0 (t=0), 16 horas (t=16) y 24 horas (t=24).

RESULTADOS

En la tabla 4.7 se muestra el número de colonias y porcentajes de inhibición producidos por los compuestos GSE, SCOM, R1 y R2 para T=0, T=16 y T= 24h.

COMPUESTO		T=0 h	T=16h	T=24h
GSE	Nº colonias	6x10 ³	1 x10 ³	1
	% de inhibición	-	83,4	99,9
SCOM	Nº colonias	6 x10 ³	2 x10 ³	1
	% de inhibición	-	66,6	99,9
R1	Nº colonias	9 x10 ³	2 x10 ³	1
	% de inhibición	-	77,7	99,9
R2	Nº colonias	8 x10 ³	1 x10 ³	1
	% de inhibición	-	87,5	99,9

Tabla 4.7. Número de colonias y porcentaje de inhibición a las 0, 16 y 24 horas.

2. En la cepa 3166912 de *H. pylori*, se observa acción inhibitoria producida por GSE y R2. Sin embargo, el compuesto SCOM y R1 tienen una actividad bactericida a las 24 horas (Fig 4.18).

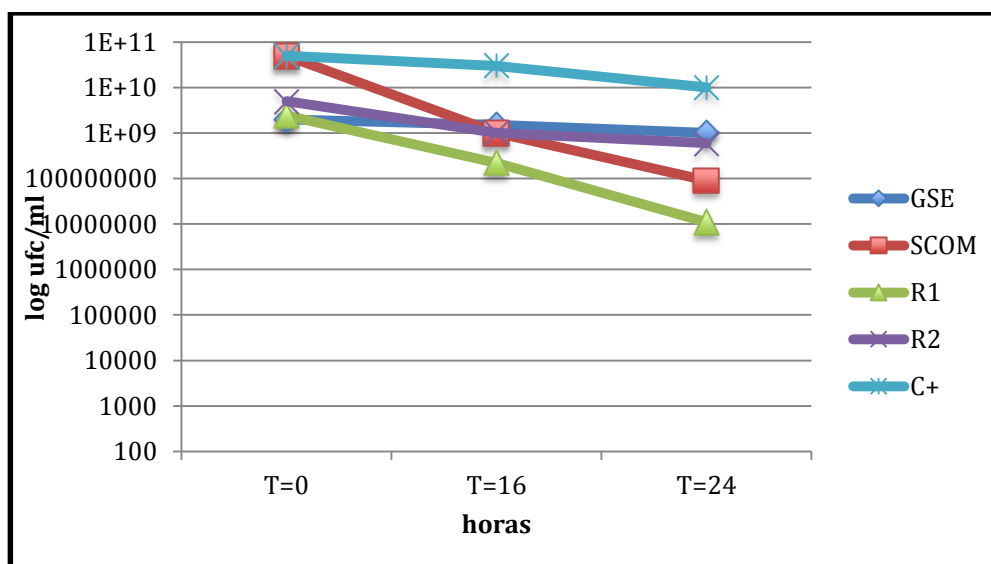


Fig 4.18. Patrón de curva de muerte para la cepa 3166912. Efecto de los compuestos fenólicos: GSE, SCOM, R1 y R2 en los tiempos 0 (t=0), 16 horas (t=16) y 24 horas (t=24).

RESULTADOS

En la tabla 4.8 se muestra el número de colonias y porcentajes de inhibición producidos por los compuestos GSE, SCOM, R1 y R2 para T=0, T=16 y T= 24h.

COMPUESTO		T=0 h	T=16h	T=24h
GSE	Nº colonias	2×10^9	15×10^8	10^9
	% de inhibición	-	25	50
SCOM	Nº colonias	5×10^{10}	10^9	9×10^7
	% de inhibición	-	98	99,8
R1	Nº colonias	24×10^8	22×10^7	11×10^6
	% de inhibición	-	90,8	99,5
R2	Nº colonias	5×10^9	10^9	5×10^8
	% de inhibición	-	80	88

Tabla 4.8. Número de colonias y porcentaje de inhibición a las 0, 16 y 24 horas.

3. Con la cepa secuencia 146128, se observa acción inhibitoria con GSE, R1 y R2, sin embargo se observa acción bactericida con SCOM (Fig 4.19).

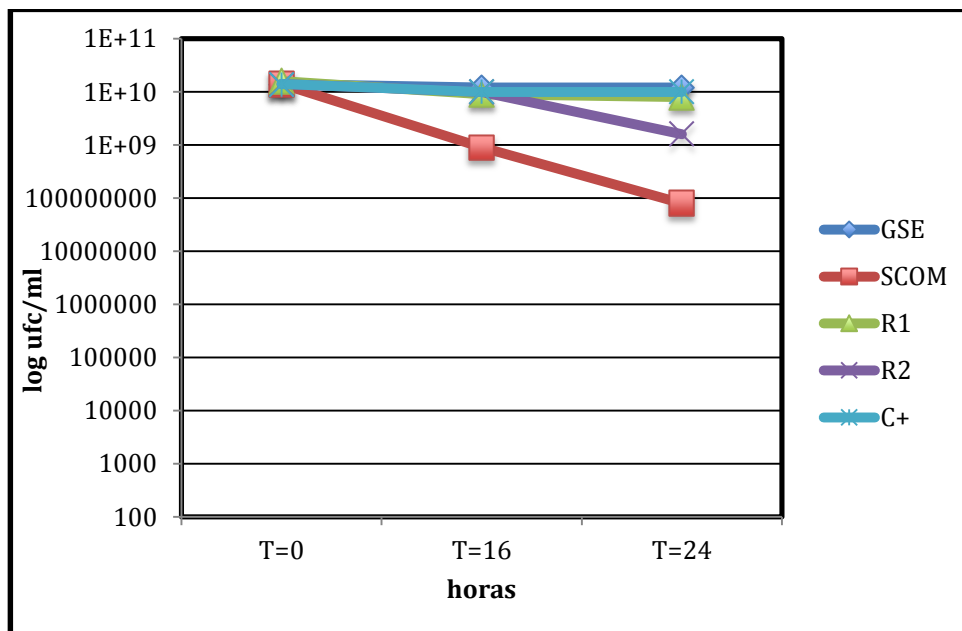


Fig 4.19. Patrón de curva de muerte para la cepa 3166912. Efecto de los compuestos fenólicos: GSE, SCOM, R1 y R2 en los tiempos 0 (t=0), 16 horas (t=16) y 24 horas (t=24).

RESULTADOS

En la tabla 4.9 se muestra el número de colonias y porcentajes de inhibición producidos por los compuestos GSE, SCOM, R1 y R2 para T=0, T=16 y T= 24h.

COMPUESTO		T=0 h	T=16h	T=24h
GSE	Nº colonias	14x10 ⁹	12x10 ⁹	12x10 ⁹
	% de inhibición	-	14,3	14,3
SCOM	Nº colonias	14x10 ⁹	9x10 ⁸	8x10 ⁷
	% de inhibición	-	93,6	99,4
R1	Nº colonias	16x10 ⁹	9x10 ⁹	8x10 ⁸
	% de inhibición	-	43,8	50
R2	Nº colonias	14x10 ⁹	10 ¹⁰	16x10 ⁸
	% de inhibición	-	28,6	88,6

Tabla 4.9. Número de colonias y porcentaje de inhibición a las 0, 16 y 24 horas.

4.4.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI).

a) Cepa 3180768

El compuesto más activo frente a esta cepa fue Pu, que mostró una CMI de 4 (µg/ml), seguido de GSE, RE y SCOM con una CMI de 8 (µg/ml). El compuesto menos activo fue el G, que mostró una CMI de 512 (µg/ml). (Fig 4.19).

b) Cepa 3181005

El compuesto más activo frente a esta cepa fue el Pu con una CMI de 4 (µg/ml), seguido de Re con una CMI de 8 (µg/ml) y de GSE con una CMI de 16 (µg/ml). El compuesto menos activo fue la C y el G con una CMI de 256 (µg/ml). (Fig 4.19).

c) Cepa 3181006

El compuesto más activo frente a esta cepa fue el Pu con una CMI de 4 (µg/ml), seguido de M con una CMI de 16 (µg/ml). El compuesto menos activo fue GSE con

RESULTADOS

una CMI de 256 ($\mu\text{g/ml}$), seguido de R1 con una CMI de 128 ($\mu\text{g/ml}$). (Tabla 4.10) (Fig 4.20).

	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
C. FENÓLICO	3180768	3181005	3181006
GSE	8	16	256
Pu	4	4	4
C	128	256	64
M	64	128	16
G	512	256	64
R1	128	128	128
R2	64	64	64
Q	32	32	64
RE	8	8	32
Tan	64	128	64
SCOM	8	32	32

Tabla 4.10. Concentración mínima inhibitoria de GSE, Pu, C, M, G, R1, R2, Q, Re, Tan y SCOM sobre 3 cepas de *H. pylori*.

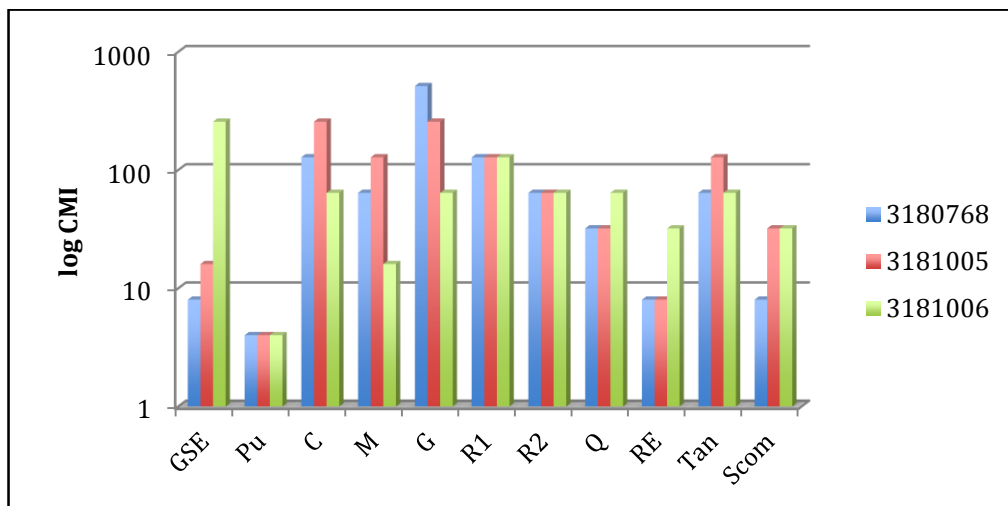


Fig 4.20. Representación gráfica de la concentración mínima inhibitoria de GSE, Pu, C, M, G, R1, R2, Q, Re, Tan y SCOM sobre 3 cepas de *H. pylori*.

RESULTADOS

4.4.4 Estudio del daño de membrana mediante yoduro de propidio.

En la tabla 4.11 se muestra los resultados de fluorescencia probados para las 5 cepas estudiadas. En la cepa 3177553, el R1 mostró una mayor actividad frente al *H. pylori* junto al SCOM. M mostró una menor actividad. En la cepa 3166912 el SCOM y Re mostraron una mayor actividad. El GSE mostró una menor actividad. En la cepa 3167664 el G y el SCOM mostraron una mayor actividad. El GSE mostró una menor actividad. En la cepa 3175144 el Re y C mostraron una mayor actividad. GSE mostró una menor actividad. En la cepa HP 146128, el SCOM y R1 mostraron una mayor actividad. El GSE mostró una menor actividad.

	GSE	SCOM	R1	R2	G	Re	C	M
3177553	1,9x10 ³	16x10 ³	21x10 ³	2,4x10 ³	2,1x10 ³	0,3x10 ³	1,5x10 ³	0,2x10 ³
3166912	0,9x10 ³	13x10 ³	2,5x10 ³	9,9x10 ³	4,6x10 ³	12x10 ³	10x10 ³	4,6x10 ³
3167664	0,6x10 ³	17x10 ³	1,9x10 ³	3,7x10 ³	28x10 ³	138x10 ³	132x10 ³	73x10 ³
3175144	1,8x10 ³	15x10 ³	1,9x10 ³	3,7x10 ³	28x10 ³	138x10 ³	132x10 ³	73x10 ³
146128	0,3x10 ³	20x10 ³	18x10 ³	4x10 ³	0,6x10 ³	15x10 ³	1,8x10 ³	3x10 ³

Tabla 4.11. Fluorescencia resultante de restar la fluorescencia emitida (Femitida) menos la fluorescencia de la cepa sin estar sometido bajo la presencia del compuesto fenólico (Fcontrol) en tres 5 cepas de *H. pylori*.

4.4.5 Estudio sobre el efecto proteínico en *H. pylori* mediante MALDI-TOF.

Todas las cepas de *H. pylori* fueron identificadas mediante MALDI-TOF con un score superior a 2.

El índice de correlación (composite correlation index, CCI), indica la relación entre las cepas. En nuestro estudio lo utilizamos para ver la correlación entre la misma cepa sometida a distinta condición. Un valor bajo indica que hay menos similitud

RESULTADOS

entre las cepas bajo las mismas condiciones, así que el compuesto fenólico produce un mayor efecto sobre las proteínas de *H. pylori*.

Los colores cálidos indican CCI más elevados y los colores fríos indican CCI más bajos.

a) Cepa 3166912

Los valores de CCI correspondientes a la cepa 3166912 cuando se pone en contacto con SCOM, GSE, R1 y R2 son 0,6335; 0,4310; 0,5112; y 0,3823 respectivamente (Fig.4.21).

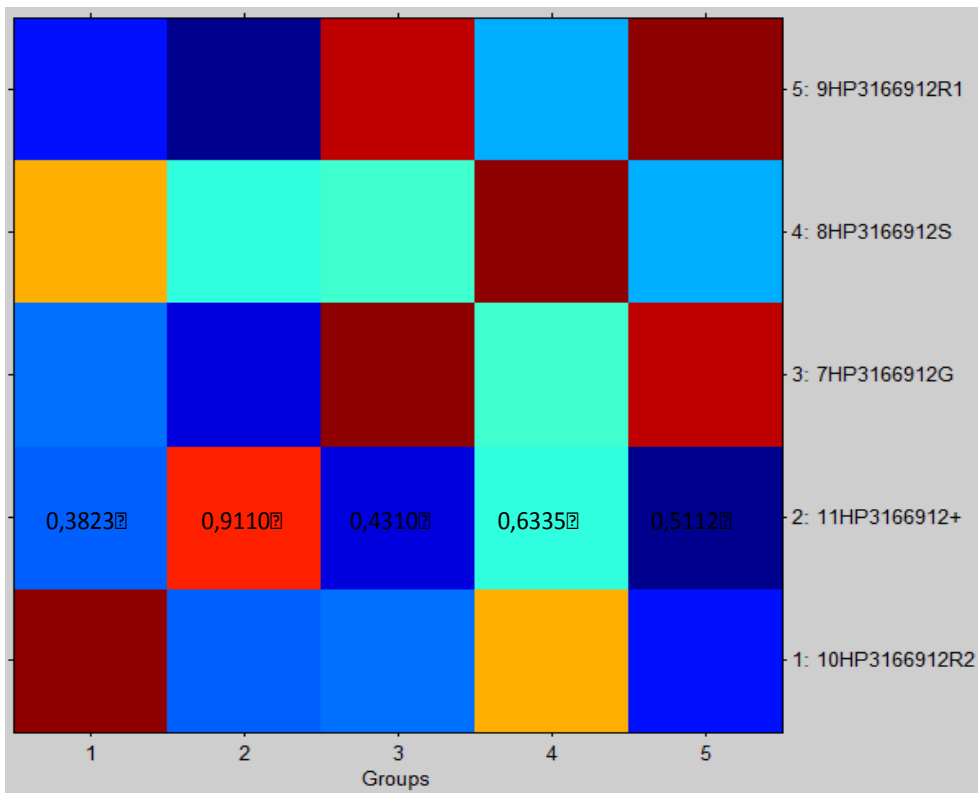


Fig 4.21. CCI de la cepa 3166912 con GSE (3), SCOM (4), R1 (5), R2(1) y sin compuesto fenólico.

RESULTADOS

b) Cepa 3167664

Los valores de CCI correspondientes a la cepa 3167664 cuando se pone en contacto con SCOM, GSE, R1 y R2 son 0,8047; 0,8748; 0,8582; y 0,8070 respectivamente (Fig 4.22).

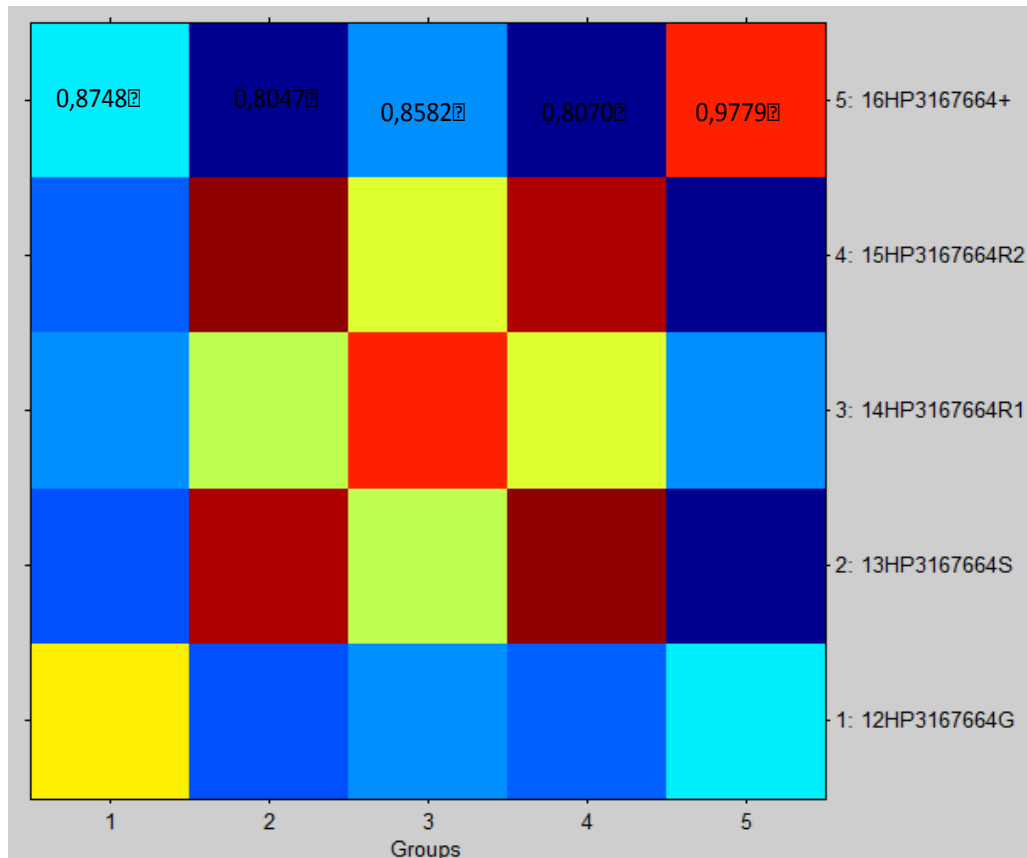


Fig 4.22. CCI de la cepa 3167664 con GSE (1), SCOM (2), R1(3), R2(4) y sin compuesto fenólico.

RESULTADOS

c) Cepa 3175144

Los valores de CCI correspondientes a la cepa 3175144 cuando se pone en contacto con SCOM, GSE, R1 y R2 son 0,5573; 0,5641; 0,6148; y 0,6515 respectivamente (Fig 4.23).

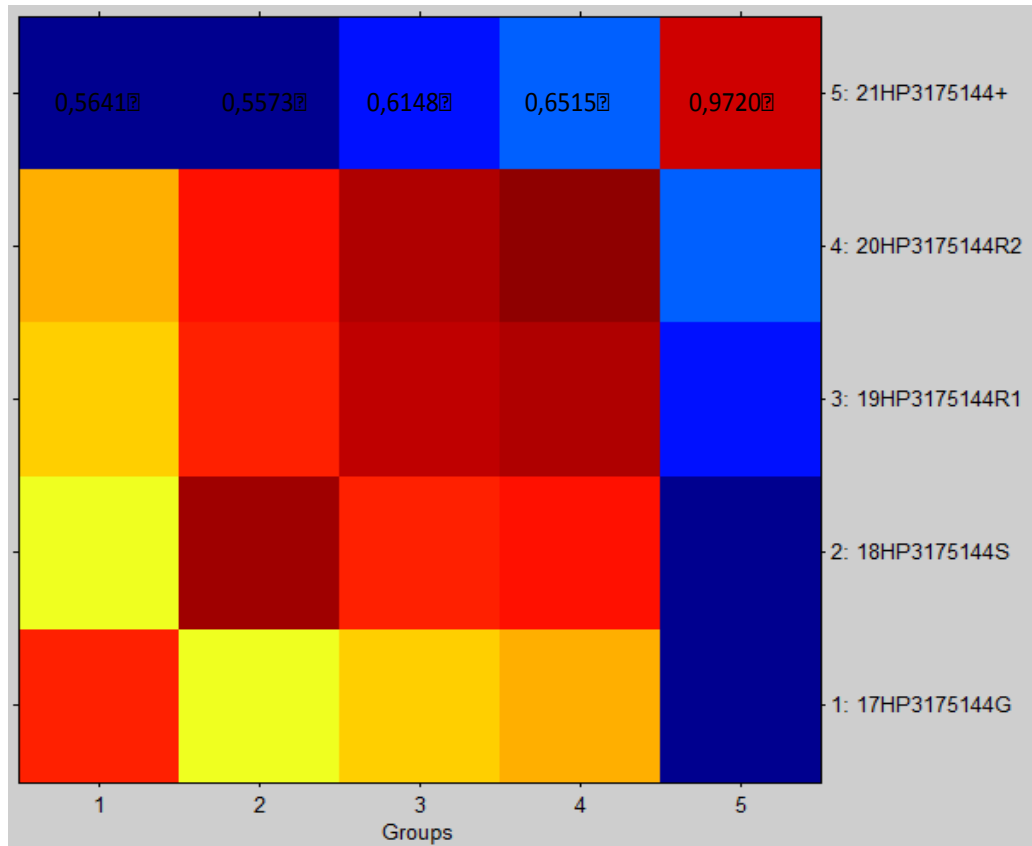


Fig 4.23. CCI de la cepa 3175144 con GSE (1), SCOM (2), R1(3), R2(4) y sin compuesto fenólico

DISCUSIÓN

5.1 ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO DE *H. pylori*.

5.1.1 Sensibilidad a amoxicilina.

Amoxicilina es un antibiótico β -lactámico incluido en la mayoría de los regímenes terapéuticos para erradicar *H. pylori* (Malfertheriner, 2012). El mecanismo de resistencia es debido a que interfiere en la síntesis de peptidoglucano por alteración en las PBP's (Megraud, 2007). En casi todos los estudios, los porcentajes de resistencia son bastante bajos, y estos datos parecen ser que son homogéneos en la mayoría de los estudios. No se han detectado resistencias en Croacia, Francia, Alemania, Holanda, Portugal o Suecia (Bago, 2002; Megraud, 2003; Wolle, 2002; Debets-Ossenkopp, 1999; Cabrita, 2000; Megraud, 1999). En Italia, se han descrito resistencias del 0% y 0,2% (Toracchio, 2003), y en el Reino Unido oscila entre el 0% y 0,4% (Parsons, 2001). En América y Oceanía, también se han publicado resistencias insignificantes. Sin embargo, la tendencia contraria se ha descrito en Irán y Japón, con una resistencia del 28,6% (Milani, 2012) y 8,2%-15,2 % (Horiki, 2009), respectivamente. Sorprendentemente, hay un porcentaje de resistencia extremadamente alto (85,6%) en Cameroon (De francesco, 2010).

En un estudio realizado en Cantabria, describen un porcentaje de resistencia en 2010 del 1,4% (Cuadrado-Lavín, 2012). Sin embargo, en nuestro estudio hemos observado un mayor porcentaje de resistencia (13,3%), siendo en el año 2010 del 20,2%.

En una publicación anterior de nuestro grupo (Díaz-Regañón, 2006), los porcentajes de resistencia eran mucho más bajos. Sin embargo, este aumento puede deberse a la utilización de los nuevos puntos de corte de EUCAST, pues al utilizar un punto de corte más bajo, los porcentajes de resistencia han aumentado.

DISCUSIÓN

5.1.2 Sensibilidad a claritromicina

La resistencia global a claritromicina en nuestro estudio fue del 52,8%, siendo en cepas de niños de 0 a 10 años del 55,3%, de adolescentes entre 11 y 17 años del 47% y de adultos del 65,8%. En el año 2010 obtuvimos una resistencia del 53,9%, en 2011 del 58%, en 2012 del 50,6% y en 2013 del 47,9%.

Los macrólidos se han considerado antibióticos con una buena sensibilidad *in vitro* frente a *H. pylori*.

El mecanismo de resistencia a claritromicina mejor conocido es la mutación en la secuencia de la región peptidiltransferasa 23S del ARN ribosómico: las tres mutaciones más frecuentes son A2143G, A2142G y A2142C, siendo responsable del 90% de casos de resistencia primaria en cepas de *H. pylori* en países del occidente. En particular, la mutación A2143G confiere mayor nivel de resistencia que las otras dos (De Francesco, 2006).

En países del este de Asia, han publicado altos porcentajes de resistencia a claritromicina. El porcentaje más alto se ha encontrado en Japón (86,4%) en un estudio de la eficacia de este antibiótico en un régimen de tercera línea (Murakami, 2013). Hay que destacar, que en el mismo país, se detectó un bajo porcentaje (15,2%) en un estudio de terapia de primera línea realizado unos años antes (Horiki, 2009).

Con los datos obtenidos de diferentes artículos, DEAs y Tesis Doctorales realizados en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de La Princesa, hemos podido recoger datos de resistencia a claritromicina desde el año 1991 y hasta mediados del año 2005, y hemos comprobado la tendencia al aumento de forma importante. Partimos de sólo un 4,8% de resistencia en el año 1994 y, sin embargo, en el año 2005 esta tasa se situó en el 37%. En nuestro estudio podemos constatar cifras aún más altas que las descritas anteriormente, ya que en el año 2010 hubo un 53,9% de

DISCUSIÓN

resistencias, en el 2011 hubo un 58%, en el 2012 un 50,6% y en el 2013 un 47,9%. Las diferencias observadas entre lo publicado previamente y lo obtenido en la actualidad puede deberse al hecho de que nosotros hemos incluido principalmente cepas procedentes de hospitales de Madrid, mientras que en los demás estudios se incluyeron cepas procedentes de otras provincias de España (Asturias, Almería, etc). El hecho de que en Madrid la resistencia sea más alta coincide con los datos obtenidos en dos Tesis Doctorales en donde la resistencia a claritromicina era mucho mayor en la ciudad de Madrid en comparación con el norte, sur o este de España (De la Obra, 2002; Domingo, 1997).

Los datos obtenidos desde 1991 nos indican un aumento muy importante de la resistencia a claritromicina tanto en cepas de niños como de adultos, ya que partimos de un 0% de resistencia en adultos en el año 1991 y de un 2,3% en niños en el año 1992, y llegamos a cifras del 30% en adultos y del 64% en niños en el año 2004. En nuestro estudio comprobamos que la resistencia a claritromicina en niños sigue siendo alta con un 55,3% de resistencias en niños de 0 a 10 años y un 47% de resistencias en niños entre 11 y 17 años. Sin embargo, en adultos observamos un aumento más acusado con un 65,8% de resistencias. En los datos obtenidos en una Tesis Doctoral, obtuvieron una resistencia a claritromicina en niños del 100% en el 2005 y en adultos del 40,9% (Díaz-Regañón, 2006). Se puede observar que ocurre lo contrario que en nuestro estudio, es posible que algunos de los niños estudiados en el 2005, estén incluidos en el grupo de adultos en 2010 y por eso se observe un menor porcentaje en niños y un mayor porcentaje en adultos desde el 2010 al 2013.

Es posible que la resistencia vaya disminuyendo debido a la menor utilización del antibiótico por la tasa de resistencia tan elevada.

DISCUSIÓN

Diferentes estudios reflejan tasas de resistencias a claritromicina en niños del 84,9% en China (Liu, 2011), seguido de un 50,9% en Vietnam (Rafeey, 2007). Las resistencias más bajas se observan en Bulgaria con un 13,9% (Boyanova, 2006). Nuestro estudio refleja que nos encontramos ante un país con una de las resistencias más altas en niños.

En un estudio europeo, donde estudiaron la resistencia de *H. pylori* en el año 2008-2009 (Megraud, 2012), han observado un aumento en la resistencia a claritromicina desde el 1998, hasta la fecha del estudio. Obtuvieron una tasa de resistencia a claritromicina en cepas de adultos del 17,5% y de niños del 31,8%. Los países con mayor tasas de resistencia fueron Austria, Hungría y Portugal, con un porcentaje del 36,6; 33,3 y 31,5%. Según el consenso de Maastricht (Wu, 2014), recomiendan no usar claritromicina en el tratamiento empírico, cuando la prevalencia de la resistencia es mayor al 20%. La alternativa a claritromicina, sería el uso de levofloxacino en tratamiento empírico, aunque el éxito de este tratamiento depende del nivel de resistencia a levofloxacino (Megraud, 2012).

5.1.3 Sensibilidad a rifampicina

La rifampicina está normalmente indicada en el tratamiento de las infecciones por *Mycobacterium*, incluyendo la tuberculosis y la lepra; juega un papel en el tratamiento de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA) en combinación con el ácido fucsídico. Se puede usar en la profilaxis para la prevención de meningitis de *Neisseria meningitidis*.

Se puede usar también en el tratamiento de infección por *Listeria*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* y *Legionella pneumophila*. Las indicaciones no estandarizadas deberían ser respaldadas por un antibiograma con sensibilidad

DISCUSIÓN

demostrada. Dado el rápido desarrollo de resistencias, la rifampicina no debería ser usada en monoterapia.

En el tratamiento de *H. pylori* se usa rifabutina, pero no existe E-test para probar este tratamiento *in vitro*, por lo que se prueba otro antibiótico de la misma clase, como la rifampicina.

En nuestro estudio hemos observado un porcentaje de resistencias del 31%. Al hacer un estudio en cuanto a la edad, se observa que en niños entre 0-10 años la resistencia es del 33,3%, entre 11 y 17 años del 20,3% y en mayores de 18 años del 47,2%. Este ligero aumento del porcentaje en adultos, puede deberse a que las cepas hayan desarrollado resistencia, debido al uso de rifampicina por diferentes infecciones.

En un estudio realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de La Princesa en 2009, no obtuvieron ninguna cepa resistente a rifampicina (Agudo, 2009). El aumento de resistencia en la actualidad se puede deber a una disminución en el punto de corte, antiguamente el punto de corte que se usaba era CMI >32 resistente y < 32 sensible, a partir del 2011 comenzó a emplearse los puntos de corte del EUCAST donde >1 es resistente y < 1 sensible.

En un estudio realizado en Alemania mostró una resistencia para rifampicina del 1,4%. La resistencia está asociada con mutaciones producidas en el gen *rpoB* (Glocker, 2007).

5.1.4 Sensibilidad a levofloxacino

Levofloxacino es una quinolona de amplio espectro que es activo tanto para bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Actúa inhibiendo la DNA girasa, (o topoisomerasa tipo II) y la topoisomera IV (Drlica, 1997). La resistencia de *H. pylori* a

DISCUSIÓN

fluorquinolonas es debida a una mutación puntual determinante de la región *gyrA* (Moore, 1995).

Levofloxacino ha sido propuesto como tratamiento de segunda línea cuando falla la clásica terapia de primera línea (Malfertheriner, 2012). Sin embargo, en los últimos años, se ha producido un aumento en la resistencia, debido principalmente a mutaciones puntuales en *gyrA*. En diferentes bacilos Gram negativos se ha descrito un plásmido que se transfieren horizontalmente codificando resistencia a quinolonas (Robicsek, 2006), así que tratamientos con levofloxacino pueden no ser efectivos en el futuro.

En países asiáticos la resistencia a levofloxacino en *H. pylori* se encuentra en el 10% (Ierardi, 2013). En Europa, en un estudio epidemiológico multicéntrico, muestra una resistencia del 14,1% (Megraud, 2013), con valores que varían desde el 11,7% en Irlanda (O'Connor, 2013) al 29,1% en Alemania (Wueppenshorst, 2013).

En un estudio realizado en Cantabria en 2010, publicaron una resistencia a levofloxacino del 14,3% (Cuadrado-Lavín, 2012). Sin embargo, en nuestro estudio hemos obtenido una resistencia global a levofloxacino mucho menor que en el norte de España (6,5%). Esta baja resistencia se debe fundamentalmente a la baja resistencia en niños, ya que entre 0 y 10 años la resistencia fue del 2,7%, entre 11 y 17 años fue del 4,9%. En adultos la resistencia a levofloxacino aumenta notablemente, siendo del 26,1%, muy superior a los datos mostrados en estudios europeos.

5.1.5 Sensibilidad a tetraciclina

En nuestro estudio obtuvimos una resistencia a tetraciclina del 0,7% (un niño, un adulto, y otra de edad desconocida) en el periodo comprendido entre el 1 de enero del 2010 al 31 de diciembre del 2013.

DISCUSIÓN

La resistencia a este antibiótico es un hecho excepcional (Peitz, 1999), aunque ya hay estudios que describen tasas del 3,3% (Boyanova, 2006), del 9% (Godoy, 2003) y de hasta el 12,3% (Kim, 2004). La primera cepa resistente se describió en Australia en 1996 (Midolo, 1996) y más tarde aparecieron en Japón y Korea en el año 2000, para posteriormente llegar a Europa y aparecer en Bélgica e Italia (Kwon, 2000).

El mecanismo de resistencia es debido a mutaciones de los genes *rrnA* y *rrnB* en la subunidad 16S del rRNA, las cuales dan lugar a sustituciones de nucleótidos en las posiciones 926-928 (Glocker, 2005) ó 965-967 (Nonaka, 2005). Estas sustituciones se asocian a un descenso en la unión ribosomal que conlleva al aumento en la CMI a tetraciclina (Wu, 2005).

En otros estudios realizados en Madrid la sensibilidad fue del 100% (Toro, 2001), lo que confirma la utilidad de este antibiótico en la terapéutica anti-*H. pylori* como fármaco de primera elección.

Se ha descrito un 85% de erradicación al combinar tetraciclina, metronidazol, un inhibidor de la bomba de protones y un compuesto de bismuto durante 10-14 días (Bytzer, 2005) demostrando que tetraciclina es una buena opción terapéutica como antibiótico de primera línea.

5.1.6 Sensibilidad a metronidazol.

La resistencia global a metronidazol en nuestro estudio fue del 34,5%, siendo en cepas de niños entre 0 y 11 años del 40%, de adolescentes entre 11 y 17 años del 29,1% y de adultos del 60,5%. En el año 2010 obtuvimos un 38,3% de resistencia, en 2011 un 33%, en 2012 un 31,6% y en 2013 un 33,6%.

Históricamente metronidazol es el antibiótico con mayor tasa de resistencia de los utilizados para el tratamiento de *H. pylori* variando desde el 27% al 90% según la

DISCUSIÓN

población estudiada (López-Brea, 1999). Concretamente la resistencia primaria se sitúa entre el 30-40% y la secundaria entre el 70-100% (Glupczynski, 1998). Su uso como terapia frente a otras infecciones en la población general puede influir en el incremento en la resistencia.

Actualmente se acepta que la resistencia se produce por la inactivación del gen *rdxA* debido a una mutación sin sentido que da lugar a una proteína truncada, aunque también se ha descrito mutaciones en los genes *frxA* y *frxB*, mutaciones de cambios de fase, deleciones, inserciones, etc (Megraud, 2012).

En nuestro estudio la resistencia global a este antibiótico, desde el año 2010 hasta el año 2013, ambos inclusive, fue del 34,5%. Diferentes estudios europeos nos informan de porcentajes similares al nuestro (Ierardi, 2013). Sin embargo en los últimos diez años la situación está cambiando sorprendentemente, con un descenso de la resistencia en países del norte: 22,5% en Noruega (Larsen, 2013), 1,1% en Lituania (Karczewska, 2012) y 13% en el Reino Unido (Larsen, 2013). En el sur y centro de Europa, los porcentajes de resistencia son algo más altos: 34,9% en Francia (Megraud, 2013), 37,2% en Alemania (Selgrad, 2013) y 23,3% en Bulgaria (Boyanova, 2006).

Con los datos obtenidos de diferentes artículos, DEAs y Tesis Doctorales realizados en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de La Princesa, hemos podido recoger datos de resistencia a metronidazol desde el año 1991 y hasta mediados del año 2005. En estos trabajos se estudiaron cepas procedentes de diferentes hospitales de Madrid y de otras provincias de España, tanto de niños como de adultos, por lo que los datos pueden reflejar la resistencia existente en el país.

La resistencia global a metronidazol fue aumentando de forma progresiva hasta situarse en el 39% en el año 2005 (Díaz-Regañón, 2006). En 1994 la tasa fue del 20,3% y se mantuvo alrededor de esa cifra hasta el año 2003 en que aumentó de forma

DISCUSIÓN

importante hasta el 36% para, posteriormente aumentar de forma lenta hasta el 39% en el año 2005. En nuestro estudio podemos ver como las tasas de resistencia son ligeramente menores a las obtenidas anteriormente, habiendo un 38,3% de resistencia en 2010, un 33% en 2011, un 31,6% en 2012 y un 33,6% en 2013. Si estudiamos estos porcentajes en función de la edad en niños (0-17 años) la resistencia fue en 2010 del 34,8%, en 2011 del 33%, en 2012 del 36,8% y en 2013 del 39,2%, y en adultos la resistencia en 2010 fue del 85,7%, en 2011 del 50%, en 2012 del 60% y en 2013 del 60%. Podemos observar como en niños, el porcentaje de resistencia ha aumentado en estos 4 años de estudio, sin embargo en adultos ha disminuido ligeramente.

5.2. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE LOS GENES *vacA* y *cagA*.

5.2.1 Presencia de los alelos *s1* y *s2* del gen *vacA*.

La proteína VacA, que *in vitro* induce la vacuolización de las células epiteliales, está codificada por el gen *vacA*, que tiene varios tipos alélicos (Atherton, 1995). Las diferencias genómicas en *vacA* están localizadas en la secuencia de la región señal (s) o de la región media (m) y nosotros hemos estudiado las variaciones en la región señal *s1* o *s2*.

Los estudios publicados muestran grandes discordancias ya que, mientras unos hablan de un 100% de presencia del alelo *s1*, otros presentan porcentajes del 63% y del 65% (Domingo, 1999a; Domingo, 1999b), esto se puede deber a la relación de este alelo con la patología digestiva. El porcentaje es mayor en pacientes con úlcera. En otro estudio realizado en Madrid mostraron la presencia global del alelo *s1* del 32,2% (Agudo, 2010). En nuestro estudio la presencia global del alelo *s1* fue del 18,9%, porcentaje más bajo que el descrito anteriormente. Sin embargo no se ha evaluado la

DISCUSIÓN

patología presente en los pacientes aunque la mayoría son niños que suelen tener patología más leve.

En concreto, en niños con edades comprendidas entre 0 y 10 años hubo un 18,5% de cepas *vacA s1*. Estos datos no concuerdan con estudios publicados en donde las cepas infantiles son las que más se relacionan con el alelo *s1* del gen *vacA* (Jaber, 2005). En un estudio realizado en Turquía, la prevalencia del alelo *s1* fue del 91,8% (Ozbey, 2013).

5.2.2 Presencia del gen *cagA*.

La gran mayoría de los estudios realizados sobre la virulencia de *H. pylori* se han centrado en la isla de patogenicidad en la que el gen *cagA* codifica la proteína CagA, un marcador de virulencia. La mayoría de estudios describían porcentajes superiores al 85% de cepas *cagA+* de *H. pylori* (Domingo, 1999a; Domingo, 1999b), pero en los últimos años se han publicado porcentajes más bajos como en el estudio realizado en Madrid (Agudo, 2010). Sin embargo, en Turquía la prevalencia es del 61,2%, un porcentaje más elevado que en España (Ozbey, 2013).

En nuestro estudio el porcentaje global de cepas *cagA+* fue del 18,9%, porcentaje bastante inferior al descrito en otros trabajos, pero comprensible debido a la inclusión de cepas infantiles, las cuales tienen porcentajes de positividad del gen *cagA* menores (Alarcón, 2000)

5.2.3 Relación entre la presencia del gen *vacA* y el gen *cagA*.

Dentro de las cepas con presencia del gen *cagA* el 60% de ellas presentaron el alelo *s1* y el 40% el alelo *s2*. Estos datos coinciden con lo descrito en otros estudios en donde el porcentaje de cepas *vacA s1 cagA+* es superior al de las cepas *vacA s2 cagA+*

DISCUSIÓN

(Brito, 2003). En el estudio realizado en Madrid el porcentaje de cepas *vacA s1 cagA+* fue del 79,6% y del *vacA s2 cagA+* fue del 13,6% (Agudo, 2010).

5.2.4 Relación entre la presencia del gen *vacA* y *cagA* y la edad.

Se estudió la relación de la presencia del gen *vacA* y *cagA* por grupos de edad. En este trabajo, obtuvimos en niños con edades comprendidas entre 0 y 10 años, un porcentaje de *vacA s1* del 18,5%, del *vacA s2* del 81,5% y del *cagA+* del 11,1%. Sin embargo, en un estudio realizado en Turquía en niños con edades comprendidas entre 4 y 18 años, tuvieron un porcentaje de *vacA s1* del 91,8% , del *vacA s2* del 8,2% y del *cagA+* del 61,2% (Ozbey, 2013). Nuestros valores fueron diferentes al de ellos, probablemente porque nuestro grupo de edad estudiado contenía a niños con más corta edad (entre 0 y 10 años y no entre 4 y 18 años) y también por las diferencias que puede haber entre pacientes de diferentes países. En el grupo de niños con edades comprendidas entre 11 y 17 años, los porcentajes de *vacA s1* y *cagA+* aumenta ligeramente (21,7% de *vacA s1*, 78,3% de *vacA s2* y 30,4% de *cagA+*).

5.3 ESTUDIO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.

5.3.1 Estudio de los halos de inhibición de los compuestos fenólicos.

En este trabajo se han probado diferentes compuestos fenólicos que se encuentran en el vino. Tanto compuestos puros como son la catequina, el metil galato, el gálico, la quercetina, el resveratrol puro y los taninos, como distintos extractos, que contienen algunos de los compuestos puros, y otras sustancias, como son dos extractos

DISCUSIÓN

diferentes de semilla de uva (GSE), y (SCOM), un extracto de uva, el resveratrol 1 y el resveratrol 2.

En nuestro estudio, observamos una mayor actividad en un compuesto puro, el metil galato, con un halo de inhibición mínimo de 21 mm y un halo máximo de 56 mm, con una media de 43,62 mm (SD=7,75). El siguiente compuesto más activo fue el extracto de uva con un halo mínimo de 13 mm y un halo máximo de 33 mm con una media de 22,38 mm (SD=5,55). El extracto de uva contiene quercetina (7mg/L), ácido gálico (37 mg/L) y catequina (680 mg/L). Sin embargo el compuesto que menos actividad mostró fue el extracto de semilla GSE que contiene ácido gálico (18,8 mg/L) y catequina (182,7 mg/L). Vemos como en el extracto de semilla GSE la concentración de los distintos compuestos puros es menor que en el extracto de uva, por lo que parece razonable que la actividad sea menor.

Se ha descrito la inhibición del crecimiento de *Campylobacter jejuni* debido a la catequina, los ácidos fenólicos y los flavonoles (Ganan, 2009), y se ha visto que las catequinas tiene un efecto en la inhibición del crecimiento de diferentes bacterias gram-negativas como *V. cholera* y *Shigella spp* (Cowan, 1999). Los mecanismos de acción propuestos para la catequina se atribuyen a daños en la membrana citoplasmática, aunque también están involucrados otros mecanismos (Cushnie, 2011). Además, la inhibición del crecimiento de bacterias gram-negativas por distintos ácidos fenólicos ha sido publicado para microorganismos que se transmiten por los alimentos como el *Escherichia coli* (Cueva, 2010). El mecanismo de acción descrito para los ácidos fenólicos es que producen daño de membrana, haciéndola más permeable. También se ha descrito que puede afectar a la bomba sodio-potasio ATPasa involucrada en la síntesis de ATP (Vattem, 2005). Por otro lado, los flavonoles, especialmente quercetin-3 glucosido, se ha encontrado una actividad antibactericida frente a algunas bacterias

DISCUSIÓN

gram-negativas (familia *Enterobacteriaceae*), como *E. coli*, *Salmonella spp* and *Shigella spp* (Yao, 2011) .

5.3.2 Relación entre los factores de virulencia y los halos producidos por los compuestos fenólicos.

En nuestro estudio vemos que para los distintos compuestos fenólicos los halos de inhibición son mayores cuando la cepa es *vacA s2*, excepto para el resveratrol 2 y el resveratrol puro. El resveratrol 2 está compuesto de catequina, gálico y resveratrol entre otros, sin embargo el resveratrol 1 está compuesto de gálico, resveratrol y malvidina.

En cuanto a la presencia del gen *cagA*, en nuestro estudio vemos que todos los compuestos tienen un mayor halo de inhibición cuando la cepa de *H. pylori* es *cagA-*, salvo resveratrol 2, resveratrol puro y metil galato. Es posible que el conjunto de los tres compuestos puros gálico, catequina y resveratrol que se encuentran en el resveratrol 2, tengan un efecto sinérgico en cepas *cagA+*.

En un estudio realizado por Martini et al. en 2009, mostraron la actividad antibacteriana de extractos de uva frente a dos cepas de *H. pylori*, una *cagA-* y otra *cagA+*. En este estudio probaron tres compuestos fenólicos: extracto de uva Colorino, de uva Sangiovese y de uva Cabernet. El extracto Colorino fue el único que mostró una mayor actividad antibacteriana frente a la cepa *cagA+* (Martini, 2009). Ellos concluyen que la administración de extractos de uva procedentes del vino, además del uso de antibióticos, podría utilizarse en la infección del *H. pylori*.

DISCUSIÓN

5.3.3 Relación entre la resistencia a claritromicina y los halos producidos por los compuestos fenólicos.

Al estudiar los halos medios producidos por los compuestos fenólicos en cepas de *H. pylori* resistentes y sensibles a claritromicina, no observamos diferencias estadísticamente significativas. Posiblemente sea debido a que el punto de acción de los compuestos fenólicos y la claritromicina sean distintos. La claritromicina actúa en la síntesis de proteínas sobre el ARN ribosomal y el mecanismo de resistencia se produce por mutaciones en la secuencia de la región peptidiltransferasa 23S del ARN ribosómico. El mecanismo de acción de los compuestos fenólicos no se conoce bien pero podrían actuar sobre la permeabilidad de la pared celular.

5.4 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

FRENTE A *H. pylori*.

5.4.1 Curvas de muerte.

Tras el estudio del efecto de los 4 compuestos fenólicos (GSE, SCOM, R1 y R2) sobre 3 cepas de *H. pylori*, observamos que en una de las cepas (3177553), los 4 compuestos tienen actividad, llegando a ser bactericida a las 24 horas de incubación. En otra de las cepas (3166912) se observó una acción inhibitoria al poner en contacto la cepa con SCOM, R2 y R1, llegando a ser bactericida a las 24 horas de incubación. En otra cepa (3166912) el SCOM y R2 mostraron actividad bactericida a las 24 horas. Por lo tanto, R2 y el extracto de semilla de uva (SCOM), mostraron actividad bactericida en las tres cepas estudiadas. Tanto R2 como SCOM contienen ácido gálico (12 y 29,1 mg/L, respectivamente) y catequina (204,09 y 274,1 mg/L, respectivamente), además el R2 contiene resveratrol puro. El extracto de semilla de uva GSE contiene también ácido

DISCUSIÓN

gálico (18,8 mg/L) y catequina (182,7 mg/L), pero la concentración de catequina es mucho menor.

5.4.2 Concentración mínima inhibitoria

Al estudiar la CMI que producen los distintos compuestos fenólicos: extracto de semilla de uva (GSE), extracto de uva, catequina, metil galato, ácido gálico, resveratrol 1, resveratrol 2, quercetina, resveratrol puro y taninos en las 3 cepas de *H. pylori*, observamos que en todas ellas, la CMI más baja se encuentra con el extracto de uva (4 µg/ml en las 3 cepas). Por otra parte, dos cepas tienen una CMI alta para el ácido gálico (512 y 256 µg/ml).

El extracto de uva contiene quercetina, ácido gálico y catequina, entre otros compuestos. Es posible que la combinación de estos tres compuestos fenólicos, ejerza un efecto sinérgico, haciendo que la CMI disminuya.

En un trabajo realizado por Brown en 2013, observaron que quercetina y resveratrol tienen una fuerte actividad *in vitro* anti-*H. pylori*, realizando CMI (Brown, 2013). En nuestro estudio RE y Q, también tienen CMI bajas con una media de 8 y 32 µg/ml para RE y Q, respectivamente.

En un trabajo realizado por Silván, mostraron que el extracto de semilla de uva (GSE) tiene una actividad antibacteriana frente a *Campylobacter spp*, mostrando una CMI menor de 20 µg/ml (Silván, 2013). En su estudio, concluyeron que los ácidos fenólicos y las catequinas eran los principales responsables del efecto inhibitorio del GSE.

En nuestro trabajo, estudiamos una cepa *cagA+* y dos *cagA-*, y observamos una CMI mayor en la cepa *cagA+* para los compuestos GSE, Q y RE, sin embargo para el resto de los compuestos (Pu, C, M, G, R1, R2 y Tan) las CMI fueron iguales o menores

DISCUSIÓN

que en las cepas *cagA*⁻. En un trabajo realizado por Martini, et al en 2011, estudiaron la acción del resveratrol en 26 cepas clínicas de las cuales 9 eran *cagA*⁺ de pacientes con carcinoma gástrico, 8 *cagA*⁻ y 9 *cagA*⁺ de pacientes con gastritis (Martini, 2011). Ellos mostraron que la concentración mínima bactericida era menor en las cepas *cagA*⁺ de pacientes con carcinoma gástrico y concluyeron que estos pacientes tienen reducida la expresión F-ATPasa, cuya función es la de proteger a la bacteria de los bajos niveles de pH, manteniendo el gradiente de protones en la membrana.

5.4.3 Estudio del daño de membrana mediante yoduro de propidio.

En el estudio del daño de membrana, observamos que en las 4 cepas estudiadas, el extracto de semilla de uva (GSE) produjo un mayor efecto que el resto de los compuestos. Sin embargo, el otro extracto de semilla de uva (SCOM) produjo menor efecto en tres de las cuatro cepas estudiadas.

Ambos extractos contienen los mismos compuestos fenólicos puros: ácido gálico y catequina. Pero se diferencian en la concentración. Las concentraciones en el extracto de semilla SCOM son 29,1mg/L y 274,1 mg/L respectivamente. Y en el extracto de semilla GSE las concentraciones son 18,8 mg/L y 182,7 mg/L. Vemos que la combinación de ácido gálico y catequina tiene actividad en la membrana de *H. pylori*, pero cuando se encuentran a una mayor concentración.

5.4.4 Estudio sobre el efecto proteínico en *H. pylori* mediante MALDI-TOF.

El MALDI-TOF en los laboratorios de diagnóstico microbiológico clínico, ha permitido identificar un gran número de microorganismos diferentes, desde bacterias hasta hongos, en cuestión de 15 minutos. Actualmente se están empezando a desarrollar estudios de sensibilidad y estudios de tipificación (Murray, 2010).

DISCUSIÓN

En este trabajo hemos empleado los índices de correlación CCI, para poder ver la relación entre los distintos espectros obtenidos cuando el *H. pylori* se ponía en contacto con los distintos compuestos fenólicos.

Al estudiar la magnitud en que afecta a las proteínas los distintos compuestos fenólicos: extracto de semilla de uva (SCOM), extracto de semilla de uva (GSE), Resveratrol 1 y Resveratrol 2; observamos que el extracto de semilla de uva (SCOM), produce un mayor efecto. Como en el caso del estudio del daño de membrana, es posible que la combinación de ácido gálico y catequina a altas concentraciones, tenga una mayor actividad sobre las proteínas.

Hay pocos trabajos que estudian el perfil de las proteínas de *H. pylori*, uno de ellos es de Ilina et al., donde estudian 17 muestras clínicas y observan entre 7 a 13 picos principales por muestra y solo 6 señales de proteínas fueron idénticas en más de la mitad de las cepas. Cuatro de los picos se asignaron a proteínas ribosomales RL32, RL33, RL34 y RL36. El pico con una relación m/z de 6948 fue identificado como un polipeptido transportador de metales ricos en histidina (Ilina, 2010)

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En nuestro trabajo se observó un alto porcentaje de resistencia a claritromicina (52.8%) y metronidazol (34.5%) en los aislamientos clínicos de *H. pylori* estudiados en un periodo de 4 años. Se observó una disminución gradual del porcentaje de resistencia a amoxicilina del 2010 al 2013 (20,2% a 10,3%).

2. Se observó un porcentaje de resistencia mayor en las cepas de *H. pylori* aisladas en adultos con respecto a las de niños para todos los antibióticos estudiados, probablemente debido a que han estado sometidos a una mayor presión antibiótica. También se observó un aumento del porcentaje de resistencia a rifampicina en las cepas de adultos desde el 2010 al 2013 (16,7% a 71,4%).

3. Se encontró un alto porcentaje de cepas *vacA s2* (81,1%) y alto porcentaje *cagA-* (81,1%) en las cepas de *H. pylori* estudiadas, existiendo una correlación entre ambas ($p < 0,001$).

4. Al estudiar la actividad de los compuestos fenólicos extraídos del vino mediante difusión con disco, se observó que metil galato y catequina, son los compuestos que presentaron mayores halos de inhibición frente a los aislados clínicos de *H. pylori* estudiados.

5. Todos los compuestos fenólicos excepto Resveratrol 2 y Resveratrol puro produjeron halos de inhibición mayores en las cepas de *H. pylori* sin factores de virulencia (*vacA s2* y *cagA-*). No hubo diferencias significativas al estudiar el efecto de los compuestos extraídos del vino en cepas de *H. pylori* con diferente patrón de resistencia a claritromicina.

CONCLUSIONES

6. El compuesto que presentó una concentración mínima inhibitoria más baja, estudiada mediante microdilución en caldo, fue el extracto de uva (4 µg/ml). Mediante curvas de muerte, observamos que tanto el extracto de semilla de uva (SCOM) como el Resveratrol 2, mostraron actividad bactericida frente a las cepas de *H. pylori* estudiadas.

7. El compuesto que produjo mayor daño en la membrana bacteriana, estudiando la fluorescencia emitida mediante yoduro de propidio, fue el extracto de semilla de uva (SCOM).

8. El compuesto que produjo un mayor efecto en el patrón de las proteínas ribosomales de *H. pylori*, estudiado con el empleo del espectrómetro de masas MALDI-TOF, fue el extracto de semilla de uva (SCOM).

9. Con los distintos resultados obtenidos en este estudio se observa que la combinación de metil galato con catequina, ambos presentes a altas concentraciones en el extracto de semilla de uva (SCOM) y en un vaso de vino tinto, presentan un potente efecto inhibitorio frente a las cepas de *H. pylori*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. **Agudo, S., Alarcón, T., Cibrelus, L., Urruzuno, P., Martínez, M., & López-Brea, M.** (2009). High percentage of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* clinical isolates obtained from Spanish children. *Rev Esp Quimioter*, 22, 88-92.
2. **Agudo, S., Pérez-Pérez, G., Alarcón, T., & López-Brea, M.** (2010). High prevalence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains and risk factors associated with resistance in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol*, 48, 3703-3707.
3. **Alarcón, T., Baquero, M., Domingo, D., López-Brea, M., & Royo, G.** (2004). *Diagnostico microbiologico de la infección por Helicobacter pylori*. Obtenido de Procedimiento en Microbiología Clínica: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap17.htm>
4. **Alarcón, T., Domingo, D., & López-Brea, M.** (2007). Resistencia a antimicrobianos. En M. López-Brea, *La infección por Helicobacter pylori en el niño*. Madrid: Ergon.
5. **Alarcón, T., Domingo, D., Prieto, N., & López-Brea, M.** (2000). Polymerase chain reaction using 3´mismatched primers to detect mutation to clarithromycin in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 38, 923-25.
6. **Alarcón, T., Martínez, M., Madruga, D., Domingo, D., & López-Brea, M.** (2000). One week vs two weeks triple therapy in paediatric patienes: Impact of treatment duration and metronidazole resistance. *Rev Esp Quimioterapia*, 12, 55.
7. **Alarcón, T., Martínez, M., Urruzuno, P., Cilleruelo, M., Madruga, D., Sebastián, M., y otros.** (2000). Prevalence of CagA and VacA antibodies in children with *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer compared to prevalence in paediatric patients with active or non-active chronic gastritis. *Clin Diag Lab Immunol*, 7, 842-844.

BIBLIOGRAFÍA

8. Alfonso, V., González-Granda, D., Alonso, C., Ponce, J., Bixquert, M., Oltra, C., y otros. (1995). ¿Los pacientes con úlcera duodenal transmiten el *Helicobacter pylori* a sus familiares? *Rev Esp Enferm Dig*, 87, 109-113.
9. Ando, T., Goto, Y., Maeda, O., Watanabe, O., Ishiguro, K., & Goto, H. (2006). Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 12, 181-186.
10. Andrews, J., Marsden, B., Brown, D., Wong, V., Wood, E., & Kelsey, M. (2001). Comparison of three stool antigen tests for *Helicobacter pylori* detection. *J Clin Pathol*, 56, 769-771.
11. Appelmek, B., & Vandenbroucke-Grauls, C. (2000). *H. pylori* and Lewis antigens. *Gut*, 47, 10-11.
12. Appelmek, B., Simoons-Smit, I., Negrini, R., Moran, A., Aspinall, G., Forte, J., y otros. (1996). Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun*, 35, 2489-97.
13. Aspinall, G., & Monterio, M. (1996). Lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains P466 and MO19: structures of the O antigen chain and core oligosaccharide regions. *Biochemistry*, 35, 2489-2497.
14. Atherton, J., Cao, P., Peek, R., Tummuru, M., Blaser, M., & Cover, T. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*, 270, 17771-7.
15. Aznar, E. (2013). Estudio de fagos de *Helicobacter pylori* por métodos fenotípicos y genotípico. Tesis Doctoral, Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología.

BIBLIOGRAFÍA

16. **Azuma, T., Konishi, J., Tanaka, Y., Hirai, M., Ito, S., Kato, T., y otros.** (1994). Contribution of HLA-DQA gene to host's response againsts *Helicobacter pylori*. *Lancet*, 343, 542-543.
17. **Bago, J., Halle, Z., Strinic, D., Kueisec, N., Jandric, D., Bevanda, M., y otros.** (2002). The impact of primary antibiotic resistance on the efficacy of ranitidine bismuth citrate- vs omeprazole-based one week triple therapies in *H. pylori* eradication- a randomized controlled trial. *Wien Klin Wochenschr*, 114, 448-453.
18. **Banatvala, N., Mayo, K., Megraud, F., Jennings, R., Deeks, J., & Feldman, R.** (1993). The cohort effect and *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis*, 168, 219-221.
19. **Bateson, M.** (1993). Cigarette smoking and *Helicobacter pylori* infection. *Posgrad Med*, 69, 41-44.
20. **Bauerfeind, P., Garner, R., Dunn, B., & Mobley, H.** (1997). Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut*, 59, 2470-75.
21. **Bertelli, AA., Baccalini, R.** (2001). Resveratrol inhibits TNF alpha-induced endothelial cell activation. *Therapic*, 56(3), 613-616.
22. **Beswick, E., Suarez, G., & Reyes, V.** (2006). *H. pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 12, 5599-5605.
23. **Bihn, TT., Shiota, S., Suzuki, R., Matsuda, M., Huyen Trang, TT., Kwon, DH., Iwatani, S., y Yamaoka.** (2014) Discovery of novel mutations for clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* by using next-generation sequencing. *J Antimicrobi Chemother*, 69, 1796-1803.
24. **Blaser, MJ., y Atherton, JC.** (2004) *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(3), 321-333.

BIBLIOGRAFÍA

25. **Boixeda, D., Gisbert, J., Cantón, R., Alvarez Baleriola, I., Bermejo, F., Aller de la Fuente, R., y otros.** (1996). *H. pylori*, úlcera gástrica y antiinflamatorios no esteroideos. *Med Clin Bac* , 106, 209-212.
26. **Boquet, P., Ricci, V., Galmiche, A., & Gauthier, N.** (2003). Gastric cell apoptosis and *Helicobacter pylori*: has the main function of VacA finally been identified? *Trends Microbiol*, 11, 410-413.
27. **Bourke, B., Ceponis, P., Chiba, N., Czinn, S., Ferraro, R., Fischbach, L., y otros.** (2005). Canadian Helicobacter Study Group Consensus Conference: Update on the approach to *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents- an evidence-based evaluation. *Can J Gastroenterol*, 19, 399-408.
28. **Boyanova , L., Nikolov, R., Lazarova, E., Gergova, G., Katsarov, N., Kamburov, V., y otros.** (2006). Antibacterial resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from Bulgarian children and adult patients over 9 years. *J Med Microbiol*, 55, 65-68.
29. **Boyanova, L.** (2009). Prevalence of multidrug-resistant *Helicobacter pylori* in bulgaria. *J Med Microbiol*, 58, 930-935.
30. **Brito, C., Silva, L., Juga, N., Leal, N., de Souza, W., Queroz, K., y otros.** (2003). Prevalence of *cagA* and *vacA* genes in isolates from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98, 817-21.
31. **Brown, JC., y Jiang, X.** (2013) Activities of muscadine grape skin and polyphenolic constituents against *Helicobacter pylori*. *J Appl Microbiol*, 114, 982-981.
32. **Bytzer, P., & O'Morain, C.** (2005). Treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 10, 40-46.

BIBLIOGRAFÍA

- 33. Cabrita , J., Oleastro, M., Matos , R., Manhente, A., Cabral, J., Barros, R., y otros.** (2000). Features and trends in *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Lisbon area, Portugal (1990-1999). *J Antimicrobial Chemother*, 46, 1029-1031.
- 34. Cadranel, S., Bontemps, P., Van Biervliet, S., Alliet, P., Lauvau, D., Vandehoven, G., y otros.** (2007). Improvement of the eradication ratio of *Helicobacter pylori* gastritis in children is by adjunction of omeprazole to a dual antibiotherapy. *Acta Paediatr* , 96, 82-86.
- 35. Caputo, R., Tuccillo, C., Manzo, B., Zarrilli, R., Tortora, G., Blanco , C., y otros.** (2003). *Helicobacter pylori* VacA toxin up-regulates vascular endothelial growth factor expression in MKN 28 gastric cells through an epidermal growth factor receptor-, cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Clin Cancer Res*, 9, 2015-21.
- 36. Carballo, F., Martínez, C., Aldaguer, M., García, A., Dominguez , E., & Malfertheiner, P.** (1995). Infección por *Helicobacter pylori* en Guadalajara. Prevalencia y factores asociados. *Rev Esp Enferm Dig*, 87, 7.
- 37. Chilsholm, SAS., Owen, RJ.** (2004). Frameshift mutations in *frxA* occur frequently and do not provide a reliable marker for metronidazole resistance in UK isolates of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*, 53, 135-140.
- 38. Choe, Y., Kwon, Y., Jung, M., Kang, S., Hwang, T., & Hong, Y.** (2001). *Helicobacter pylori* associated iron-deficiency anemia in adolescent female athletes. *J Pediatr*, 139, 100-4.
- 39. Chong, J., Marshall, B., Barkin, J., McCallum, R., Reiner, D., Hoffman, S., y otros.** (1994). Occupational exposure to *Helicobacter pylori* for the endoscopy professional: A seral epidemiological study. *Am J Gastroenterol*, 89, 1987-1992.

BIBLIOGRAFÍA

40. **CLSI.** (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Tenth informational supplement (aerobic dilution). NCCLS document m100-S10 (M7). NCCLS; Wayne, Pa.
41. **Collins, J., Ali-Ibrahim, A., & Smoot, D.** (2006). Antibiotic Therapy for *Helicobacter pylori*. *Med Clin N A* , 90, 1125-1140.
42. **Corder, R., Douthwaite, JA., & Lees DM.** (2001). Endothelin-1 synthesis reduced by red wine, *Nat.* 414, 863-864
43. **Correa, P.** (1999). Anatomía patológica de la infección por *Helicobacter pylori*. En M. López-Brea, *Helicobacter pylori: retos para el siglo XXI. Microbiología, clínica y tratamiento.* (págs. 213-218). Barcelona: Prous Science.
44. **Correa, P., Piauelo, M., & Camargo, M.** (2006). Etiopathogenesis of gastric cancer. *Scand J Surg*, 95, 218-224.
45. **Covacci, A., Teldord, J., Del , G., Parsonnet, J., & Rappuoli, R.** (1999). *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, 284, 1328-1333.
46. **Cover, T., & Blanke, S.** (2005). *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol*, 3, 320-332.
47. **Cover, T., Hanson , P., & Heuser , J.** (1997). Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J cell Biol*, 138, 759-69.
48. **Cowan, M.** (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 12, 564-582.
49. **Cuadrado-Lavín, A., Salcine-Caviedes, J., Carrascosa, M., Mellado, P., Monteagudo, I., Llorca, J., y otros.** (2012). Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* to six antibiotics currently used in Spain. *J Antimicrobial Chemother*, 67, 170-173.

BIBLIOGRAFÍA

- 50. Cueva, C., Moreno-Arribas, M., Martín-Alvarez, P., Bills, G., Vicente, M., Basilio, A., y otros.** (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, *161*, 372-382.
- 51. Cushnie, T., & Lamb, A.** (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 99-107.
- 52. Czinn, S., Carr, H., & Aronoff, S.** (1986). Susceptibility of *C. pyloridis* to three macrolide antibiotic (erythromycin, roxithromycin [RU 28965] and CP 62,993) and rifampicin. *Antimicrob Agents Chemothe*, *30*, 328-329.
- 53. De francesco, V., Giorgio, F., Hassan, C., Manes, G., Vannella, L., Panella, C., y otros.** (2010). Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. *J Gastrointestin Liver Dis*, *19*, 409-414.
- 54. De Francesco, V., Margiotta, M., Zullo, A., Hassan, C., Troiani, L., Burattini, O., y otros.** (2006). Clarithromycin-resistance genotypes and eradication of *Helicobacter pylori*. *Ann Intern Med*, *144*, 94-100.
- 55. De Francesco, V., Zullo, A., Hassan, C., Giorgio, F., Rosania, R. Y Ierardi, E.** (2011) Mechanism of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. *World J Gastroenterol Pathophysiol*, *2*(3),35-41.
- 56. De la Obra, P.** (2002). Estudio de los mecanismos de resistencia a metronidazol en la infección por *Helicobacter pylori*. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid: Facultad de Farmacia.
- 57. Debets-Ossenkopp, Y., Herscheid, A., Pot, R., Kuipers, E., Kusters, J., & Vandenbroucke-Grauls, C.** (1999). Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to

BIBLIOGRAFÍA

metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and trovafloxacin in The Netherlands. *J Antimicrobi Chemother*, 43, 511-515.

58. DeCross, A., Marshall, B., McCallum, R., Hoffman, S., Barrett, L., & Guerrant, R. (1993). Metronidazole susceptibility testing for *H pylori*: Comparison of disk, broth and agar dilution methods and their clinical relevance. *J Clin Microbiol*, 31, 1971-1974.

59 Díaz, MS., Pérez, O. (2001) En la búsqueda de los compuestos fenólicos responsables de la capacidad antioxidante del vino. Proyecto vino, ciencia y salud, 5, 1-3.

60 Díaz-Regañón, J. (2006). Estudio de la actividad in vitro de probióticos, microorganismos no probióticos y antimicrobianos en *Helicobacter pylori*. Tesis doctoral, Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Microbiología. Departamento de Microbiología.

61. Díaz-Regañón, J., Alarcón, T., Domingo, D., y López-Brea, M. (2006). Sensibilidad de 36 aislamientos de *Helicobacter pylori* a cuatro antibióticos de primera línea y características de virulencia. *Rev Esp Quimioterap*, 19 (1), 34-38.

62. Doll, R., Peto, R. (1995). Mortality and alcohol consumption. *Br Med J*, 310, 470.

63. Domingo, D., Alarcón, T., & López-Brea, M. (1999b). Virulence factors of Spanish *Helicobacter pylori* isolates and correlation with gastritis or ulcer production. *J Clin Microbiol*, 5, 668-71.

64. Domingo, D., Alarcón, T., Prieto, N., & López-Brea, M. (1999a). Relación entre sensibilidad antibiótica y factores de virulencia en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*. *Rev Esp Quimioterap*, 12, 340-5.

BIBLIOGRAFÍA

- 65. Domingo, D.** (1997). Estudio mediante técnicas de biología molecular de aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* de diferentes regiones de España. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid: Facultad de Farmacia.
- 66. Drlica, K., & Zhao, X.** (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*, *61*, 377-392.
- 67. Durant, J., Corrier, D., & Ricke, S.** (2000). Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of *hilA* and *invF* genes of *Salmonella typhimurium*. *J Food Proo*, *63*, 573-578.
- 68. Dzieranowska-Fangrat, K., Lehours, P., Mégraud, F., & Dzieranowska, D.** (2006). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, *9*, 7-14.
- 69. Eaton, K., Brooks, C., Morgan D, & Krakowka, S.** (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*, *59*, 2470-75.
- 70. Eaton, K., Logan, S., Baker, P., Peterson, R., Monteiro, M., & Altman, E.** (2004). *Helicobacter pylori* with a truncated lipopolysaccharide O chain fails to induce gastritis in SCID mice infected with splenocytes from wild-type C57BL/6J mice. *Infect Immun*, *72*, 3925-3931.
- 71. Edwards, D.** (1993). Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. I. Mechanism of action. *J Antimicrob Chemother*, *31*, 9-20.
- 72. Eidt, S., Stolte, M., & Fisher, R.** (1994). *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol*, *47*, 436-9.
- 73. Ernst, P., & Gold, B.** (2000). The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol*, *54*, 615-640.

BIBLIOGRAFÍA

- 74. EUCAST: European committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. <http://www.eucast.org>.
- 75. Fowler, M., Thomas, R., Atherton, J., Roberts, I., & High, N.** (2006). Galectina-3 binds to *Helicobacter pylori* O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to *Helicobacter pylori* adhesion. *Cell Microbiol*, 8, 44-54.
- 76. Francini, M., & Veneri, D.** (2003). *Helicobacter pylori* and immune thrombocytopenic purpura. *Hematologica*, 88, 1087-91.
- 77. Frankel, EN., Waterhouse, AL., Teissedre, PL.** (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem*, 43, 890-894.
- 78. Ganan, M., Martínez-Rodríguez, A., & Carrascosa, A.** (2009). Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, 20, 739-742.
- 79. García Campos, J.** (2007). Factores de virulencia de *Helicobacter pylori*. ¿Que podemos aprender de los niños? En M. López-Brea, *La infección por Helicobacter pylori en el niño* (págs. 35-48). Madrid: Ergon.
- 80. García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Cueva, C., Martín-Álvarez, PJ., & Moreno-Arribas, MV.** (2009). Inactivation of oenological lactic acid bacteria (*Lactobacillus hilgardii* and *Pediococcus pentosaceus*) by wine phenolic compounds. *J Appl Microbiol*, 107, 1042-1053.
- 81. Gaziano, JM., Hennekens, CH., Godfried, SL., Sesso, HD., Glynn, RJ., Breslow, JL., Buring, JE.**(1999). Type of alcoholic beverage and risk of myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 1; 83(1),52-7.

BIBLIOGRAFÍA

- 82. Gerrits, M., van Vliet, A., Kuipers, E., & Kusters, J.** (2006). *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance. molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis*, 6, 699-709.
- 83. Ghasemi-Debria, A., Ghaemi, E., Azadfar, S., y Roshandel, G.** (2013). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection among Iranian children. *Arab Journal of Gastroenterology*, 14, 169-172.
- 84. Gisbert, JP.** (2013) Enfermedades relacionadas con la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Hepatol*, 36(2), 39-50.
- 85. Glocker, E., Berning, M., Gerrits, M., Kusters, J., & Kist, M.** (2005). Real-time PCR screening for 16S rRNA mutations associated with resistance to tetracycline in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 3166-3170.
- 86. Glocker, E., Bogdan, C., & Kist, M.** (2007). Characterization of rifampicin-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates from Germany. *J Antimicrob Chemother*, 59, 874-879.
- 87. Glupczynski, Y.** (1998). Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*: a global overview. *Acta Gastroenterol Belg*, 62, 357-366.
- 88. Glupczynski, Y.** (1999). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. En M. López-Brea, *Helicobacter pylori: retos para el siglo XXI. Microrbiología, clínica y tratamiento* (págs. 41-54). Barcelona: Prous Science.
- 89. Godoy, A., Ribeiro, M., Benvengo, Y., Vitiello, L., Miranda, M., Mendonca, S., y otros.** (2003). Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterol*, 3, 20.
- 90. Gold, B., Colletti, R., Abbott, M., Czinn, S., Elitsur, Y., Hassall, E., y otros.** (2000). *Helicobacter pylori* infection in children: recommendations for diagnosis and treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 31, 490-497.

BIBLIOGRAFÍA

- 91. Goodwin, C., Armstrong, J., Chilvers, J., Peters, M., Collins, M., Sly, L., y otros.** (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* combo nov. and *Helicobacter mustelae* combo nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol*, 30: 397-405.
- 92. Graham, D., Adam, E., Reddy, G., Agarwal, J., Agarwal, R., Evans, D., y otros.** (1991). Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. Comparison of developing and developed countries. *Dig Dis Sci*, 26, 1084-1088.
- 93. Graham, D., Malaty, H., Evans, D., Evans, D., Klein, P., & Adam, E.** (1991). Epidemiology of *Helicobacter pylori* in a asymptomatic population in the United States. Effect of age, race and socioeconomic status. *Gastroenterology*, 100, 1495-1501.
- 94. Höcker, M., & Hohenberger P.** (2003). *Helicobacter pylori* virulence factors-one part of a big pictures. *Lancet*, 362, 1231-33.
- 95. Hacıhanefloglu, A., Edebali, F., Celebi, A., Karakaya, T., Senturk, O., & Hulagu, S.** (2004). Improvement of complete blood count in patients with iron deficiency anemia and *Helicobacter pylori* infection after the eradication of *Helicobacter pylori*. *Hepatogastroenterology*, 51, 313-315.
- 96. Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marrre, R., y otros.** (1990). Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb Pathog*, 8, 214-225.
- 97. Haeckel, R.** (1996). *Helicobacter pylori* infection. Epidemiology, pathobiochemistry, diagnosis and therapy. *Lab Med*, 20, 78-84.
- 98. Haggerty, T., Perry, S., Sanchez, L., Pérez-Péres, G., & Parsonnet, J.** (2005). Significance of transiently positive enzyme-linked immunosorbent assay results in

BIBLIOGRAFÍA

detection of *Helicobacter pylori* in stool samples from children. *J Clin Microbiol*, 43, 2220-2223.

99. Hall, P., Jass, J., Levison, D., Morson, B., Shepherd, N., Sobin, L., y otros. (1988). Classification of primary gut lymphomas. *Lancet*, 2, 958.

100. Hidalgo, J. Tratado de Enología. (2003). *Ediciones Mundi Prensa. Madrid, Barcelona, México.*

101. Holcombe, C., Omotara, B., Eldridge, J., & Jones, D. (1992). *Helicobacter pylori*, the most common bacterial infection in Africa: A random serological study. *Am J Gastroenterol*, 87, 28-30.

102. Horiki, N., Omata, F., Uemura, M., Suzuki, S., Ishii, N., Iizuka, Y., y otros. (2009). Annual change of primary resistance to clarithromycin among *Helicobacter pylori* isolates from 1996 through 2008 in Japan. *Helicobacter*, 14, 86-90.

103. Hua, J., Yeoh, K., Ng, H., Zheng, P., Lim, S., & Ho, B. (1998). Improving the success of culturing *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *Microbios*, 96, 95-101.

104. Ierardi, E., Giorgio, F., Losurdo, G., Di Leo, A., & Principi, M. (2013). How antibiotic resistances could change *Helicobacter pylori* treatment: A matter of geography? *World J Gastroenterol*, 19, 8168-8180.

105. Ilina, E., Borovskaya, A., Serebryakova, M., Chelysheva, V., Momynaliev, K., Maier, T., y otros. (2010). Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the study of *Helicobacter pylori*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 24, 328-34.

106. Ito, M., Tanaka, S., Kim, S., Tahara, K., Kawamura, Y., Sumii, M., y otros. (2005). A combination of the *Helicobacter pylori* stool antigen test and urea breath test is useful for clinical evaluation of eradication therapy: a multicenter study. *J Gastroenterol Hepatol*, 20, 1241-1245.

BIBLIOGRAFÍA

- 107. Jaber, S.** (2005). The pattern of CagA and VacA proteins in *Helicobacter pylori* seropositive asymptomatic children in western Saudi Arabia. *Saudi Med J*, 26, 1372-7.
- 108. Jaing, T., Yang, C., Hung, I., Chiu, C., & Chang, K.** (2003). Efficacy of *Helicobacter pylori* eradication on platelet recovery in children with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr*, 92, 1153-7.
- 109. Kaakoush, NO., Mendz, GL.** (2005). *Helicobacter pylori* disulphide reductases: role in metronidazole reduction. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 44, 137-142.
- 110. Kanizaj, TF. & Dunac, N.** (2014) *Helicobacter pylori*: Future perspectives in therapy reflecting three decades of experience. *World J Gastroenterol*, 20(3), 699-705.
- 111. Karczewska, E., Klesiewics, K., Skibba, I., Wojtas-Bonior, I., Sito, E., Czajeki, K., y otros.** (2012). Variability in Prevalence of *Helicobacter pylori* Strains Resistant to Clarithromycin and Levofloxacin in Southern Poland. *Gastroenterol Res Pract*, 418010.
- 112. Kato, M., Saito, M., Fukuda, S., Kato, C., Ohara, S., Hamada, S., y otros.** (2004). ¹³C- Urea breath test, using a new compact nondispersive isotope-selective infrared spectrophotometer: comparison with mass spectrometry. *J Gastroenterol*, 39, 629-34.
- 113. Kelly, S., Pitcher, M., Farmery, S., & Gibson, G.** (1994). Isolation of *Helicobacter pylori* from faeces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterology*, 107, 1671-1674.
- 114. Kim, M., Kim, J., Jung, H., Kim, Y., & Song, I.** (2004). Distribution of antibiotic MICs for *Helicobacter pylori* strains over a 16-year period in patients from Seoul, South Korea. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 4843-4847.
- 115. King, A.** (2001). recommendations for susceptibility test of fastidious organisms and those requiring special handling. *J Antimicrob Chemother*, 48, 77-80.

BIBLIOGRAFÍA

- 116. Kodaman, N., Pazos, A., Schneider, BG., Piazuelo, MB., Mera, R., Sobota, RS., Sicinshi, LA., Shaffer, CL., Romero-Gallo, J., de Sablet, T., Harder, RH., Bravo, LE., Peek JR, RM., Wilson, KT., Cover, TL., Williams, SM., y Correa, P.** (2014) Human and *Helicobacter pylori* coevolution shapes the risk of gastric disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, doi/10.1073/pnas. 1318093111,2014.
- 117. Kolibasova, K., Cervenkova, D., Hegyi, E., Lengyelova, J., & Toth, J.** (1994). *Helicobacter pylori*: a possible cause etiologic of chronic urticaria. *Dermosen Beruf Umwelt* , 42, 235-236.
- 118. Kuipers, E., Thijs, J., & Festen, H.** (1995). The prevalence of *H. pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 9, 59-61.
- 119. Kusters, J., Van Vliet, A., & Kuipers, E.** (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* , 19, 449-490.
- 120. Kuwahara, H., Miyamoto, Y., Akaike, T., Kubota, T., Sawa, T., Okamoto, S., y otros.** (2000). *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxynitrite via carbon dioxide production. *Immunol*, 165, 1918-24.
- 121. Kwon, D., Kim, J., Lee, M., Yamaoka, Y., Kato, M., Osato, M., y otros.** (2000). Isolation and characterization of tetracycline-resistant clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 3203-3205.
- 122. Laine, L., Lewin, D., Naritoku, W., Estrada, R., & Cohen, H.** (1996). Prospective comparison of commercially available rapid urease tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Gastrointest Endosc*, 44, 523-526.
- 123. Larsen, A., Ragnhildstveit, E., Moayeri, B., Eliassen , L., & Melby, K.** (2013). Resistance rates of metronidazole and other antibacterials in *Helicobacter pylori* from previously untreated patients in Norway. *APMIS*, 121, 353-358.

BIBLIOGRAFÍA

- 124. Larsen, A., Ragnhildstveit, E., Moayeri, B., Eliassen, L., & Melby, K.** (2013). Resistance rates of metronidazole and other antibacterials in *Helicobacter pylori* from previously untreated patients in Norway. *APMIS*, *121*, 353-358.
- 125. Lascols, C., Lamarque, D., Costa, J., Copie-Bergman, C., Le Glaunec, J., Deforges, L., y otros.** (2003). fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, *41*, 4573-4577.
- 126. Lázaro, E., & Oteo, J.** (2006). Evolución del consumo y de la resistencia a antibióticos en España. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, *30*, 10-19.
- 127. Leandro, I.** (1985). Cómo se hace un buen vino. Manual completo de enología moderna. *Ed. De Vecchi S.A.*
- 128. Lecoeur, H.** (2002). Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. *Exp. Cell Res*, *277* (1), 1–14.
- 129. Ledermann, W.** (2007). *Una historia personal de las bacterias*. Chile: RiL editoriales.
- 130. Leingthon, F., Urquiaga, I.** (1999). Polifenoles del vino y salud humana. *Dpto de Biología celular y molecular. Facultad de ciencias biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile*. www.antioxidnates.com.ar.
- 131. Li, C., Musich, P., Ha, T., Ferguson, D., Patel, N., Chi, D., y otros.** (1995). High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay. *J Clin Pathol*, *48*, 662-666.
- 132. Liu, G., Xu, X., He, L., Ding, Z., Gu, Y., Zhang, J., y otros.** (2011). Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated from Beijing children. *Helicobacter*, *16*, 356-362.

BIBLIOGRAFÍA

- 133. Logan , R., & Hirschl, A.** (1996). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Curr Opin Gastroenterol*, *12*, 1-5.
- 134. Lozniewski, A., Haristoy, X., Rasko, D., Hatier, R., Plénat, F., Taylo, D., y otros.** (2003). Influence of Lewis antigen expression by *Helicobacter pylori* on bacterial internalization by gastric epithelial cells. *Infect Immun*, *71*, 2902-906.
- 135. López-Brea, M., & Alarcón, T.** (2006). Novel Real Time PCR for detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Helicobacter*, *11*, 400.
- 136. López-Brea, M., & Alarcón, T.** (1999). Sensibilidad a los antimicrobianos en la infección por *Helicobacter pylori*. En M. López-Brea, *Helicobacter pylori: retos para el siglo XXI. Microbiología, clínica y tratamiento.* (págs. 281-305). Barcelona: Prous Science.
- 137. López-Brea, M., Domingo, D., & Alarcón, T.** (2007). Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. En M. López-Brea, *La infección por Helicobacter pylori en el niño.* Madrid: Ergón.
- 138. Malfertheiner, P., Mégraud , F., & O´Morain, C.** (2005). Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection. Business Briefing: European Gastroenterology Review.
- 139. Malfertheriner, P., Megraud, F., O´Morain, C., Atherton, J., Axon, A., Bazzoli, F., y otros.** (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut*, *61*, 646-664.
- 140. Manyi-Loh, CE., Clarke, AM., Munzhelele, FH. Gree, E., Mkwetshana, NF., & Ndip, RB.** (2010) Selected African honeys and their extracts possess in vitro anti-*Helicobacter pylori* activity. *Archiv Med Res*, *41*, 324-331.
- 141. Marchildon, P., Sugiyama, T., Fukada, Y., Peacock, J., Asaka, M., Shimoyama, T., y otros.** (2003). Evaluation of the effects of strains-specific antigen

BIBLIOGRAFÍA

variation on the accuracy of serologic diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Microbiol*, 41, 1480-1485.

142. Marshall , B. (1995). Estado actual de la infección por *Helicobacter pylori*. En M. López-Brea, *Helicobacter pylori. Microbiología, clínica y tratamiento* (págs. 11-22). Madrid: Mosby/Doyma.

143. Martín de Argila, C., Boixeda, D., Cantor, R., Mir, L., Gisbert, J., & Arocena García, A. (1996). *H. pylori* infection in a healthy population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol* , 8, 1165-1168.

144. Martín de Argila, C., Boixeda, D., Cantón, R., Mir, N., De Rafael, L., Gisbert, J., y otros. (1996). *Helicobacter pylori* infection in a healthy population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 8, 1165-1168.

145. Martínez, M. (2007). Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* en niños. En M. López-Brea, *La infección por Helicobacter pylori en el niño*. (págs. 81-89). Madrid: Ergón.

146. Martínez Gómez, MJ., y Perdomo Giraldo, M. (2010) Infección por *Helicobacter pylori* en niños. Protocolos de diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAEP, 93-98.

147. Martini, S., D'Addario, C., Braconi, D., Bernardini, G., Salvini, L., Bonechi, C., Figura, N., Santucci, A., y Rossi, C. (2009). Antibacterial activity of grape extracts on *cagA-Positive* and *-Negative Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Chemother*, 21, 507-513.

148. Martini, S., Bonechi, C., Rossi, C., y Figura, N. (2011). Increased susceptibility to resveratrol of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with gastric carcinoma. *J Nat Prod*, 74(10), 2257-2260.

BIBLIOGRAFÍA

- 149. Matysiak-Budnik, T., & Megraud, F.** (1997). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection with special refernece to professional risk. *J Physiol Pharmacol*, 48, 3-17.
- 150. Matysiak-Budnik, T., Gosciniak G, Bugmann , D., Lubczynska-Kowalska, W., Poniewierka, E., & Knapik, Z.** (1994). Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in medical staff in Poland. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 6, 309-311.
- 151. McDonald, MS., Hughes, M., Burns, J., Lean, MEJ., Matthews, D., Crozier, A.** (1998). Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J Agric Food Chem*, 46, 368-375.
- 152. McNulty, C., & Dent, J.** (1988). Susceptibility of clinical isolates of *Campylobacter pylori* to twenty-one antimicrobial agents. *Eur J ClinMicrob Infect Dis.*, 7, 566-569.
- 153. McNulty, C., Owen, R., Tompkins, D., Hawtin, P., McColl, K., Price, A., Smith, G., Teare, L., PHLS Helicobacter Working Group.** (2002). *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. *J Antimicrob Chemother*, 49(4), 601-609.
- 154. Megraud , F., & Lehours, P.** (2007). *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibilit testing. *Clin Microbiol Rev*, 20, 280-322.
- 155. Megraud, F.** (2003). Surveillance de la résistance de *Helicobacter pylori* aux antibiotiques. In: Surveillance nationale des maladies infectieuses 1998-2000. *St Maurice, France: Institut de Veille Sanitaire*, 327-329.
- 156. Megraud, F.** (2004). *H. pylori* antibiotic resistance: Prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*, 53, 1374-1384.
- 157. Megraud, F., Brassens-Rabbe, M., Denis, F., Belbouri, A., & Hoa, D.** (1989). Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol*, 27, 1870-1873.

BIBLIOGRAFÍA

- 158. Megraud, F., Coenen, S., Versporten, A., Kist, M., Lopez-Brea, M., Hirschl, A., y otros.** (2013). *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*, 62, 34-42.
- 159. Megraud, F., Lehn, N., Lind, T., Bayerdorffer, E., O'Morain, C., Spiller, R., y otros.** (1999). Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 2747-2752.
- 160. Megraud, F., Neman-Simba, V., & Brugmann, D.** (1992). Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter pylori* urease on human epithelial cells. *Infect Immun*, 60, 1858-63.
- 161. Megraud, F.** (2013). Current recommendations for *Helicobacter pylori* therapies in a world of evolving resistance. *Gut Microbes*, 4.
- 162. Midolo, P., Korman, M., Turnidge, J., & Lambert, J.** (1996). *Helicobacter pylori* resistance to tetracycline. *Lancet*, 347, 1194-1195.
- 163. Milani, M., Ghotaslou, R., Akhi, M., Nahaei, M., Hasani, A., Somi, M., y otros.** (2012). The status of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Eastern Azerbaijan, Iran: comparative study according to demographics. *J Infect Chemother*, 18, 848-852.
- 164. Miller-Podraza, H., Lanne, B., Angström, J., Teneberg, S., Milh, M., Jovall, P., y otros.** (2005). Novel binding epitope for *Helicobacter pylori* found in neolacto carbohydrate chains: structure and cross-binding properties. *J Biol Chem*, 280, 19695-703.
- 165. Miyachi, H., Miki, I., Aoyama, N., Shirasaka, D., Matsumoto, Y., Toyoda, M., y otros.** (2006). Primary levofloxacin resistance and *gyrA/B* mutations among *Helicobacter pylori* in Japan. *Helicobacter*, 11, 243-249.

BIBLIOGRAFÍA

- 166. Moayyedi, P., & Talley, J.** (2006). Gastroesophageal reflux disease. *Lancet*, 367, 2086-2100.
- 167. Montecucco, C., & de Bernard, M.** (2003). Immunosuppressive and proinflammatory activities of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*. *J Exp Med*, 198, 1767-1771.
- 168. Moore, R., Beckthold, B., Wong, S., Kureishi, A., & Bryan, L.** (1995). Nucleotide sequence of the gyrA gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 107-111.
- 169. Morris, J., Reasonover, A., Bruce, M., Bruden, D., McMahon, B., Sacco, F., y otros.** (2005). Evaluation of seaFAST, a rapid fluorescent in situ hybridization test, for detection of *Helicobacter pylori* and resistance to clarithromycin in paraffin, embedded biopsy sections. *J Clin Microbiol*, 43, 3494-3496.
- 170. Mujumdar, P., Shah, S., Dhunjibhoy, K., & Desai, H.** (1990). Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in healthy volunteers. *Indian J Gastroenterol*, 9, 271-272.
- 171. Murakami, K., Furuta, T., Ando, T., Nakajima, T., Inui, Y., Oshima, T., y otros.** (2013). Multi-center randomized controlled study to establish the standard third-line regimen for *Helicobacter pylori* eradication in Japan. *J Gastroenterol*, 48, 1128-1135.
- 172. Murakami, M., Yoo, J., Teramura, S., Yamamoto, K., Saita, H., Matuo, K., y otros.** (1990). Generation of ammonia and mucosal lesion formation following hydrolysis of urea by urease in the rat stomach. *J Clin Gastroenterol*, 12, 104.
- 173. Murray, L., McCrum, E., Evans, A., & Bramford, K.** (1997). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection among 4742 randomly selected subjects from Northern Ireland. *Int J Epidemiol*, 26, 880-887.

BIBLIOGRAFÍA

- 174. Murray PR.** Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. (2010). *Clin Microbiol Infect*, 16(11), 1626–30.
- 175. Nardone, G., Rocco, A., & Malfertheiner, P.** (2004). Review article: *Helicobacter pylori* and molecular events in precancerous gastric lesions. *Aliment Pharmacol Ther*, 20, 261-70.
- 176. Neale, K., & Logan, R.** (1995). The epidemiology and transmission of *Helicobacter pylori* infection in children. *Aliment Pharmacol Ther*, 9, 77-84.
- 177. Nomura, S., Suzuki, H., Masaoka, T., Kurabayashi, K., Ishii, H., Kitajima, M., y otros.** (2005). Effect of dietary anti-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter*, 10, 43-52.
- 178. Nonaka, L., Connell, S., & Taylor, D.** (2005). 16S rRNA mutations that confer tetracycline resistance in *Helicobacter pylori* decrease drug binding in *Escherichia coli* ribosomes. *J Bacteriol*, 187, 3708-3712.
- 179. Nugaliev, Z., Openkun, A., & Graham, D.** (2006). Problem of distinguishing false-positive tests from acute or transient *Helicobacter pylori* infections. *Helicobacter*, 11, 69-74.
- 180. O'Connor, A., Taneike, I., Nami, A., Fitzgerald, N., Ryan, B., Breslin, N., y otros.** (2013). *Helicobacter pylori* resistance rates for levofloxacin, tetracycline and rifabutin among Irish isolates at a reference centre. *Ir J Med Sci*, 182, 693-695.
- 181. Oderda, G., Marinello, D., Lerro, P., Kuvidi, M., de' Angelis, G., Ferzetti, A., y otros.** (2004). Dual vs triple therapy for childhood *Helicobacter pylori* gastritis: a double-blind randomised multicentre trial. *Helicobacter*, 9, 293-301.
- 182. Ohtaki, Y., Azuma, T., Konishi, J., Ito, S., & Kuriyama, M.** (1997). Association between genetic polymorphism of the pepsinogen C gene and gastric body

BIBLIOGRAFÍA

ulcer: The genetic predisposition is not associated with *H.pylori* infection. *Gut*, 41, 619-623.

183. Ozbey, G., Dogan, Y., & Demiroren, K. (2013). Prevalence of *Helicobacter pylori* virulence genotypes among children in Eastern Turkey. *World J Gastroenterol*, 19, 6585-89.

184. Ozbey, G., Yasar, D., & Demiroren, K. (2013). Prevalence of *Helicobacter pylori* virulence genotypes among children in Eastern Turkey. *World J Gastroenterol*, 19, 6585-6589.

185. Palmieri, L., Manreli, M., Roca, G. (1999). Effect of resveratrol and some other natural compounds on tyrosine kinase activity and on cytolysis. *Drug Exp Clin Res*, 25, 79-85.

186. Papanga, G., Miller, N., Rice-Evans, CA. (1999). The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute?. *Free Radic Res*, 30, 153-162.

187. Parra-Cid, T., Calvino Fernández, M., Benito Martínez, S., y Jones, NL. (2013). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 18(1), 12-17.

188. Parsons , H., Carter, M., Sangers, D., Winstanley, T., & Lobo, A. (2001). *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance in the United Kingdom: the effect of age, sex and socio-economic status. *Aliment Pharmacol Ther*, 15, 1473-1478.

189. Pathak, C., Bhasin, D., & Khanduja, K. (2004). Urea breath test for *Helicobacter pylori* detection: present status. *Trop Gastroenterol*, 25, 151-61.

190. Peitz, U., Hackelsberger, A., & Malfertheiner, P. (1999). A practical approach to patients with refractory *Helicobacter pylori* infection, or who are re-infected after standar therapy. *Drugs*, 57, 905-920.

BIBLIOGRAFÍA

- 191. Pellicano, R., Smedile, A., Ponzetto, A., Berrutti, M., Astegiano, M., Saracco, G., y otros.** (2005). How accurate is the culture of *Helicobacter pylori* in a clinical setting? An appraisal. *Panminerva Med*, 47, 191-194.
- 192. Pelstring, R., Essell, J., Kurtin, P., Cohen, A., & Banks, P.** (1991). Diversity of organ site involvement among malignant lymphomas of mucosa associated tissues. *AM J Clin Pathol*, 96, 738-745.
- 193. Pina, M., Occhialini, A., Monteiro, L., Doermann, H., & Megraud, F.** (1998). Detection of point mutations associated with resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin by hybridization in liquid phase. *J Clin Microbiol*, 36, 3285-3290.
- 194. Posselt, G., Backert, S., y Wessler, S.** (2013) The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Communication & Signalisng*, 11, 77.
- 195. Pounder, R., & Ng, D.** (1995). The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther*, 9, 33-39.
- 196. Pristautz, H., Eherer, A., Brezinschek, R., Truschnig-Wilders, M., Petritsch, W., Schreiber, F., y otros.** (1994). Prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in the serum of gastroenterologists in Austria. *Endoscopy*, 26, 690-696.
- 197. Pueyo, A., Huarte, M., & Jiménez, C.** (1998). Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*. *Anales Sis San Navarra*, 21, 9-17.
- 198. Rafeey, M., Ghotaslou, R., Nikvash, S., & Haafez, A.** (2007). Primary resistance in *Helicobacter pylori* isolated in children from Iran. *J Infect Chemother*, 13, 291-295.
- 199. Rapisarda, P., Fanella, F., Maccarone, E.** (2000). Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices, *J Agric Food Chem*, 48, 2249.

BIBLIOGRAFÍA

- 200. Rice-Evans, CA., Miller, NJ., & Paganga, G.** (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20, 933-956.
- 201. Robicsek, A., Jacoby, G., & Hooper, D.** (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Di*, 6, 629-640.
- 202. Rosenberg, E., Noah, P., & Sinner, R.** (1994). Microorganisms and psoriasis. *J Natl Med Assoc*, 86, 305-310.
- 203. Rudi, J., Kuck, D., Strand, S., von Herbay, A., Mariani, S., Krammer, P., y otros.** (1998). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis. *J Clin Invest*, 102, 1506-14.
- 204. Saadah, OI.** (2010) *Helicobacter pylori* infection in Saudi children: clinical, endoscopic and pathological findings. *Arab Journal of Gastroenterology*, 11, 39-43.
- 205. Salama, RN., Hartung, ML. y Müller, A.** (2013) Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature Reviews Microbiology*, 11 (6), 385-399.
- 206. Samie, A., Tanih, NF y Ndip, RN.** (2014). Chapter 9. *Helicobacter pylori* Infection- Challeges of Antimicrobial Chemotherapy and Emergence of Alternative Treatments. En: Roesler, BM. Trends in *Helicobacter pylori* infection. 35 págs. INTECH.
- 207. Sanz, J., & López-Brea, M.** (1999). Diagnóstico serológico de la infección por *Helicobacter pylori*. En M. López-Brea, *Helicobacter pylori: retos para el siglo XXI. Micoribología, clínica y tratamiento.* (págs. 107-134). Barcelona: Prous Science.
- 208. Sauer, S., Freiwald, A., Maier, T., Kube, M., Reinhardt, R., Kostrzewa, M., y otros.** (2008). Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *Plos One*, 3, e2843.

BIBLIOGRAFÍA

209. **Sauer S, Kliem M.** (2010). Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Micro*, 8(1),74–82.
210. **Schabereiter-Gurtner, C., Hirschl, A., Dragosics, B., Hufnagl, P., Puz, S., Kovach, Z., y otros.** (2004). Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J Clin Microbiol*, 42, 4512-4518.
211. **Schmidt, H., & Hensel, M.** (2004). Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, 17, 14-56.
212. **Selgrad, M., Meissle, J., Bornschein, J., Kandulski, A., Langner, C., Varbanova, M., y otros.** (2013). Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in central Germany and its relationship with the number of eradication therapies. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 25, 1257-1260.
213. **Seng, P., Drancourt, M., Gouriet F., La Scola, B., Fournier, P-E., Rolain, JM., & Raoult, D.** (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, 49(4), 543–51.
214. **Serrano, A., Candelaria-Hernández, M., De la Garza, J., & Alonso , L.** (2009). *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. *Cancerología* , 4, 193-204.
215. **Silván, J., Mingo, E., Hidalgo, M., de Pascual-Teresa, S., Carrascosa, A., & Martínez-Rodríguez, A.** (2013). Antibacterial activity of a grape seed extract and its fractions against *Campylobacter spp.* *Food Control*, 29, 25-31.
216. **Simala-Grant, J., & Taylor, D.** (2004). Molecular biology methods for the characterization of *Helicobacter pylori* infections and their diagnosis. *APMIS*, 112, 886-97.

BIBLIOGRAFÍA

- 217. Simonetti, G., Santamaria, AR., Diodata, F., Mulinacci, N., Innocenti, M., Cecchini, F., Pericolini, E., Gabrielli, E., Panella, S., Antonacci, D., Palamara, AT., Vecchiarelli, A., & Pasqua G.** (2014). Evaluation of Anti-*Candida* Activity of *Vitis vinifera* L. Seed Extracts Obtained from Wine and Table Cultivars. *Biomed Res Int*, 1014, 127021.
- 218. Sipponen, P.** (1997). *Helicobacter pylori* gastritis epidemiology. *J Gastroenterol*, 32, 273-277.
- 219. Stone, G., Shortridge, D., Versalovic, J., Beyer, J., Flamm, R., Ghoneim, A., y otros.** (1997). A PCR-oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23S rRNA gene mutations in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41, 712-714.
- 220. Suerbaum, S., & Josenhans, C.** (1999). Virulence factor of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development. *Molecular Medicine Today*, 5, 32-39.
- 221. Suzuki, H., Seto, K., Mori, M., Miura, S., & Ishii, H.** (1998). Monochloramine induced DNA fragmentation in gastric cell line MKN45. *Am J Physiol*, 275, 712-6.
- 222. Taylor, D., & Blaser, M.** (1991). The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol Rev*, 13, 42-59.
- 223. Thomas, J.** (1994). Epidemiología de las infección por *Helicobacter pylori*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 12, 6-13.
- 224. Thomsen, L., Tasman-Jones, C., Moris, A., Wiggins, P., Lee, S., & Forlong, C.** (1989). Ammonia produced by *Campylobacter pylori* neutralizes H⁺ moving through gastric mucus. *Scan J Gastroenterol*, 24, 761-768.
- 225. Toracchio, S., & Marzio, L.** (2003). Primary and secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated in central Italy during the years 1998-2002. *Dig Liver Dis*, 35, 541-545.

BIBLIOGRAFÍA

- 226. Toro, C., García-Samaniego, J., Carbó, J., Iñiguez, A., Alarcón, T., López-Brea, M., y otros.** (2001). Prevalencia de la resistencia primaria de *Helicobacter pylori* a ocho antimicobianos en un hospital de Madrid. *Rev Esp Quimioterap*, 14, 172-176.
- 227. Trebesius, K., Panthel, K., Strobel, S., Vogt, K., Faller, G., Kirchner, T., y otros.** (2000). Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. *Gut*, 46, 608-14.
- 228. Urruzuno, P.** (2007). Clínica. En M. López-Brea, *La infección por Helicobacter pylori en el niño* (págs. 61-68). Madrid: ergon.
- 229. Urruzuno, P.** (2012). Manejo de la Infección por *Helicobacter pylori*. *Anales de Pediatría Continuada*, 10 (4), 192-200.
- 230. Vaira, D., D'Anastasio, C., Holton, J., Dowsett, J., Londei, M., Bertoni, F., y otros.** (1988). *Campylobacter pylori* in abattoir workers: Is it a zoonosis? *Lancet*, 2, 725-726.
- 231. Val, M.** Vino tinto, taninos y buena salud. (2003). www.sabormediterraneo.com/salud/salud_vinos.htm
- 232. Van Door, L., Figueriedo, C., Sanna, R., Pena, S., Midolo, P., Enders, K., y otros.** (1998). Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. *J Clin Microbiol*, 36, 2597-2603.
- 233. Van Doorn, L., Debets-Ossenkopp, Y., Marais, A., Sanna, R., Megraud, F., Kusters, J., y otros.** (1998). Detection of 23S rRNA mutations associated to macrolide resistance of *Helicobacter pylori* by PCR and a reverse hybridization line probe assay. *Gut*, 43, A7.
- 234. Vandenplas, Y., Blecker, U., Devrecker T, Keppens, E., Nijs, J., Cadranel, S., y otros.** (1992). Contribution of the C13-urea breath test to the detection of *Helicobacter pylori* gastritis in children. *Pediatrics*, 90, 608-611.

BIBLIOGRAFÍA

- 235. Vатtem, D., Lin, Y., Ghaedian, R., & Shetty, K.** (2005) Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. *Process Biochemistry*, *40*, 1583-1592.
- 236. Veres, G., y Pehlivanoglu, E.** (2007) *Helicobacter pylori* infection in pediatrics. *Helicobacter*, *12*(1), 38-44.
- 237. Versalovic, J., Shortdridge, D., Kibler, K., Griffy, M., Beyer, J., Flamm, R., y otros.** (1996). Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, *40*, 477-480.
- 238. Wang, Z., Huan, Y., Zou, J., Cao, K., Xu, Y.** (2002). Effect of red wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation *in vivo* and *in vitro*. *J mol Med*, *9*, 77-79.
- 239. Wang, G., Alamuri, P., & Maier, R.** (2006). The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, *61*, 847-860.
- 240. Weeks, D., Eskandari, S., Scott, D., & Sachs, G.** (2000). A H⁺- gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*, *287*, 482-485.
- 241. Wirth, H., Yang, M., Karita, M., & Blaser, M.** (1996). Expression of the human cell: Surface glycoconjugates Lewis X and Lewis Y by *Helicobacter pylori* isolates is related to cagA status. *Infect Immun*, *35*, 4598-4608.
- 242. Wolle, K., Leodolter, A., Malfertheiner, P., & Konig, W.** (2002). Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in Germany: stable primary resistance from 1995 to 2000. *J Med Microbiol*, *51*, 705-709.
- 243. Wood, Z., Schroder, E., Robin Harris, J., & Poole, L.** (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, *28*, 32-40.

BIBLIOGRAFÍA

244. **Wu, J., Kim, J., Reddy, R., Wang, W., Graham, D., & Kwon, D.** (2005). Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. *Antimicrob Agents Chemother*, *49*, 578-583.
245. **Wu, T-S., Hu, H-M., Kuo, F-C. Y Kuo, C-H.** (2014) Eradication of *Helicobacter pylori* infection. *J Med Sci*, *30*, 167-172.
246. **Wueppenshorst, N., Stueger, H., Kist, M., & Glocker, E.** (2013). High secondary resistance to quinolones in German *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*, *68*, 1562-1566.
247. **Yang, JY., Della-Fera, MA., Rayalam, S., Ambati, S., Hartzell, DL., Park, HJ., & Baile, CA.** (2008). Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci*, *82*, 1032–1039.
248. **Yamasaki, E., Wada, A., Kumatori, A., Nakagawa, I., Funao, J., Nakayama, M., y otros.** (2006). *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic protein Bax and Bak, leading to cytochrome C release and cell death, independent of vacuolation. *J Biol Chem*, *281*, 11250-9.
249. **Yao, W., Wang, H., Wang, S., Sun , S., Zhou, J., & Luan, Y.** (2011). Assessment of the antibacterial activity and the antidiarrheal function of flavonoids from bayberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 5312-5317.
250. **Zheng, P., Tang, F., Qi, Y., & Li, J.** (2006). Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens, but no vacuolating cytotoxin activity or babA2 gene status, in *Helicobacter pylori* strains from China. *Chin J Dig Dis*, *7*, 61-65.
251. **Zhi-Tian, Z., Zheng-Ying, W., & Ya-Xian, C.** (1985). Double-blind short-term trial of furazolidone in peptic ulcer. *Lancet*, *1*, 1048-1049.

SUMMARY

SUMMARY

8. SUMMARY

INTRODUCTION

Helicobacter pylori is a microaerobic, Gram-negative spiral bacterium that colonizes the human stomach and is found in more than half of the world's population. Infections with *H. pylori* are closely associated with chronic gastritis, peptic ulcer disease, and the development of gastric cancer.

All consensus guidelines recommend eradication of *H. pylori* for patients with symptoms. Standard therapy combines a proton pump inhibitor (PPI) or ranitidine bismuth citrate and two antibiotics, chosen from among amoxicillin, clarithromycin, and metronidazole.

However, this therapy has been questioned because of the increased eradication failure rates. Many factors have been implicated as causes of treatment failure, including ineffective penetration of antibiotics into the gastric mucosa, antibiotic inactivation by the low stomach pH, a lack of patient compliance, and the emergence of acquired resistance to antibiotics by *H. pylori*.

SUMMARY

Although it is clear that *H. pylori* infection increases the risk of these upper gastrointestinal diseases, it is still not fully understood why infected individuals develop one disease rather than another, emphasizing the importance of the host and other cofactors. It has been suggested that both the possession of the cytotoxin-associated gene A (CagA), and the production of a vacuolating cytotoxin encoded by the vacuolating cytotoxin A (VacA) gene, are linked to increased pathogenicity of *H. pylori* strains.

There is substantial evidence that *H. pylori* infection, especially with the strains expressing the 128 kDa CagA protein, is associated with enhanced gastric inflammatory response and increased risk of developing atrophic gastritis, peptic ulcer and even GC .

However, conflicting results regarding the association between these virulence factors and clinical disease have been reported, and epidemiological papers suggest that not all tumours are *H. pylori*-positive.

Helicobacter pylori is associated with digestive diseases and it is considered a risk factor in the development of gastric cancer.

Although several antibiotics and antacids have been used for treatment, there is a failure rate of up to 20%. Some studies have published the *in vitro* activity of natural substances, as phenolic compounds, against *H. pylori*.

SUMMARY

Wine is a natural product obtained by direct fermentation of grapes or their juice; contains alcohol and multiple -products of alcoholic fermentation , but also contains many other substances from the grapes , which is its value especially from the point of view of health .

The concentration of polyphenolic compounds in wine varies between 1.80 and 1.06 g / L , with an average of 2.57 g / L for red wine and between 0.16 and 0.30 g / L for white. As the total phenol content of foods and beverages correlates very strongly with their antioxidant activity, polyphenol composition and in terms of antioxidant power , a glass of red wine (150mL) equals 12 white wine or 2 cups area, 4 blocks , 5 servings of onion , 3 ½ cups of beer, orange juice 7 or 20 blocks.

The objective of this study were to study the susceptibility of different antimicrobians against *H. pylori*, characterize virulence factors of *H. pylori* and compare the effect of various wine phenolic compounds in *H. pylori* by different methods.

SUMMARY

METHODS

A total of 439 strains of *H. pylori* clinical isolates were studied from both children and adults since January 2010 until December 2013.

The susceptibility of 6 antimicrobial agents was made by E-test method and virulence factors (cagA gene and vacA alleles) of *H. pylori* was characterized by PCR.

The study of the effect of phenolic compounds in *H. pylori* was performed by disc diffusion, killing curves, minimum inhibitory concentration, MALDI-TOF and the emission of fluorescence using propidium iodide.

H. pylori was identified by MALDI-TOF.

RESULTS

A high percentage of resistance to clarithromycin (52,8%) and metronidazole (34,5%) was observed.

SUMMARY

The percentage of resistance to amoxicillin decreased from 2010 to 2013. A high percentage of *vacA* s2 (81.1%) and *cagA* negative (81.1%) was found in the *H. pylori* strains studied.

A higher percentage of resistance was observed in *H. pylori* strains isolated in adults with respect to children for all antibiotics studied , probably because they have been subjected to increased antibiotic pressure.

An increase in the percentage of rifampicin resistance in strains of adults from 2010 to 2013 (16.7% to 71.4 %) was also observed.

In our work , we study a *cagA* + strain and two *cagA*- , and observed a higher CMI in *cagA* + strain for GSE , Q and RE compounds, however for the rest of compounds (Pu, C , F, G , R1, R2 and Tan) MICs were equal to or lower than in *cagA*- strains.

All phenolic compounds except Resveratrol 2 Resveratrol pure produced greater inhibition halos in strains of *H. pylori* virulence factors without (*vacA* and *cagA*- s2) . No significant to study the effect of the extracted compounds in wine strains of *H. pylori* with different pattern of resistance to clarithromycin differences.

SUMMARY

Methyl gallate and catechin showed the greatest inhibition zones against *H. pylori* clinical isolates by disc diffusion.

Grape extract showed a lower minimum inhibitory concentration using broth microdilution.

The grape seed extract (SCOM) and Resveratrol 2 showed bactericidal activity against *H. pylori* strains tested by killing curves.

Grape seed extract (SCOM) produced greater damage to the bacterial membrane, by studying the fluorescence of propidium iodide.

The compound produced a greater effect on the pattern of ribosomal proteins of *H. pylori*, studied with the use of the mass spectrometer MALDI - TOF, was the grape seed extract (SCOM).

CONCLUSION

According to the different results obtained in this study, the combination of methyl gallate and catechin, both present at high concentrations in the grape seed

SUMMARY

extract (SCOM) and in a glass of red wine, had a potent inhibitory effect against *H. pylori* clinical isolates.

In the study of membrane damage , we note that the four strains tested , the grape seed extract (GSE) resulted in a greater effect than the other compounds .

Another grape seed extract (SCOM) however, there was little effect on three of the four strains tested .

In our study we see that for different phenolic compounds the inhibition zone are larger when the strain is vacA s2, except for resveratrol 2 and pure resveratrol. Resveratrol 2 is composed of catechin , gallic and resveratrol , however resveratrol 1 is composed gallic, resveratrol and malvidin .

Regarding the presence of cagA gene , in our study , we see that all compounds have a greater inhibition zone when the strain of *H. pylori* is cagA- except resveratrol 2, pure resveratrol and methyl gallate . It is possible that all three gallic pure compounds ,

SUMMARY

resveratrol and catechin found in resveratrol 2 , have a synergistic effect in cagA + strains .

We used the correlation coefficients ICC to see the relationship between the different spectra obtained when *H. pylori* was contacted with various phenolic compounds.

In considering the extent to which proteins affect different phenolic compounds : grape seed extract (SCOM) , grape seed extract (GSE) , Resveratrol 1 and Resveratrol 2; note that the grape seed extract (SCOM) , produces a greater effect . As with the study of membrane damage , it is possible that the combination of catechol and gallic acid at high concentrations, has a higher activity in membrane.