



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSTGRADO

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
UN NUEVO PÉPTIDO AISLADO DE
TETRAMORIUM BICARINATUM
SOBRE CEPAS CARACTERIZADAS
DE *HELICOBACTER PYLORI*
AISLADAS DE PACIENTES
PERUANOS**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

**Q.F. LUIS JESÚS JUNIOR GUZMÁN
VELÁSQUEZ**

LIMA – PERÚ

2016

Asesor de Tesis

Dr. Michel Sauvain, PhD

Institut de recherche pour le développement (IRD)

Laboratorio Mixto Internacional – Laboratorio Andino Amazonico de Química de
la Vida (LMI - LAVI)

Miembros del Jurado

Jorge Arevalo Zelada (Presidente)

Cristina Guerra Giraldez (Vocal)

Vanessa Adauí Sicheiri (Secretaria)

DEDICATORIA

A mis amados padres, Luis y Gladys por ser un pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto academica, como de la vida y por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A Sarita, Jose Manuel y Abigail por su apoyo, cariño y por estar en los momentos mas importantes de mi vida.

A Celmira y Monica por su cariño y apoyo incondicional los cuales resultan simplemente invaluablees.

A Liz por sus palabras, confianza, amor y brindarme el apoyo y tiempo necesario para alcanzar esta meta.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación tecnológica - CONCYTEC por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de Maestría y por el apoyo económico brindado para la realización de mi tesis.

A mi asesor el profesor Michel Sauvain que con su tiempo y paciencia me ha orientado, apoyado y corregido en mi labor científica, facilitándome siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas.

Al LMI-LAVI por acogerme como estudiante durante estos años y permitirme desarrollarme en mi formación ética y profesional.

A mis profesores del LMI-LAVI con una especial consideración al profesor Denis Castillo que con su confianza en mi trabajo y su capacidad de guiar mis ideas a base de exigencia y motivación ha sido un aporte invaluable no solo en el desarrollo de mi tesis sino en mi formación investigadora.

Al Dr. Alejandro Bussalleu y su equipo de trabajo en el Servicio de Gastroenterología de la Clínica Médica Cayetano Heredia por su importante aporte y disponibilidad en el desarrollo de mi tesis.

A mis amigas y compañeras de estudio de la maestría Ines Castro y Daniela Alvarez por su apoyo, ánimo y confianza durante estos magníficos años.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, Maricruz, Milagros, Yesenia, Romina, Karina, Carlos A, Carlos Y, Daniel y Manuel por su aliento, motivación y los momentos compartidos que de forma noble y alegre me permitieron alcanzar esta meta.

TABLA DE CONTENIDO

| | | |
|------|---|----|
| I. | Introducción | 1 |
| II. | Planteamiento del problema | 4 |
| III. | Justificación | 6 |
| IV. | Objetivos | 8 |
| V. | Antecedentes y Marco teórico | 9 |
| | 5.1. <i>Helicobacter pylori</i> | 9 |
| | 5.1.1. Morfología | 10 |
| | 5.1.2. Factores de virulencia | 10 |
| | 5.1.3. Epidemiología | 12 |
| | 5.1.4. Patogénesis | 15 |
| | 5.1.5. Diagnóstico | 16 |
| | 5.1.6. Tratamiento | 17 |
| | 5.1.7. Resistencia antimicrobiana | 19 |
| | 5.1.8. Pruebas de susceptibilidad | 22 |
| | 5.2. Péptidos antimicrobianos | 23 |
| | 5.2.1. Clasificación y origen de los AMPs | 24 |
| | 5.2.2. AMPs de insectos | 24 |
| | 5.2.3. Características y modo de acción de los AMPs | 26 |
| | 5.2.4. Bicarinalina | 28 |
| VI. | Materiales y Métodos | 30 |
| | 6.1. Procedimientos y técnicas | 30 |
| | 6.1.1. Tipo y diseño de estudio | 30 |
| | 6.1.2. Muestra | 30 |

| | |
|---|----|
| 6.1.2.1. Obtención del nuevo péptido antimicrobiano | |
| “Bicarinalina” | 30 |
| 6.1.2.2. Obtención de las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> | 30 |
| 6.1.2.3. Criterios de inclusión | 31 |
| 6.1.2.4. Criterios de exclusión | 31 |
| 6.1.2.5. Tamaño de muestra | 32 |
| 6.1.3. Consideraciones éticas | 32 |
| 6.1.4. Caracterización de las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> | 32 |
| 6.1.4.1. Obtención de tejido gástrico de pacientes dispépticos | 32 |
| 6.1.4.2. Extracción de <i>Helicobacter pylori</i> a partir de tejido gástrico | 33 |
| 6.1.4.3. Cultivo y aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i> | 33 |
| 6.1.4.4. Identificación de cepas <i>Helicobacter pylori</i> | 34 |
| 6.1.4.5. Identificación molecular de las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> | 34 |
| 6.1.4.6. Criopreservación de cepas de <i>Helicobacter pylori</i> | 35 |
| 6.1.4.7. Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana sobre cepas de <i>Helicobacter pylori</i> | 35 |
| 6.1.4.8. Detección de mutaciones en el gen de <i>ARNr 23s</i> de resistencia a claritromicina sobre cepas de <i>Helicobacter pylori</i> | 37 |
| 6.1.4.9. Secuenciamiento de amplicones del gen de <i>ARNr 23s</i> de resistencia a claritromicina | 37 |

| | | |
|----------|---|----|
| 6.1.5. | Evaluación de la actividad antimicrobiana de Bicarinalina sobre cepas caracterizadas de <i>Helicobacter pylori</i> | 38 |
| 6.1.6. | Evaluación de la citotoxicidad de Bicarinalina | 38 |
| 6.1.6.1. | Evaluación de la citotoxicidad de Bicarinalina sobre macrófagos de la línea celular murina RAW 264.7 | 38 |
| 6.1.6.2. | Evaluación de la citotoxicidad de Bicarinalina sobre la línea celular gástrica NCI-N87 | 40 |
| 6.1.7. | Evaluación de inhibición de adhesión de <i>Helicobacter pylori</i> sobre la línea celular gástrica NCI-N87 | 41 |
| 6.1.8. | Análisis de datos | 42 |
| VII. | Resultados | 44 |
| 7.1. | Caracterización de las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> | 44 |
| 7.1.1. | Obtención de tejido gástrico de pacientes dispépticos | 44 |
| 7.1.2. | Extracción de <i>Helicobacter pylori</i> a partir de tejido gástrico | 44 |
| 7.1.3. | Cultivo y aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i> | 44 |
| 7.1.4. | Identificación de cepas de <i>Helicobacter pylori</i> | 45 |
| 7.1.5. | Identificación molecular de las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> | 46 |
| 7.1.6. | Criopreservación de cepas de <i>Helicobacter pylori</i> | 47 |
| 7.1.7. | Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana sobre cepas <i>Helicobacter pylori</i> | 48 |
| 7.1.8. | Detección de mutaciones en el gen de <i>ARNr 23s</i> de resistencia a claritromicina sobre cepas <i>Helicobacter pylori</i> | 49 |

| | |
|---|----|
| 7.1.9. Secuenciamiento de amplicones del gen de <i>ARNr 23s</i> de resistencia a claritromicina | 51 |
| 7.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Bicarinalina sobre cepas caracterizadas de <i>Helicobacter pylori</i> | 52 |
| 7.3. Evaluación de la citotoxicidad de Bicarinalina | 53 |
| 7.3.1. Evaluación de la citotoxicidad de Bicarinalina sobre macrófagos de la línea celular murina RAW 264.7 | 53 |
| 7.3.2. Evaluación de la citotoxicidad de Bicarinalina sobre la línea celular gástrica NCI-N87 | 53 |
| 7.4. Evaluación de inhibición de adhesión de <i>Helicobacter pylori</i> sobre la línea celular gástrica NCI-N87 | 54 |
| VIII. Discusión | 55 |
| IX. Conclusiones | 65 |
| X. Referencias bibliográficas | 66 |
| Anexos | |

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución del total de casos evaluados según cultivos positivos y cepas aisladas de pacientes peruanos.

Tabla 2. CMIs de los ATMs de referencia evaluados sobre la cepa de *H. pylori* ATCC 43504.

Tabla 3. Distribución de los porcentajes de susceptibilidad antimicrobiana según los ATMs de referencia evaluados en las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos.

Tabla 4. Distribución de las mutaciones puntuales detectadas mediante PCR- RFLP de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos.

Tabla 5. Distribución de los genotipos observados en las secuencias parciales del gen que codifica al ARNr 23S de las cepas de *H. pylori* resistentes a Claritromicina aisladas de pacientes peruanos.

Tabla 6. CMI₅₀ de Bicarinalina y ATMs de referencia sobre cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos.

Tabla 7. Evaluación de la citotoxicidad de Bicarinalina en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 y células gástricas NCI-N87.

Tabla 8. CI₅₀ de Bicarinalina para la inhibición de la adhesión de *H. pylori* sobre la línea celular gástrica NCI-N87.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Placa de Agar sangre con presencia de colonias de *H. pylori*.

Figura 2. Visualización microscópica de cepas de *H. pylori*, Tinción Gram (1000X).

Figura 3. Pruebas bioquímicas Oxidasa, Catalasa y Ureasa positivo de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos.

Figura 4. Detección de fragmentos de 425 bp correspondientes al gen de *ARNr 23s* de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos.

Figura 5. Patrones de PCR-RFLP que indican la presencia de mutaciones en un segmento del gen de *ARNr 23s* de resistencia a Claritromicina en las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos.

Figura 6. Mutaciones puntuales en la posición A2142G, A2143G, T2182C y C2195T de la secuencia parcial del gen que codifica al *ARNr 23S* de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMP: Péptido antimicrobiano

ATM: Antimicrobiano

BabA: Adhesina de unión al antígeno del grupo sanguíneo A

BrEt: Bromuro de Etidio

BHI: Brain heart infusion

cagPAI: Isla de ptogenicidad Cag

CagA: Citotoxina asociada al gen A

CC₅₀: Concentración Citotóxica Media

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos

CI₅₀: Concentración Inhibitoria Media

CIEH-UPCH: Comité Institucional de Ética en Humanos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CMI₅₀: Concentración Mínima Inhibitoria Media

-DMSO: Dimetilsulfóxido

E-test: Prueba de epsilómetro

EHPHG: European *Helicobacter Pylori* Study Group

FdxA: Ferredoxina A

FdxB: Ferredoxina B

FldA: Flavodoxina

FOR: Ferredoxina oxidoreductasa

FrxA: Flavinoxidorreductasa NADPH dependiente

H. pylori: Helicobacter pylori

IARC: International Agency for Research in Cancer

IBP: Inhibidor de Bomba de Protones

IS: Índice de selectividad

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NCI-N87: Línea celular gástrica humana derivada de adenocarcinoma gástrico

NHI: National Health Institutes

Omp: Proteína de membrana externa

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBP: Proteína de unión a penicilina

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Polymerase chain reaction

POR: Piruvato oxidoreductasa

QRDR: Región Determinante de Resistencia a Quinolonas

RAW 264.7: Línea celular murina de macrófagos sanguíneos

rdxA: Nitrorreductasa NADPH insensible al oxígeno

RBC: Ranitidina-Citrato Bismuto

RFLP: Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción

SabA: Adhesina de unión al ácido siálico

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SFB: Suero fetal bovino

SG-CMCH: Servicio de Gastroenterología de la Clínica Médica Cayetano Heredia

SP-CMCH: Servicio de Patología de la Clínica Médica Cayetano Heredia

UFC: Unidad formadora de colonia

VacA: Citotoxina vacuolizante

XTT: 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2-tetrazolio-5-carboxanilida

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de “Bicarinalina” un nuevo péptido aislado de *Tetramorium bicarinatum* sobre cepas caracterizadas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes dispépticos peruanos. Luego de caracterizar las cepas de *H. pylori* se determinó que la concentración mínima inhibitoria de Bicarinalina necesaria para inhibir el crecimiento sobre el 50% del panel de cepas aisladas fue de 0.86 μM . Se observó que Bicarinalina no presenta toxicidad sobre macrófagos pertenecientes a la línea celular murina RAW 264.7 y células de mucosa de la línea celular gástrica NCI-N87 con un índice de selectividad de 31.1 y >17.3 respectivamente indicando que la Bicarinalina no es tóxico en ambos modelos celulares. Se determinó que la Concentración Inhitoria Media de Bicarinalina sobre la adhesión de *H. pylori* sobre la línea celular gástrica NCI-N87 fue menor de 0.098 μM . Por lo tanto, Bicarinalina podría ser considerada como un nuevo compuesto alternativo de adecuado perfil de actividad y baja toxicidad sobre un modelo de infección celular frente a cepas de *H. pylori*.

Palabras clave: *Tetramorium bicarinatum*, *Helicobacter pylori*, Bicarinalina, Dispepsia.

ABSTRACT

This report evaluated the antimicrobial activity of a new peptide isolated from *Tetramorium bicarinatum* on *Helicobacter pylori* strains isolated from Peruvian dyspeptic patients. Characterized *H. pylori* strains we determined that the Minimum Inhibitory Concentration of Bicarinalina required to inhibit 50% isolates was 0.86 μM , it was found that Bicarinalina had no toxicity on cell line murine macrophages RAW 264.7 and cell line gastric NCI-N87 with a selectivity index of 31.1 and >17.3 respectively indicating the Bicarinalina is not toxic in both cell models. It was determined that the Half Inhibitory Concentration of Bicarinalina in the inhibition of adhesion of *H. pylori* adhesion to cell line gastric NCI-N87 was $<0.098 \mu\text{M}$. Therefore, Bicarinalina could be considered as a new alternative compound of adequate activity profile and low toxicity over a cellular infection model against *H. pylori* strains.

Keywords: *Tetramorium bicarinatum*, *Helicobacter pylori*, Bicarinalin, Dyspepsia

I. INTRODUCCIÓN

H. pylori, la principal especie del género *Helicobacter*, es un patógeno común en humanos y agente causal de una variedad de patologías gastrointestinales como gastritis, úlcera péptica, linfoma y adenocarcinoma gástrico en países desarrollados y en desarrollo. Se estima que el 50% de la población a nivel global es portadora de *H. pylori*. (1)

En el año 1994 la OMS a través de la IARC catalogó a *H. pylori* como un agente carcinógeno para el ser humano y estimó que el tratamiento frente a *H. pylori* reduciría la incidencia de casos de cáncer en 60%, siendo una estrategia efectiva en la prevención de enfermedades neoplásicas asociadas a esta infección. La terapia frente a la infección por *H. pylori* incluye el empleo de un IBP como Omeprazol y la asociación de antimicrobianos (ATMs) como Claritromicina/Amoxicilina o Metronidazol, estrategia globalmente aceptada desde el primer consenso Maastricht. (2, 3)

Actualmente la eficacia de esta combinación ha disminuido a un 70% de éxito de erradicación, aspecto relacionado en parte con el aumento de tasas de resistencia a ATMs empleados frente a la infección y la dificultad del cumplimiento del régimen terapéutico a largo plazo. De este modo, la edición actual del consenso Maastricht recomienda que la primera línea de tratamiento frente a la infección debe establecerse considerando la resistencia al ATM Claritromicina, fármaco de gran relevancia en los esquemas terapéuticos dirigidos a erradicar *H. pylori*. (4, 5)

La finalidad de erradicar *H. pylori* es reducir el número de casos asociados a úlcera péptica y el riesgo de cáncer. Sin embargo, los problemas asociados a la resistencia

antimicrobiana son una de las causas más importantes que conllevan a fallo en la terapia y aumento de riesgo de casos de cáncer. Frente a los problemas de resistencia antimicrobiana los productos naturales brindan posibilidades de una amplia diversidad de estructuras únicas como futuras alternativas dirigidas a solucionar este problema emergente de salud global. (6)

La naturaleza contiene una vasta diversidad de compuestos bioactivos y es por lo tanto una amplia fuente de recursos de potenciales beneficios. Es así, que diversos productos naturales han demostrado actividad frente a *H. pylori* generando una significativa contribución e incremento del arsenal terapéutico en los casos de infección y enfermedades gastrointestinales. (7-9)

La biodiversidad y especificidad de compuestos bioactivos presentes en venenos animales representan una fuente poco común e invaluable de recursos los cuales podrían ser establecidos como agentes farmacológicos o terapéuticos. (10)

Las hormigas constituyen un grupo muy diverso de artrópodos con más de 14 700 especies conocidas y varios miles restantes aún por describir. A pesar de esta diversidad taxonómica, los venenos de hormigas han sido pobremente estudiados en comparación con otros venenos animales. (11-13)

Los venenos de hormigas son también fuente de recursos de moléculas antimicrobianas. Entre estas moléculas, los péptidos antimicrobianos (AMPs) han sido identificados en diversas especies de hormigas, tales como las Ponericinas aisladas de *Pachycondyla goeldii* o Pilosulina desde *Myrmecia pilosula*, demostrando una potente actividad y selectividad de espectros frente a diversos microorganismos. (14)

En este estudio evaluamos la actividad antimicrobiana de Bicarinalina, la cual es un AMP aislado a partir del veneno de hormigas pertenecientes a la especie *Tetramorium bicarinatum* de la subfamilia *Myrmicinae*, presente en hábitats tropicales alrededor del mundo y principalmente en la región oriental de Australia. (15) Este péptido contiene 20 aminoácidos y muestra actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus xylosus* de la misma magnitud que la Melitina y otros AMP himenópteros tales como Pilosulina o Defensina. (16) Además, se ha reportado que Bicarinalina presenta una débil actividad hemolítica indicando una toxicidad general leve. (17)

Adicionalmente, Tené et al (2016) reportaron que Bicarinalina presenta actividad antibacteriana, antifúngica y antirrapasitaria en una amplia variedad de microorganismos observando particularmente mejores perfiles de actividad sobre *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas auroginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Leishmania infantum*. (17) Ilustrando su importancia e interés como una nueva molécula bioactiva.

Por lo cual, la búsqueda y evaluación de nuevos compuestos bioactivos son necesarios para brindar futuras posibilidades no solo en el tratamiento de la infección por *H. pylori* sino a su vez permitiría brindar solución a problemas emergentes de salud global relacionados a la resistencia antimicrobiana.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia antimicrobiana representa un riesgo creciente en la salud global que involucra la prevención y el tratamiento eficaces de esquemas de tratamiento dirigidos a infecciones causadas por patógenos. (2)

La terapia de erradicación de *H. pylori* es la principal estrategia frente a este patógeno. Esta consiste en la asociación de un inhibidor de secreción gástrica como Omeprazol y dos ATMs, Claritromicina y Amoxicilina, como terapia de primera línea. Sin embargo, el principal determinante en el fracaso del tratamiento de dicha infección se encuentra asociado a la resistencia antimicrobiana. Resistencia que aumenta debido al uso continuo e inapropiado de estos agentes terapéuticos. (18)

En consecuencia, se promueve una disminución de las tasas de erradicación de *H. pylori*, un aumento de la recurrencia de infección debida a la incompleta erradicación del patógeno, y el incremento de incidencia de casos de cáncer gástrico, haciendo necesaria la búsqueda de nuevos compuestos que haga frente a este problema de salud global. (19)

Por otro lado, la naturaleza contiene una vasta diversidad de compuestos bioactivos con potenciales beneficios terapéuticos, entre ellos los venenos de hormigas son fuente de moléculas antimicrobianas. Entre estas moléculas los AMP han demostrado una potente actividad y selectividad de espectros frente a diversos microorganismos. (10)

Es así que Bicarinalina, un nuevo AMP aislado a partir del veneno de hormigas pertenecientes a la especie *Tetramorium bicarinatum*, presentaría una actividad frente a un panel de cepas caracterizadas de *H. pylori* aisladas de pacientes

peruanos, permitiendo evaluar y comparar la actividad de nuevos AMPs sobre este patógeno como una futura alternativa que brinde solución a los problemas de resistencia antimicrobiana.

III. JUSTIFICACIÓN

La infección por *H. pylori* se considera una de las causas principales de riesgo de adenocarcinoma de estómago, atribuyéndose como un problema a escala mundial. En nuestro medio la prevalencia de cáncer gástrico está aumentando. Diferentes estudios muestran que la cura permanente no siempre es posible, principalmente en los países en desarrollo, cuya frecuencia de recurrencia de infección es muy común. Esto podría sugerir una elevada tasa de resistencia antimicrobiana cuya consecuencia directa es el fracaso de la terapia de erradicación a mediano plazo y el incremento a largo plazo de nuevos casos de cáncer gástrico y enfermedades asociadas.

La erradicación de la infección por *H. pylori* tiene el potencial de reducir el riesgo de aparición de cáncer de estómago. De este modo, las actuales recomendaciones de la terapia de erradicación según el cuarto consenso Maastricht consideran la elección de ATMs para el desarrollo de protocolos más idóneos en base a las tasas de resistencia antimicrobiana observadas en una población.

La resistencia a los ATMs es un problema de salud global que afecta principalmente las estrategias terapéuticas frente a patógenos emergentes como *H. pylori*, condicionando al fallo terapéutico en su erradicación y disminuyendo las alternativas de antimicrobianos empleados en su tratamiento.

Por lo cual es necesario evaluar la actividad de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana que presenten potenciales beneficios dirigidos a erradicar *H. pylori* y brinden soluciones a los problemas asociados a la resistencia antimicrobiana. De este modo el presente estudio pretendió evaluar la actividad antimicrobiana de un

nuevo péptido aislado de *Tetramorium bicarinatum* sobre cepas caracterizadas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de un nuevo péptido aislado de *Tetramorium bicarinatum* sobre cepas caracterizadas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes dispépticos peruanos.

4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos mediante el método de Microdilución en caldo, PCR-RFLP y secuenciamiento.
- Determinar la CMI de Bicarinalina sobre cepas caracterizadas de *H. pylori* mediante el método de Microdilución en caldo.
- Determinar la CC₅₀ de Bicarinalina sobre la línea celular murina RAW 264.7 y la línea celular gástrica NCI-N87.
- Determinar la CI₅₀ de Bicarinalina sobre adhesión de *H. pylori* sobre la línea celular gástrica NCI-N87.

V. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

5.1. *Helicobacter pylori*

Los estudios que permitieron la identificación de la bacteria *H. pylori* se originaron a finales del siglo XX. Diversas observaciones demostraron la presencia de microorganismos de morfología espiral en sedimentos de lavados de estómago a partir de necropsias de humanos y biopsias gástricas de pacientes con ulceraciones y cáncer de estómago. Estos hallazgos sugirieron la idea de estos microorganismos como patógenos gástricos. La dificultad para relacionar el papel de la bacteria espiral con la patología gástrica humana era el no poder cultivar el microorganismo del estómago. En 1983 B.J. Marshall y J.R. Warren lograron cultivar y aislar *H. pylori*, una bacteria microaerófila de lento crecimiento mediante cultivo de tejido de mucosa estomacal. Este microorganismo inicialmente fue denominado *Campylobacter pylori* y posteriormente clasificado dentro del género *Helicobacter*, el cual se conforma actualmente de al menos 23 especies provenientes de tejidos gástrico, intestinal o enterohepáticos de diversos mamíferos. (20)

El descubrimiento de esta bacteria inició estudios para evaluar su relación con enfermedades gastrointestinales y capacidad de colonizar el epitelio gástrico ocasionando una infección crónica asociada a la respuesta inflamatoria e inmune por su hospedero. Estos estudios definieron a la gastritis como una de las principales consecuencias generadas por *H. pylori*. (21) En 1994 la OMS mediante IARC declaró que *H. pylori* juega un rol causal en la cadena de acontecimientos que conllevan a malignidad, refiriéndose al adenocarcinoma y linfoma de estómago, catalogando a *H. pylori* como carcinógeno tipo I. (2, 19)

5.1.1. Morfología

H. pylori es un bacilo Gram negativo, curvado o espiral y microaerófilico que mide de 2.5 μm a 3.5 μm de longitud y de 0.5 μm a 1.0 μm de diámetro. Es una bacteria de crecimiento lento y sus colonias pueden ser observadas entre 5 a 7 días de cultivo en medios sólidos. Presenta superficie lisa recubierta con un glicocálix de hasta 40 nm de espesor, y un penacho de 4 a 6 flagelos unipolares que emergen de sus extremos. Sus flagelos miden 2.5 μm de longitud y alrededor de 30nm de grosor con un distintivo bulbo terminal. (22, 23) En ciertas circunstancias, *H. pylori* podría presentar una transición de su típica forma bacilar espiralada a una forma cocoidal, la cual es metabólicamente activa pero inviable para cultivarse *in vitro*. (24)

5.1.2. Factores de Virulencia

H. pylori presenta diversos componentes que le permiten colonizar y prolongar su permanencia en el tejido gástrico. La heterogeneidad genética de sus cepas resulta en una variación de la composición de sus factores de virulencia, implicando una vía multifactorial en la patogénesis de la infección. (25, 26)

Los flagelos de *H. pylori* permiten al microorganismo movilizarse en la mucosa gástrica contrarrestando el peristaltismo, permitiéndole introducirse a través de la capa de mucina secretada por las células superficiales de la mucosa, para alcanzar la superficie epitelial y escapar del ambiente ácido del estómago. (27) Posteriormente su adherencia es un requisito indispensable para la colonización de la mucosa estomacal. Esta adherencia es facilitada por la presencia de proteínas de membrana BabA y SabA, que le permite a *H. pylori* interactuar con los antígenos de superficie de las células gástricas. (28-30)

Por otro lado, los efectos agresivos del entorno luminal gástrico ácido pueden ser contrarrestados por la presencia de la enzima ureasa, que aumenta el pH del microambiente facilitando la colonización del epitelio gástrico por *H. pylori*. (31, 32)

Otros factores de virulencia se asocian a VacA, citotoxina que promueve la vacuolización en la mucosa epitelial y con capacidad apoptótica. Los polimorfismos del gen *vacA* presentan los subtipos s1a, s1b, s1c y s2; y los genotipos m1 o m2. Los alelos s1m1 y s1m2 se correlacionan con la promoción de úlcera péptica y adenocarcinoma debido a su mayor actividad vacuolizante, mientras que el genotipo s2 se presenta con mayor frecuencia en pacientes con gastritis. (33-35)

Durante el proceso de infección por *H. pylori*, *cagPAI* la cual contiene al gen *cagA* juega un importante rol en el desarrollo de gastritis atrófica, úlcera péptica y cáncer gástrico asociado a cepas *cagA*⁺. (36-39) Existe una asociación significativa entre la presencia de los genes *cagA* y *vacA*, de modo que las cepas *cagA*⁻ rara vez expresan el genotipo *vacA* s1. Las cepas de *H. pylori* pueden ser divididas como tipo I *cagA*⁺/*vacA*⁺ y cepas tipo II *cagA*⁻/*vacA*⁻. Las cepas tipo I son mucho más virulentas observándose en pacientes con úlcera péptica y cáncer gástrico, mientras que las cepas tipo II no se encuentran asociadas con patologías gástricas citotóxicas. La expresión de CagA se ha considerado como un marcador de la presencia de la isla de patogenicidad y es una de las proteínas más inmunogénicas de *H. pylori*. (40)

5.1.3. Epidemiología

La infección por *H. pylori* presenta una prevalencia mundial mayor al 50% de la población mundial. En los países en desarrollo las tasas de infección alcanzan valores del 80 a 90%, porcentajes bastante mayores respecto a países desarrollados (10-50%). (41, 42)

En Europa, las tasas de infección son menores en países del Norte que del Sur y Este del continente. En los Países bajos se reportan valores de prevalencia de 32% con un 28% de cepas *CagA*⁺. En Portugal la prevalencia de infección alcanza valores de 84% con un 61% de cepas positivas a *CagA*, con tasas de incidencia de 3.6/100 personas-año, considerándose los valores más altos de prevalencia en Europa. Similares valores se reportan en Turquía cuya prevalencia alcanza un 82.5%. (43, 44) Las tasas de prevalencia en Asia oscilan en un rango de 54% a 76% de infección. En Estados Unidos la infección presenta una incidencia de 0,5/100 personas-año, con una prevalencia del 1% para menores de 10 años y un 37.9% en adultos, considerando que en afroamericanos y latinos de ese país, la infección se presenta a corta edad y la transmisión entre parientes es alta. México muestra una prevalencia de 52.2%. (1)

En Perú en el intervalo del año 1983 al año 2008 las tasas de infección en la población de bajo nivel socioeconómico han permanecido invariable; mientras que en los estratos socioeconómicos medio y alto se ha observado una disminución sostenida de 78% a 47%. Esta variación ha ido acompañada de una reducción significativa de los casos de úlcera gastroduodenal y adenocarcinoma, hecho posiblemente ligado a un mejor acceso de recursos. (45, 46)

La predisposición racial no es un factor de riesgo de infección en Perú entre pobladores peruanos y japoneses residentes del mismo nivel socioeconómico. (47)

Los pobladores peruanos de diferentes zonas geográficas no presentan diferencias en sus tasas de infección entre pobladores de la costa, sierra y selva del mismo nivel socioeconómico. Sin embargo, los pobladores de la altura presentan signos de gastritis más severos comparados con los del nivel del mar, relacionada a una respuesta aguda de la infección por *H. pylori* en la altura. (45, 48)

Es de considerar que la infección por *H. pylori* está relacionada principalmente con factores socioeconómicos y factores de residencia, mostrando una asociación directa de riesgo de infección en sujetos con bajos ingresos familiares, residentes de zona rurales y de bajo disposición de recursos. (49)

La ruta de transmisión de la infección por *H. pylori* es aún incierta. Considerando a la transmisión interpersonal como una principal ruta, así como la transmisión ambiental a partir de recursos de agua potable contaminada. La transmisión parental ha sido frecuentemente reportada, observando mayor frecuencia en individuos cercanamente emparentados y habitantes de una misma residencia. (50) Un importante mecanismo de transmisión, principalmente de madres a hijos, es mediante el uso de utensilios alimenticios comunes. (51, 52)

En el Perú, la vía fecal-oral sería un mecanismo importante de transmisión de *H. pylori*. Klein et al (53), reportaron que el agua de la central de procesamiento la Atarjea responsable de la distribución de agua a la ciudad de Lima, presenta material genético de la bacteria y que aquellos que la consumían presentaban un riesgo de infección. Adicionalmente, Hulten et al (54), reportaron una mayor

resistencia de cepas de *H. pylori* al tratamiento con cloro respecto a coliformes comunes, permaneciendo viable en el agua por varios días y favoreciendo su transmisión.

La recurrencia de infección tras el éxito de erradicación suele ser un evento poco frecuente que abarca tanto la recrudescencia de la infección y la reinfección. Yan et al (55), realizaron una revisión sistemática en adultos y un tiempo mínimo de seguimiento de 6 meses, abarcando 16 827 pacientes, reportando tasas de recurrencia de infección de 2.8/100 pacientes-año e indicando que las áreas de bajo desarrollo socioeconómico muestran una alta probabilidad de recurrencia de infección. En Corea, Kim et al (56), evaluaron las tasas de reinfección durante un periodo de seguimiento de 37 meses, reportando valores de 3.5/100 pacientes-año. Estudios realizados en Latinoamérica reportan altas tasas de recurrencia de infección. Morgan et al (57), reportaron índices de recurrencia de infección por *H. pylori* de 11.5/100 pacientes-año, esta evaluación involucró a 7 países latinoamericanos en un seguimiento de 12 meses finalizada la terapia de erradicación.

La recurrencia de infección en Perú, comparado con lo observado a nivel global, afecta principalmente a pobladores de bajo nivel socioeconómico observándose tasas de recurrencia de 73%. Soto et al (58), reportaron que finalizado el esquema triple de tratamiento en pobladores de este estrato socioeconómico, se observan tasas de éxito de erradicación de 93%, con porcentaje de recaída de 30% a los 18 meses. De los cuales el 20% se deberían a recurrencia de la infección y el 80% reinfección.

5.1.4. Patogénesis

La adquisición de *H. pylori* inicia, en la mayoría de casos, en la niñez. Estableciéndose en la mucosa gástrica y persistiendo a través de los años. (59) La historia natural de la enfermedad presenta diferentes escenarios clínicos: infección aguda, gastritis crónica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y cáncer gástrico. (20, 60)

Una de las principales consecuencias de la infección por *H. pylori* es la úlcera péptica. Consiste en la lesión de la mucosa epitelial que protege al estómago de la acción del ácido gástrico y de enzimas. Localizadas principalmente en la curvatura menor gástrica y en la porción proximal del duodeno. El riesgo de ulceración gástrica entre las personas infectadas con *H. pylori* es de 10% a 15% y la prevalencia de infección por *H. pylori* en pacientes con úlcera de duodeno es superior al 90% y entre el 70% a 80% en la úlcera gástrica. (61)

Adicionalmente, la cascada de eventos que desencadena la infección establece la evolución a adenocarcinoma gástrico. Sin embargo, no es posible identificar a aquellos pacientes asintomáticos infectados con *H. pylori* que presenten alto riesgo de promoción de cáncer condicionándolos al desarrollo de padecimientos severos. Las tasas de infección entre pacientes con adenocarcinoma gástrico son ligeramente mayores en países en desarrollo (60%) con respecto a lo observado en países desarrollados (53%). En un estudio multicéntrico en 13 países de Europa se encontró que el riesgo de desarrollo de cáncer gástrico es 6 veces mayor en poblaciones infectadas, en comparación con poblaciones que no presentan la infección. Aproximadamente, el 1% de los pacientes infectados con *H. pylori*

desarrollarán cáncer, detectándose con mayor frecuencia en los estadios tempranos de la malignidad. (20, 62)

5.1.5. Diagnóstico

El diagnóstico de la infección puede establecerse por técnicas invasivas y no invasivas. Las técnicas invasivas permiten detectar la bacteria en muestras obtenidas por endoscopia o mediante la prueba de la cuerda facilitando su cultivo, evaluación histopatológica y ensayos moleculares. (63)

De este modo, el cultivo microbiológico de *H. pylori* constituye la ruta más específica para establecer el diagnóstico de infección a partir de biopsias obtenidas mediante endoscopías, heces y jugo gástrico. Debido a la dificultad de su aislamiento el éxito de aislamiento promedio de la bacteria oscila entre el 75% al 90%, por lo cual se encuentra limitado a estudios de investigación y a la práctica médica permitiendo desarrollar pruebas de susceptibilidad a agentes utilizados en terapia de erradicación, un factor importante para el efectivo manejo de problemas gastrointestinales causados por este microorganismo y una importante contribución en la patogénesis de la enfermedad mediante el manejo de técnicas de fenotipificación y genotipificación de los aislamientos bacterianos; y estudios de los mecanismos patogénicos *in vitro* e *in vivo*. (64-66)

Por otro lado, las técnicas no invasivas, refieren al estudio de alguna propiedad de la bacteria, tal es el caso de la prueba de urea espirada empleando urea marcada con ^{13}C o ^{14}C , la respuesta inmune específica del hospedero y la presencia de antígenos en saliva o heces. (63, 67, 68)

5.1.6. Tratamiento

Durante la infección crónica el sistema de defensa del hospedero es incapaz de erradicar a *H. pylori*, lo que requiere del uso de ATMs; sin embargo, no existe un tratamiento ideal y la terapia más idónea debe realizarse en base a los patrones de susceptibilidad locales a un esquema de tratamiento establecido en cada paciente. En 1994 el Instituto Nacional de Salud (NIH) en los Estados Unidos organizó el primer consenso sobre *H. pylori* y la úlcera péptica, donde se concluyó que los pacientes con úlcera péptica deberán curarse de la infección utilizando fármacos inhibidores de la secreción ácida combinada con ATMs anti *H. pylori*. Posteriormente la EHPSG organizó una reunión en Maastricht con expertos microbiólogos, médicos generales y gastroenterólogos, cuyos lineamientos recomiendan la terapia de erradicación en pacientes positivos a la infección por *H. pylori* con úlcera duodenal o gástrica, linfoma de bajo grado, gastritis con severos cambios macro o microscópicos y luego de una resección de cáncer gástrico temprano. El tratamiento para la erradicación debe tener una tasa de erradicación superior al 90%, utilizando una terapia triple con un IBP, Claritromicina, y Amoxicilina o Metronidazol por siete días, lo que corresponde con los lineamientos establecidos. En el 2000 el segundo reporte del consenso Maastricht, considera terapias de erradicación de primera y segunda línea. La terapia de primera línea considera el empleo de un IBP como Omeprazol o antagonistas de los receptores tipo 2 de la histamina como RBC y Claritromicina más Amoxicilina o Metronidazol. La segunda línea de tratamiento es una terapia cuádruple con IBP, Bismuto, Tetraciclina y Metronidazol. Ambas terapias deben seguirse por un mínimo de siete días. Actualmente el cuarto y último reporte del consenso

Maastricht recomienda que el régimen de tratamiento debe ser seleccionado acorde a regiones o áreas de baja o alta resistencia a Claritromicina, considerando a las áreas con alta resistencia a Claritromicina porcentajes de resistencia mayores al 20%. El tratamiento de primera línea según este último reporte para regiones de baja resistencia antimicrobiana consiste en la utilización de Amoxicilina y Metronidazol asociada con IBP o el empleo de la terapia cuádruple con Bismuto. De haber un fallo terapéutico, entonces la segunda línea de tratamiento recomienda suplir el Metronidazol por el antimicrobiano Levofloxacino y asociarlo a Amoxicilina más un IBP como terapia triple o terapia cuádruple en presencia de Bismuto. En las regiones de alta resistencia a Claritromicina el tratamiento de primera línea recomienda la elección de la terapia cuádruple con Bismuto y de existir la ausencia de Bismuto iniciar con la terapia secuencial o concomitante, tras su fallo terapéutico se recomienda como segunda línea de tratamiento el empleo de terapia triple conformada por Levofloxacino, Amoxicilina y un IBP. Finalmente, la tercera línea de tratamiento recomendada debería ser elegida en base a pruebas de susceptibilidad mediante cultivo de *H. pylori*. (4, 69, 70)

Actualmente los mejores perfiles en las tasas de erradicación se han observado en los esquemas triples de tratamiento de infección por *H. pylori*. (5) En el Perú se han observado esquemas de tratamiento con tasas de erradicación superiores al 90% con las siguientes combinaciones: Tetraciclina, Furazolidona y Bismuto; y Omeprazol, Amoxicilina y Claritromicina; con porcentajes de erradicación de *H. pylori* de 94.7% y 93% respectivamente. (71)

5.1.7. Resistencia antimicrobiana

Los microorganismos tienen el potencial de adaptarse a diversas condiciones para poder sobrevivir, esta adaptación les conlleva a adquirir mecanismos de resistencia a los ATMs conduciendo a una inactivación del agente terapéutico, modificación de la diana celular o alteración de su permeabilidad. De este modo, la resistencia antimicrobiana condiciona el éxito de la terapia frente a *H. pylori* y es en gran medida responsable de la reducción de las tasas de erradicación. (72)

Con respecto a Claritromicina las tasas globales de resistencia se han incrementado desde 9% en el año 1998 a 17.6% en el año 2008 en Europa y desde 7% en el año 2000 a 27.7% en el año 2006 en Japón. En América Latina las fluctuaciones de resistencia oscilan entre 2.2% a 63.1% entre los años 1996 al 2009, con porcentajes más altos de resistencia en Colombia y el Perú. En el Perú las tasas de resistencia a Claritromicina alcanzaron un 50% para el año 1996 y se generó una disminución a 27% en el año 2006, valores considerados para áreas de alta resistencia, (45, 73) que se atribuye en *H. pylori* a la pérdida de capacidad de interacción del ATM con el ribosoma evitando inhibir la síntesis de proteínas por unión a la subunidad ribosomal 23S. Los cambios observados en la horquilla del dominio V del ARNr 23S asociadas con la resistencia a Claritromicina son debidos a mutaciones puntuales en la región que codifica para la peptidiltransferasa. Estas mutaciones en el gen de ARNr 23S incluyen transiciones de adenina a guanina en las posiciones 2142 y 2143, y una transversión de adenina a citocina en la posición 2142, mostrando una prevalencia de 69.8%, 11.7% y 2.6% entre cepas resistentes. (74)

La prevalencia de resistencia a Metronidazol en *H. pylori* ha sido reportada en un rango de 8 a 80% en diferentes países. Observando porcentajes de resistencia superiores al 60%, en países en desarrollo que en países desarrollados. En el Perú se reportan porcentajes de resistencia de 50% a Metronidazol. (48) El Metronidazol es un profármaco que necesita ser activado mediante la reducción de su grupo nitro en el anillo imidazol, esta paso puede ser mediada por las nitrorreductasa RdxA, FdxB y FrxA en *H. pylori*. Diferentes mutaciones que involucran el gen de *rdxA* han sido identificadas en cepas resistentes a Metronidazol, producto de la inserción y delección de transposones, y mutaciones con cambio de sentido y desplazamiento de marco de lectura, las cuales podrían presentarse de forma simultánea. Mutaciones puntuales en *frxA* y *frxB* podrían incrementar la resistencia bacteriana. (75) Adicionalmente, las mutaciones en *rdxA* no son siempre esenciales para la resistencia a Metronidazol. (76) Kwon et al (77), evaluaron la expresión de proteínas involucradas en la activación de Metronidazol incluyendo proteínas tipo ferredoxina como proteínas de unión a ferredoxina tales como POR, FOR, FdxA, FdxB, FldA y RdxA, reportando una disminución significativa de FOR y RdxA en cepas *H. pylori* expuestas a Metronidazol, implicando su contribución en la resistencia por mecanismos ligados al metabolismo del antimicrobiano.

La resistencia de *H. pylori* a Amoxicilina es poco frecuente. En el Perú los porcentajes de resistencia se encuentran entre 1% al 7%. Amoxicilina actúa interfiriendo con la síntesis de peptidoglicano por bloqueo de PBPs. Se ha reportado que múltiples mutaciones en el gen de *pbp1* son la principal razón de resistencia a Amoxicilina, la cual podría incrementar gradualmente con un mayor número de sustituciones. (73) Gerrits et al (78) reportan similares observaciones indicando que

mutaciones en las secuencias conservadas en motivos de PBP1 son responsables de conferir resistencia. Tseng et al (79), investigaron la asociación de betalactamasas en cepas de *H. pylori* resistentes, observando que los altos niveles de resistencia a Amoxicilina se encuentran asociados a su producción y los bajos niveles de resistencia a mutaciones en el gen *pbp1*. Adicionalmente, sustituciones en las porinas HopB y HopC que están presentes en cepas de *H. pylori* resistentes a Amoxicilina, podrían disminuir las concentraciones intracelulares del ATM y evitar su efecto en el sitio activo. (80) La expresión de otras Omp podrían estar relacionadas a la resistencia a Amoxicilina; Godoy et al (81), identificaron cambios en la expresión de Omp35 y Omp32, esto sugiere que el aumento de expresión de porinas estaría involucrado en la resistencia a betalactámicos en cepas de *H. pylori*.

La resistencia de *H. pylori* a fluoroquinolonas ha sido reportada entre 2% al 22% en países de Europa y Asia. En el Perú la resistencia a Levofloxacino resulta infrecuente; sin embargo, el uso inadecuado de fluoroquinolonas condiciona una rápida adquisición de resistencia, por lo que se recomienda reservarse sólo para casos de falla de tratamiento. Levofloxacino ejerce su actividad antimicrobiana por inhibición de la función de la enzima ADN girasa mediante su interacción con la subunidad A, responsable de la escisión y unión del ADN. El ADN girasa es un tetrámero que consiste en 2 subunidades A y 2 subunidades B codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente. Mutaciones puntuales en QRDR de *gyrA* evita la interacción entre el ATM y la enzima; estas mutaciones se reportan en las posiciones C261A, C261G, G271A, G271T y A272G del gen, responsables de generar cambios en los aminoácidos de la posición 87 (Asn a Lys o Tyr) o 91 (Asp a Gly, Asn o Tyr) de la subunidad A del ADN girasa. (73)

5.1.8. Pruebas de susceptibilidad

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana permiten determinar un patrón de sensibilidad o resistencia de microorganismos a un conjunto de agentes ATMs en base a la determinación de la CMI, que se define como la concentración más baja de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación (82); o en base a características genotípicas que involucren la detección de genes responsables de la resistencia antimicrobiana. Existen diversos métodos estandarizados por la CLSI que permiten detectar el grado de susceptibilidad tomando en cuenta el volumen, contenedor, medio, temperatura, pH, fármacos y microorganismos. Sin embargo, el método óptimo para la determinación de la susceptibilidad a ATMs frente a *H. pylori* aún no ha sido establecido. (83) Se ha observado mejores correlaciones de valores de CMI utilizando los métodos de dilución en agar, dilución en caldo y la prueba E-test. (84, 85)

Adicionalmente, la evaluación de la susceptibilidad de *H. pylori* podría basarse en pruebas moleculares que en su mayoría de casos se respaldan en la aplicación de la técnica de PCR y su capacidad de detectar cambios específicos en el genoma de *H. pylori* permitiendo una evaluación mucho más rápida y eficiente de genes involucrados en la resistencia a ATMs. (69)

En los casos de los ATM Claritromicina y Levofloxacino, el bajo número de mutaciones concernientes a sus mecanismos de resistencia antimicrobiana, permiten el empleo de numerosos métodos genotípicos dirigidos al gen de *ARNr* 23S y el gen de *gyrA* respectivamente. (86-89) Por otro lado, los diversos cambios

genéticos que condicionan un fenotipo resistente a Metronidazol y Amoxicilina hacen no recomendable el empleo de técnicas moleculares en la evaluación de susceptibilidad de cepas de *H. pylori*. (73, 74)

5.2. Péptidos antimicrobianos

Las diversas actividades de los productos naturales son reflejo de la composición de sus compuestos bioactivos. Compuestos que han permitido responder a las necesidades de tratamiento en diversas enfermedades, formando la base de la medicina tradicional. (90)

Los compuestos bioactivos podrían ser obtenidos de diversos recursos en los reinos animal y vegetal. Formando parte, en algunos casos, de complejas mezclas de toxinas que se han optimizado en el curso de la evolución permitiendo una mayor selectividad y afinidad a sus dianas celulares en beneficio de la especie, tales como los venenos. (10)

La evolución de estos compuestos bioactivos se encuentra íntimamente relacionada a la constante exposición de los seres vivos a patógenos ya sea a través del contacto, ingesta o inhalación. Ésto favorece el desarrollo de diversos componentes que involucran los mecanismos de defensa del hospedero. Es así que, durante la invasión de un patógeno, diversos compuestos bioactivos tales como los péptidos son constitutivamente expresados e inducidos generando un mecanismo de inmunidad innata antimicrobiana de acción rápida y efectiva. (91)

Los péptidos endógenos con capacidad antimicrobiana incluyen todos aquellos péptidos con capacidad de matar microorganismos e inhibir su crecimiento. Este grupo de moléculas son polipéptidos codificados por genes y ribosómicamente

sintetizados por casi todos los organismos, desde bacterias a plantas y animales. De entre los cuales ciertos AMPs exhiben un estrecho espectro antimicrobiano, mientras que otros muestran excepcionalmente un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, hongos, virus, parásitos y células tumorales. (91, 92)

5.2.1. Clasificación y origen de los AMPs

Los AMPs pueden ser clasificados en cuatro grupos de acuerdo a su origen: 1) insectos, 2) animales, 3) sintéticos y 4) microorganismos que incluyen los genéticamente modificados. Además, el análisis de la estructura tridimensional de estos péptidos mediante técnicas de resonancia magnética nuclear ha permitido un mejor entendimiento de su función pudiendo dividirse en cinco grupos: 1) formadores de hélices α , 2) formadores de hebras o láminas β , 3) ricos en residuos de cisteína, 4) ricos en aminoácidos naturales cargados (histidina, arginina y prolina) y 5) ricos en compuestos de aminoácidos modificados o no naturales. (93)

Adicionalmente, en base a sus potenciales implicancias como agentes terapéuticos los AMPs también se clasifican según su espectro de actividad frente a diversos microorganismos pudiendo dividirse como compuestos con actividad 1) antibacteriana, 2) antifúngica, 3) antiparasitaria, 4) antivírica y 5) antitumoral. (94)

5.2.2. AMPs de insectos

El sistema inmune innato en el insecto presenta factores relacionados con la eliminación de microorganismo invasores, que han demostrado actividad antimicrobiana frente a bacterias, hongos, parásitos y virus. Estos factores se han asociado a la presencia de AMPs que pueden estar presentes de forma constitutiva

o inducible, y juegan un rol de importancia en la respuesta humoral. De este modo, durante la respuesta sistémica a patógenos, los AMPs son sintetizados en estructuras excretoras mesodérmicas, denominados cuerpos grasos, y luego son liberados a la hemolinfa. (95, 96)

Una mejor comprensión de la producción de péptidos por el sistema inmune innato fue desarrollada en un modelo de infección en *Drosophila melanogaster* en respuesta a la invasión de patógenos. Este modelo sugirió que el daño séptico en el insecto rápidamente induce la expresión de los genes de AMPs en las células del cuerpo graso para producir diversos linajes de péptidos denominados drosomicinas, cecropinas, diptericinas, drosocinas, attacinas y metchnikowinas. Por otro lado, los AMPs también podrían estar presentes de forma constitutiva en células epiteliales de tejidos específicos tales como glándulas labiales, glándulas salivares, intestino medio, tráquea, túbulos de Malpighi o en el tracto reproductor del insecto. (94, 97)

Desde el descubrimiento de los primeros AMPs, denominados Cecropinas, aislados a partir de *Hyalophora cecropia* y caracterizados por presentar actividad frente a bacterias, hongos y protozoarios, más de 200 de estos péptidos han sido identificados en varios insectos; (14) tales como las Cecropinas Hinanvina II y SL Moricina aisladas de *Artogeia rapae* y *Spodoptera litura*, la Defensina Acaloleptina (*Acalolepta luxuriosa*), los péptidos ricos en glicina Bactroceína (*Bactrocera dorsalis*) y Armadillidina (*Armadillidium vulgare*); y el péptido II rico en prolina aislado de *Galleria mellonella*.(94)

Por otro lado, en algunos insectos venenosos como las hormigas, los AMPs se han reportado que en las subfamilias *Paraponerinae*, *Ponerinae*, *Amblyoponerinae*,

Dorylinae, Myrmeciinae, Pseudomyrmecinae, Myrmicinae y Ectatomminae. Estos insectos presentan abundantes péptidos de hasta 35 residuos con características citolíticas, insecticidas, hemolíticas y/o antimicrobianas. Se considera que los AMPs que muestran actividad antibacteriana conjunta frente a Gram-positivos y Gram-negativos son muchos más numerosos que aquellos con actividad específica frente a Gram-negativos o Gram-positivos. (10)

5.2.3. Características y modo de acción de los AMPs

Los AMPs son moléculas catiónicas con regiones hidrofóbicas espacialmente separadas, pueden diferir en tamaño, secuencia de aminoácidos y estructuras, que caracterizan el mecanismo de acción propuesto sobre la membrana plasmática. Estos pueden ser agrupados de acuerdo a su origen, estructura y espectro de actividad. (98)

Los AMPs presentan un amplio espectro antimicrobiano y sus características anfipáticas les permiten interactuar con las membranas microbianas a través de una carga negativa neta dando lugar a la desestabilización directa de la superficie de las membranas. Esta acción genera una disrupción de la membrana resultando en la lisis celular, o mediante la formación de poros facilitando el transporte del péptido al interior celular. (99)

Actualmente, se ha descrito cuatro modelos que describen el modo acción de los AMPs: (a) el modelo de poro toroidal, describe como los agregados peptídicos promueven un continuo doblés sobre la monocapa lipídica y los lípidos involucrados adquieren una curvatura positiva generando la formación de un poro en donde alinean tanto los péptidos agregados como las cabezas polares lipídicas;

(b) el modelo tipo tapiz “carpet-like”, en el cual los péptidos actúan como un detergente y cubren la superficie de membrana a manera de un tapiz hasta alcanzar una concentración umbral que supere la proporción péptido-lípido generando una drástica disrupción de membrana mediante agregados estabilizados de forma toroidal; (c) el modelo de barril “barrel-stave”, en el cual un conjunto de hélices anfipáticas oligomerizan y forman un poro transmembrana con residuos hidrofílicos orientados hacia la luz del poro mientras que la superficie hidrofóbica del péptido interactúa con los lípidos de membrana; y (d) el modelo de agregados, en el cual la acción inicial de los péptidos involucra un desplazamiento competitivo de los cationes divalentes asociados a membrana lo que desestabiliza el ensamblado supramolecular y permite el acceso del péptido tanto a la membrana externa e interna de la bicapa. (93, 94)

Es así, que la mayoría de los AMPs interactúan con la superficie de la membrana y generan una perturbación directa provocando lisis y muerte celular por autofagia, necrosis o apoptosis, permitiendo que los componentes del microorganismo eliminado sean empleados en el reclutamiento, activación y promoción de mecanismos inflamatorios. (14)

De otro modo, los mecanismos que involucran la interacción con la membrana facilitan la formación de poros y el acceso intracelular del péptido propiciando su interacción con macromoléculas y organelas intracelulares. Ésto da lugar a efectos pleiotrópicos en las rutas metabólicas y bioenergéticas que activan las reacciones inflamatorias. Se estimulan las células de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa reforzando, inhibiendo o complementando funciones como la quimiotaxis, la apoptosis, la transcripción de genes y la producción de citocinas.

Estos mecanismos generan la eliminación de los microorganismos por una vía de citotoxicidad indirecta. (100-102)

5.2.4. Bicarinalina

Las hormigas constituyen un grupo muy diverso de artrópodos con más de 14 700 especies conocidas y varios miles restantes aún por describir. A pesar de esta diversidad taxonómica, los venenos de hormigas han sido poco estudiados en comparación con otros venenos animales. Los venenos de hormigas son también fuente de recursos de moléculas antimicrobianas. Entre estas moléculas encontramos a los AMPs que han demostrado una potente actividad y selectividad de espectros frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. (14)

Bicarinalina es un nuevo AMP aislado a partir del veneno de hormigas pertenecientes a la especie *Tetramorium bicarinatum* de la subfamilia *Myrmicinae*, presente en hábitats tropicales alrededor del mundo y principalmente en la región oriental de Australia. Contiene 20 aminoácidos y muestra actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus xylosus* en la misma magnitud que la Melitina y otros péptidos antimicrobianos Hymenópteros tales como Pilosulina o Defensina. (16)

En un estudio realizado por Téné et al (103), se reportó la actividad de Bicarinalina frente a cuatro patógenos oportunistas presentes en alimentos, tales como *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter hormaechei*. En este estudio se muestra una mayor potencia de la Bicarinalina comparada con los antimicrobianos Metecilina, Ampicilina y

Tetraciclina, sugiriendo su empleo en el mejoramiento y prevención de la seguridad microbiana en alimentos.

Recientes estudios reportan que la Bicarinalina presenta actividad antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria en una amplia variedad de microorganismos observando particularmente mejores perfiles de actividad sobre *Salmonella* entérica, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas euroginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Leishmania infantum*. Ilustrando su importancia e interés como una nueva molécula bioactiva. (17)

Finalmente, su amplio espectro de actividad antimicrobiana y su baja toxicidad asociada a una débil actividad hemolítica sugiere a Bicarinalina como una nueva molécula o “lead compound” para el desarrollo de agentes antibacterianos dirigido a patógenos emergentes y a los problemas de salud global de resistencia antimicrobiana. (16, 17)

VI. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. Procedimientos y Técnicas

6.1.1. Tipo y diseño de estudio

El presente trabajo de investigación es un estudio descriptivo, el cual constó en evaluar la actividad antimicrobiana de un nuevo péptido “Bicarinalina” aislado de *Tetramorium bicarinatum* sobre cepas caracterizadas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes peruanos afectados con síntomas de dispepsia.

6.1.2. Muestra

6.1.2.1. Obtención del nuevo péptido antimicrobiano “Bicarinalina”

Bicarinalina fue sintetizada en un sistema automatizado Liberty Microwave peptide synthesizer (CEM, Saclay, Francia) a un alto grado de pureza (98.6%) y proporcionada por el equipo de investigadores VacBio EA 4357 de la Universidad de Toulouse, Francia.

6.1.2.2. Obtención de las cepas de *Helicobacter pylori*

El panel de cepas de *H. pylori* se obtuvo a partir de una población de estudio conformada por pacientes reclutados en el SG-CMCH que presentó síntomas de dispepsia y cumplió con los criterios propuestos.

La presencia de dispepsia fue evaluada durante la consulta médica del paciente por el médico responsable en el SG-CMCH. La dispepsia se define como la ocurrencia, durante los 15 días previos a la consulta médica, de 2 o más de los siguientes síntomas: sensación de plenitud, plenitud epigástrica postprandial, sensación de

ardor, acidez, regurgitación, náuseas, vómitos, dolor epigástrico postprandial, eructos que mejoran con la ingesta de alimentos.

A aquellos pacientes que cumplieron con los criterios propuestos se les extrajo mediante procedimiento de endoscopia dos biopsias de tejido gástrico antral. Una de las biopsias fue entregada al SP-CMCH para su evaluación y la segunda biopsia permitió realizar los procedimientos de nuestro estudio. La toma de muestra fue realizada por el especialista responsable en el SG-CMCH tomando en cuenta los cuidados necesarios.

6.1.2.3. Criterios de inclusión

Fueron incluidos en el estudio los pacientes adultos de ambos sexos con diagnóstico de dispepsia, los cuales presentaron indicación de endoscopia y biopsia. Los pacientes firmaron de manera voluntaria el consentimiento informado del estudio aprobado por el CIEH-UPCH.

6.1.2.4. Criterios de exclusión

Se excluyeron del estudio los pacientes que no cumplieron los criterios de inclusión mencionados y aquellos que a pesar de presentar diagnóstico de dispepsia no presentaron indicación de endoscopia y biopsia.

Además, aquellos pacientes que presentaron las siguientes características: Pacientes gestantes, madres lactantes, pacientes con discapacidad física o mental, pacientes con presencia de enfermedades malignas u inmunosupresoras concomitantes, pacientes con historia de cáncer gástrico, enfermedad de ulcera péptica activa, síndrome de Zollinger-Ellison, pacientes con historia de tratamiento con antimicrobianos o antiseoretos gástricos en los 2 meses previos a la endoscopia.

6.1.2.5. Tamaño de muestra

Considerando un estimado de 45% de probabilidad de ser infectado con *H. pylori* entre los pacientes con síntomas dispépticos en el Perú (IC: 95%, α : 0.05), el número mínimo de participantes a ser considerado en el presente estudio fue de 95 pacientes dispépticos. Los cálculos fueron realizados mediante el software EpiInfo™ v7.2 desarrollado por la CDC y recomendado por la OMS (<https://www.cdc.gov/epiinfo/pc/index.html>). (58, 104)

6.1.3. Consideraciones éticas

Los participantes firmaron el consentimiento informado concerniente a los procedimientos a realizar, conforme a la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial, respecto a los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. El protocolo fue aprobado por el CIEH-UPCH, Lima, Perú. (Anexo 01)

6.1.4. Caracterización de las cepas de *Helicobacter pylori*

6.1.4.1. Obtención de tejido gástrico de pacientes dispépticos

Las muestras histológicas fueron obtenidas mediante el procedimiento de endoscopia previamente descrito en el punto 6.1.2.2. Las biopsias se transportaron de forma independiente en 1ml de caldo BHI (BBL®) suplementado con 10% de SFB (Sigma-Aldrich®) y 10% de glicerol purificado Himedia® a 4°C. (105)

Posteriormente, el proceso de extracción, cultivo, aislamiento e identificación microbiológica fue realizado en una cabina de flujo laminar clase II-A2 (Bellco Glass®)

6.1.4.2. Extracción de *Helicobacter pylori* a partir de tejido gástrico

Los tejidos gástricos fueron homogenizados utilizando una malla de disgregación celular de 40µm de diámetro (BD Falcon®), el homogenizado resultante fue sometido a diluciones seriadas de 10⁻¹ y 10⁻²; y posteriormente sembrado sobre placas con Agar sangre (agar BHI suplementado con 10% de sangre desfibrinada de cordero, Anfotericina B (Sigma-Aldrich®) y suplemento selectivo para *Campylobacter* que contiene Vancomicina, Trimetropina y Polimixina B (OXOID®) debidamente rotuladas. El código empleado para rotular fue elaborado en función del número de historia clínica del paciente y la fecha de procesamiento de la muestra (ejm, G3465_04052015). Las placas se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% O₂ y 10% de CO₂ durante 5 a 7 días. Se observó la presencia de pequeñas colonias transparentes que luego fueron repicadas a un Agar sangre fresco. Paralelamente se criopreservó todos los homogenizados de las biopsias aisladas de pacientes utilizando caldo BHI suplementado con 10% de SFB y 10% de glicerol y se almacenó a -70°C. (104)

6.1.4.3. Cultivo y aislamiento de cepas de *Helicobacter pylori*

Las cepas de *H. pylori* extraídas de tejido antral de estómago provenientes de pacientes reclutados en el SG-CMCH fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera de 5% O₂ y 10% de CO₂ y repicadas cada 72 horas en Agar sangre. (106, 107) Durante el proceso de cultivo y crecimiento de las bacterias se realizaron controles de viabilidad como son tinciones *GRAM* para asegurar la presencia de formas espiraladas y las pruebas bioquímicas catalasa, oxidasa y ureasa. Paralelamente se

cultivaron las especies bacterianas correspondientes a los controles positivos y negativos para las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa y ureasa (Anexo 3).

6.1.4.4. Identificación de cepas de *Helicobacter pylori*

Las cepas de *H. pylori* aisladas a partir de los cultivos de homogenizados de biopsias de antro de estómago fueron identificadas mediante cribado microbiológico considerando características de cultivo (colonias translucidas pequeñas, ligeramente hemolíticas), morfológicas (bacterias bacilares curvas o espiraladas gram negativas), y bioquímicas (catalasa, oxidasa y ureasa positivo). Los resultados obtenidos se contrastaron con los reportes histológicos del SP-CMCH. (108). (Anexo 2)

6.1.4.5. Identificación molecular de las cepas de *Helicobacter pylori*

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de un cultivo fresco de cepas aisladas provenientes de muestras gástricas, mediante un kit de purificación de ADN (Thermo Scientific®) acorde con las instrucciones de manufactura. Los cebadores o primers se obtuvieron en base a los reportes dirigidos a una región del gen de *ARNr 23s*, la cual codifica para el dominio V de la subunidad 23S ribosomal donde se ubica la peptidiltransfera y se vincula con la resistencia a Claritromicina. Se consideró como primer forward Hp23-1 [5'-CCACAGCGATGTGGTCTCAG-3'] y primer reverse Hp23-2 [5'-CTCCATAAGAGCCAAAGCCC-3']. (87, 109) El PCR fue desarrollado en un volumen total de 50µl con 100ng de ADN, 400µM de cada dNTP, buffer PCR, 4mM MgCl₂, 0.1µM de cada primer y 1.2U de enzima Maxima Hot StartTaq DNA polimerasa (Thermo Scientific®). (110)

Posteriormente el PCR fue desarrollado bajo condiciones de 30 ciclos a 95°C por 30seg, 57°C por 30seg y 72°C por 1min. Los fragmentos de amplificación obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se realizó la tinción con BrEt y se examinó bajo iluminación UV en un fotodocumentador (Bio-Rad®). Se esperó la amplificación de un fragmento de 425 pares de bases (bp) que fue posteriormente empleado para caracterizar el panel de cepas de *H. pylori*.

6.1.4.6. Criopreservación de cepas de *Helicobacter pylori*

Las cepas de *H. pylori* aisladas e identificadas fueron colectadas mediante una asada completa a partir de una placa de cultivo con Agar sangre correspondiente al segundo repique. Las bacterias colectadas se resuspendieron en 5ml de BHI + 10% SFB al 10% de glicerol. Posteriormente fueron homogenizadas por agitación en vortex y distribuidas en volumen de 1ml en 5 crioviales y almacenados -70°C. (111)

6.1.4.7. Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana sobre cepas de *Helicobacter pylori*.

La prueba de microdilución en caldo permitió determinar la CMI. Se emplearon placas de 96 pozos en donde se evaluaron las cepas aisladas de pacientes y la cepa de referencia ATCC 43504, acorde a las directrices del centro de referencia CLSI. Para ello se utilizó un inóculo de 1×10^7 a 1×10^8 UFC/ml de *H. pylori* equivalente a 02 McFarland en caldo BHI suplementado con 10% de SFB y 1% de IsoVitalex (BBL®). Los ATMs Claritromicina, Metronidazol, Amoxicilina y Levofloxacina (Sigma-Aldrich®) fueron agregados al medio a concentraciones de 0.25 µg/ml - 2 µg/ml, 2 µg/ml - 16 µg/ml, 0.03 µg/ml - 0.24 µg/ml y 0.25 µg/ml - 2 µg/ml

respectivamente. Las cuatro diluciones seriadas para cada ATM se consideraron en base a los puntos de corte recomendados por la EUCAST. (112) Posteriormente se incubaron las bacterias a 37°C en una atmósfera de 5% O₂ y 10% de CO₂, durante 72 horas. Luego del tiempo de incubación las placas fueron examinadas visualmente para determinar la CMI. La CMI se definió como la menor concentración de ATM que muestra una completa inhibición de crecimiento visible en el cultivo. (82) Finalmente la actividad intrínseca de cada ATM sobre el panel de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos fue expresada como CMI₅₀ que se define como la concentración mínima de antimicrobiano que inhibe el crecimiento en el 50% de cepas aisladas. La CMI₅₀ de un ATM fue calculada mediante un análisis de regresión logística Probit de los porcentajes de inhibición acumulados frente a la distribución de las CMIs observadas en las cepas aisladas de *H. pylori* para cada ATM. (113, 114) Las cepas fueron categorizadas sensibles (S) o resistentes (R) según los puntos de corte, Claritromicina: S≤0.25μg/ml, R>0.5μg/ml; Metronidazol: S≤8μg/ml, R>8μg/ml; Levofloxacino: S≤1μg/ml, R>1μg/ml; Amoxicilina: S≤0.12μg/ml, R>0.12μg/ml. recomendados por la EUCAST. (112) Los ensayos fueron realizados por triplicado considerándose los controles de calidad de la CMI de los ATMs sobre la cepa de *H. pylori* ATCC 43504 según las recomendaciones de la CLSI. (115)

Finalmente, mediante la prueba estadística X^2 ($p<0.05$) se evaluó la asociación de las cepas de *H. pylori* sensibles o resistentes para cada ATM sobre las concentraciones de Bicarinalina evaluadas; y, además, sobre su agrupación tomando como punto de corte la CMI₅₀ de Bicarinalina.

6.1.4.8. Detección de mutaciones en el gen de *ARNr 23s* de resistencia a Claritromicina sobre cepas de *Helicobacter pylori*

A partir de los ensayos obtenidos en el punto 6.1.4.5 se desarrolló un análisis de RFLP empleando 10µl de ADN amplificado obtenido mediante PCR. El producto de amplificación fue digerido con 5U de la enzima de restricción *BbsI* para detectar mutaciones puntuales en la posición A2142G o 5U de la enzima *BsaI* para la mutación puntual A2143G y luego incubado a 37°C por 6 horas. El ADN digerido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 70 voltios en 0.5X de buffer TAE (40mM Tris, 20 mM ácido acético, 1mM EDTA, pH 8.0) por 60 min, con tinción de BrEt y fue examinado bajo iluminación UV. Se utilizó 100 bp DNA ladder como marcador de peso molecular. (87)

6.1.4.9. Secuenciamiento de fragmentos de amplificación del gen de *ARNr 23s* de resistencia a Claritromicina.

Los fragmentos de amplificación obtenidos fueron secuenciados por la empresa de servicios McLab en Estados Unidos, mediante el método de secuenciamiento por terminador fluorescente. Los cromatogramas de las secuencias parciales del gen de *ARNr 23s* se editaron en base a la secuencia completa del gen de *ARNr 23s* de *H. pylori* obtenida en Genbank con código U27270.1 y la secuencia parcial de la cepa ATCC 43504 empleando el programa Mega v7 (<http://www.megasoftware.net/>). Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple de secuencias mediante CLUSTAL W. Se consideraron resistentes a Claritromicina las secuencias que mostraron transiciones en la posición A2142G y A2143G, o la transversión en la

posición A2142C. Adicionalmente se realizó la búsqueda de mutaciones puntuales que refieren resistencia a Claritromicina según reportes de otros estudios. (73)

6.1.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Bicarinalina sobre cepas caracterizadas de *Helicobacter pylori*.

La actividad antimicrobiana de Bicarinalina fue evaluada mediante la prueba de microdilución en caldo, la cual permitió determinar la CMI utilizando placas de 96 pozos en donde se evaluó el panel de cepas caracterizadas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos y la cepa de referencia ATCC 43504. Para ello se utilizó un inóculo de 1×10^7 a 1×10^8 UFC/ml de *H. pylori* en caldo BHI suplementado con 10% de SFB y 1% de IsoVitalex, equivalente a 02 McFarland. El péptido AMP “Bicarinalina” fue disuelto en agua tipo I (Mili-Q[®]) y se agregó al medio a partir de una concentración máxima de $3.9 \mu\text{M}$. Posteriormente las bacterias fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% O₂ y 10% de CO₂, durante 72 horas. La CMI fue definida como la menor concentración de Bicarinalina que muestra una completa inhibición de crecimiento visible en el cultivo. (115) Además se realizó el cálculo de la CMI₅₀ (según el punto 6.1.4.7) permitiendo comparar la actividad intrínseca de Bicarinalina respecto a los ATMs de referencia sobre el panel de aislados de pacientes peruanos.

6.1.6. Evaluación de la Citotoxicidad de Bicarinalina

6.1.6.1. Evaluación de la Citotoxicidad de Bicarinalina sobre macrófagos de la línea celular murina RAW 264.7

La evaluación de la citotoxicidad del nuevo péptido antimicrobiano “Bicarinalina” fue realizada mediante la medición de la actividad metabólica de macrófagos

pertenecientes a la línea celular murina RAW 264, permitiendo determinar la Concentración Citotóxica al 50% (CC₅₀) utilizando placas de 96 pozos.

Los macrófagos RAW 264.7 descritos preservados fueron cultivados en medio RPMI 1640 e incubados a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Luego de su adherencia se agregó una solución de tripsina-EDTA 0.05% (Invitrogen®) e incubó por 2 min. Posteriormente los macrófagos fueron ajustados a una concentración de 1x10⁵ macrófagos/ml, colocándose 100µl de la suspensión en cada pozo en una placa de 96 pozos y se incubó por 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación se preparó el ensayo de microdilución en un sistema de tres diluciones seriadas de concentración máxima de 50µM de Bicarinalina y se incubó por 48 horas a 37°C en 5% de CO₂. Finalizadas las 48 horas de exposición se agregó MTT e incubó por 4 horas. La reducción enzimática de las moléculas de MTT por enzimas deshidrogenasas mitocondriales (presentes en las células viables) se evidenció por la formación de una sal de color azul insoluble llamada Formazán. La reacción fue detenida adicionando 100µl de 50% isopropanol (Sigma- Aldrich®)-10% SDS (Sigma-Aldrich®) e incubado por 30 minutos, bajo agitación a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó la lectura de la absorbancia a 570 nm en el lector de placas Chameleon-Hidex®.

Posteriormente la CC₅₀ fue obtenida mediante un análisis de regresión logística Probit en base al cálculo del porcentaje de células viables (% Células viables) utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Células viables} = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs experimental}) \times 100}{\text{Abs control}}$$

Mediante el cálculo de la CC_{50} y de la CMI_{50} de Bicarinalina se calculó el índice de selectividad (IS) de Bicarinalina ($IS = CC_{50}/CMI_{50}$). (116)

6.1.6.2. Evaluación de la citotoxicidad de Bicarinalina sobre la línea celular gástrica NCI-N87

La línea celular gástrica NCI-N87 fue cultivada en medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, 1% de IsoVitalax, 1% de penicilina y estreptomina a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO_2 . Luego de 48 horas de incubación se obtuvo una capa monocelular que fue removida con 5ml de solución de tripsina-EDTA 0.05% por 5min a 37°C, la tripsina fue inactivada mediante adición de 10ml de medio RPMI 1640 suplementado con SFB. Posteriormente el homogenizado celular fue centrifugado a 350G por 5min a 20°C. Se preparó una suspensión celular a una concentración de 2×10^5 células/ml. La viabilidad celular fue evaluada mediante ensayo con azul de tripano. La suspensión celular fue colocada en placas de 96 pozos para su posterior empleo.

La evaluación de la citotoxicidad fue realizada en una placa de 96 pozos de fondo plano. Se colocó un inóculo de 1×10^6 células/ml de suspensión celular tripsinizada en cada pozo. Se colocaron sobre las células obtenidas en los pozos diluciones seriadas de Bicarinalina a partir de una concentración máxima de 1.7 μ M. Posteriormente se incubaron las células durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO_2 . Se utilizó como control un sistema al 0.5% de fenol. Finalmente, cumplido el tiempo de incubación se añadió a cada pozo 50 μ l de XTT y se incubó a 37°C por 2 horas. La CC_{50} fue obtenida en base al cálculo de

porcentaje de células viables mediante la lectura de absorbancias a 450 nm en el lector de placas Chameleon-Hidex[®] (según 6.1.6.1).

Mediante el cálculo de la CI_{50} de Bicarinalina (según 6.1.7) se calculó el índice de selectividad (IS) de Bicarinalina ($IS = CC_{50}/CI_{50}$). (116)

6.1.7. Evaluación de la inhibición de adhesión de *Helicobacter pylori* sobre la línea celular gástrica NCI-N87

A partir de un cultivo en Agar sangre de la cepa de *H. pylori* ATCC 43504, se realizó una suspensión en caldo BHI suplementado con 10% de SFB, 1% de IsoVitalex a una concentración de 1×10^8 bacterias/ml. A 10ml de esta suspensión se añadió 30 μ l de solución de adenina tritiada (1 μ Ci) y se incubó por 48 horas a 37°C en una atmosfera de 5% O₂ y 10% de CO₂. Para eliminar los remanentes no incorporados en el cultivo, las bacterias fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 2500G por 10 min a 5°C.

La evaluación de la inhibición de adhesión fue realizada en una placa de 96 pozos previamente preparada colocando una suspensión de bacterias tratadas de 1×10^8 bacterias/ml (según 6.1.6.2). Luego las células fueron tratadas con diluciones seriadas de Bicarinalina a partir de una concentración máxima de 1.7 μ M durante 2 horas de contacto a 37°C, posteriormente las bacterias no adheridas fueron lavadas con PBS. Al finalizar el tratamiento las células gástricas recibieron 500 μ l de solución lisis (0.1% de SDS en NaOH 5M). La medición de la radioactividad fue realizada mediante un sistema de recuento de centelleo en fase líquida.

Los porcentajes de inhibición de adherencia (% Inhibición) fueron calculados mediante el recuento por minuto (RPM) de los grupos, empleando la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(RPM \text{ control} - RPM \text{ experimental}) \times 100}{RPM \text{ control}}$$

La concentración necesaria de Bicarinalina para inhibir la adherencia del 50% de bacterias correspondientes a la cepa de *H. pylori* ATCC 43504 sobre la línea celular NCI-N87 fue expresada como CI₅₀, la cual fue calculada mediante un análisis de regresión logística probit.

6.1.8. Análisis de datos

El número de pacientes con síntomas de dispepsia positivos para *H. pylori* por el método de cultivo fue reportado como porcentaje de prevalencia. La actividad antimicrobiana de los ATM de referencia y Bicarinalina fue reportada en base a la CMI₅₀ obtenida sobre el panel de cepas caracterizadas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos. La evaluación de la susceptibilidad a antimicrobianos sobre las cepas caracterizadas fue designada como sensible o resistente según los reportes de punto de corte recomendados por la EUCAST. (112) El análisis por PCR-RFLP fue reportado en base a los patrones de restricción obtenidos y mediante fotodocumentador de geles indicando el patrón de restricción correspondiente. Las secuencias parciales del gen de *ARNr 23s* se reportaron indicando los cambios de las secuencias primarias en relación a la cepa de referencia ATCC 43504 y la secuencia completa del gen de *ARNr 23s* con código U27270.1 obtenida del Genbank. Los valores fueron reportados como medidas de tendencia central, y la asociación entre variables fue evaluada mediante la prueba de X^2 considerando un

valor de $p < 0.05$ para un valor estadísticamente significativo o diferente, y un valor de $p > 0.05$ para un valor estadísticamente no significativo o no diferente. (117)

VII. RESULTADOS

7.1. Caracterización de las cepas de *Helicobacter pylori*

7.1.1. Obtención de tejido gástrico de pacientes dispépticos

Se obtuvo 190 biopsias de antro tomadas mediante procedimiento de endoscopia de un total de 95 pacientes reclutados en el SG-CMCH. Cada biopsia fue colocada rápidamente en 1 ml de BHI suplementado con 10% de SFB y al 10% de glicerol a 4°C para su transporte.

7.1.2. Extracción de *Helicobacter pylori* a partir de tejido gástrico

Del total de 95 biopsias gástricas procesadas de forma independiente se logró la extracción de *H. pylori* a partir de 44 biopsias obteniéndose 44 cepas. Tomando en cuenta el diagnóstico por cultivo, los pacientes peruanos presentaron una prevalencia de infección de 46.3% (44/95). (Tabla 1)

7.1.3. Cultivo y aislamiento de cepas de *Helicobacter pylori*

Los 44 cultivos positivos para *H. pylori* fueron extraídos a partir de biopsias de antro y cultivados a 37°C en una atmósfera de 5% O₂ y 10% de CO₂. Estos cultivos se repicaron en intervalos de 72 horas lográndose aislar, cultivar y criopreservar las 44 cepas de *H. pylori*. Posteriormente los resultados fueron contrastados mediante diagnóstico por histología observándose 47 casos positivos. Estos resultados mostraron una tasa de aislamiento del 93.6% (44/47).

Tabla 1. Distribución del total de pacientes dispépticos evaluados según cultivos positivos y cepas aisladas.

| | Número de pacientes dispépticos | Prevalencia de Infección (%) | Tasa de aislamiento (%) |
|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Total de casos evaluados | 95 | | |
| Cultivos positivos ^a | 44 | 46.3 | |
| Cepas aisladas ^b | 44 | | 93.6% |
| Histología positivos | 47 | 49.5 | |

a: Cultivos positivos con presencia de H. pylori identificadas según punto 6.1.4.4. a partir de muestra clínica.

b: Cepas de H. pylori aisladas, cultivadas y criopreservadas.

7.1.4. Identificación de cepas de *Helicobacter pylori*

A partir de las muestras clínicas obtenidas se identificó a las cepas extraídas mediante la observación de colonias translúcidas pequeñas ligeramente hemolíticas (Figura 1). La observación microscópica permitió visualizar bacterias Gram negativas con morfología bacilar curva típica de las cepas de *H. pylori* (Figura 2). Además, se evaluaron las características bioquímicas de las cepas dando como resultado catalasa positivo, oxidasa positivo y ureasa positivo (Figura 3).

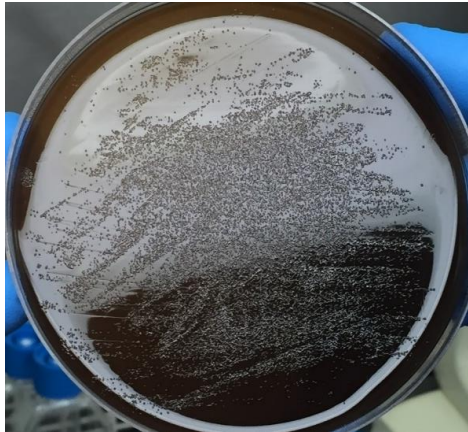


Figura 1. Placa de Agar sangre con presencia de colonias de *H. pylori*.

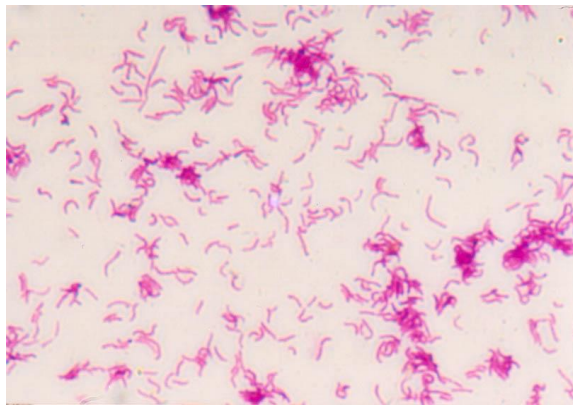


Figura 2. Visualización microscópica de cepas de *H. pylori*, Tinción Gram (1000X).

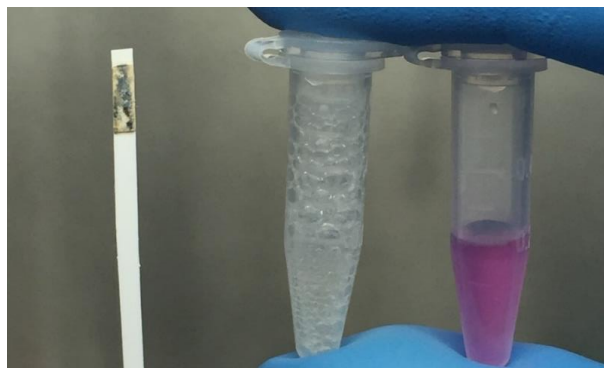


Figura 3. Pruebas bioquímicas Oxidasa, Catalasa y Ureasa positivo de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos.

7.1.5. Identificación molecular de las cepas de *Helicobacter pylori*

Mediante el método de PCR convencional dirigido al gen de *ARNr 23s* de *H. pylori* se pudo amplificar un fragmento de 425 bp. Se logró detectar y confirmar la presencia de *H. pylori* en las 44 cepas aisladas a partir de pacientes dispépticos peruanos (Figura 4).

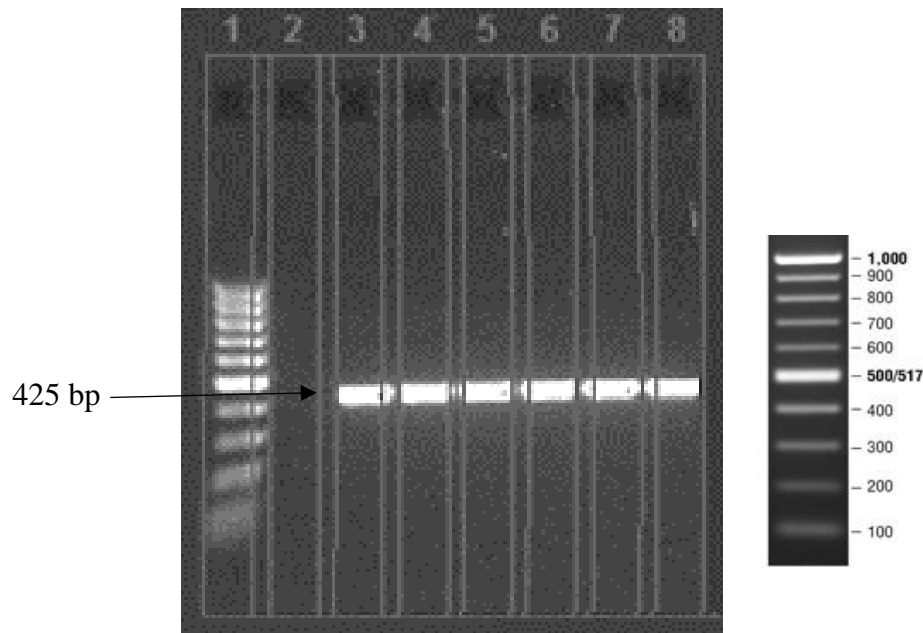


Figura 4. Detección de fragmentos de 425 bp correspondientes al gen de *ARNr 23s* de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos. Carril 1: Marcador de ADN de 100bp; Carril 2: Blanco; Carril 3-8: Cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes.

7.1.6. Criopreservación de cepas de *Helicobacter pylori*

Mediante el empleo del glicerol al 10% como agente crioprotector se logró criopreservar por quintuplicado 44 cepas de *H. pylori* aisladas e identificadas.

7.1.7. Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana sobre cepas de *Helicobacter pylori*

Se observó que la resistencia antimicrobiana de las cepas de *H. pylori* a Claritromicina, Levofloxacino, Metronidazol y Amoxicilina fue de 52.3%, 45.5%, 29.6% y 4.6% respectivamente. Los valores de la CMI de los ATMs de referencia frente a la cepa de *H. pylori* ATCC 43504 estuvieron acorde a los reportado por la CLSI. (Tabla 2) (Tabla 3).

Tabla 2. CMIs de los ATMs de referencia evaluados sobre la cepa de *H. pylori* ATCC 43504.

| ATMs de referencia | CMI (µg/ml)* | CMI (µg/ml) CLSI M45-A2 |
|---------------------------|---------------------|------------------------------------|
| Claritromicina | 0.015 | 0.015 – 0.125 |
| Metronidazol | 64 | 64 -256 |
| Levofloxacino | 0.125 | 0.064 – 0.5 |
| Amoxicilina | 0.015 | 0.015 – 0.125 |

*MICs obtenidos como control de calidad sobre la cepa ATCC 43504 en nuestro estudio.

Tabla 3. Distribución de los porcentajes de susceptibilidad antimicrobiana según los ATMs de referencia evaluados en las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos.

| ATM de referencia | Susceptibilidad antimicrobiana (%)* | |
|-------------------|-------------------------------------|--------------|
| | Resistente | Sensible |
| Claritromicina | 52.3 (23/44) | 47.7 (21/44) |
| Levofloxacino | 45.5 (20/44) | 54.5 (24/44) |
| Metronidazol | 29.6 (13/44) | 70.4 (31/44) |
| Amoxicilina | 4.6 (2/44) | 95.4 (42/44) |

n: 44 cepas *H. pylori*

*Puntos de corte según EUCAST: Claritromicina: $S \leq 0.25 \mu\text{g/ml}$, $R > 0.5 \mu\text{g/ml}$; Metronidazol: $S \leq 8 \mu\text{g/ml}$, $R > 8 \mu\text{g/ml}$; Levofloxacino: $S \leq 1 \mu\text{g/ml}$, $R > 1 \mu\text{g/ml}$; Amoxicilina: $S \leq 0.12 \mu\text{g/ml}$, $R > 0.12 \mu\text{g/ml}$.

7.1.8. Detección de mutaciones en el gen de *ARNr 23s* de resistencia a claritromicina sobre cepas de *Helicobacter pylori*

Se observó que del total de cepas de *H. pylori* que muestran fenotipo resistente a Claritromicina solo el 43.5% (10/23 cepas) mostraron un patrón de restricción. De las 10 cepas con un patrón de restricción se observó que el 70% (7/10) muestran transiciones en la posición A2142G y el 30% (3/10) en la posición A2143G. (Figura 5) (Tabla 3)

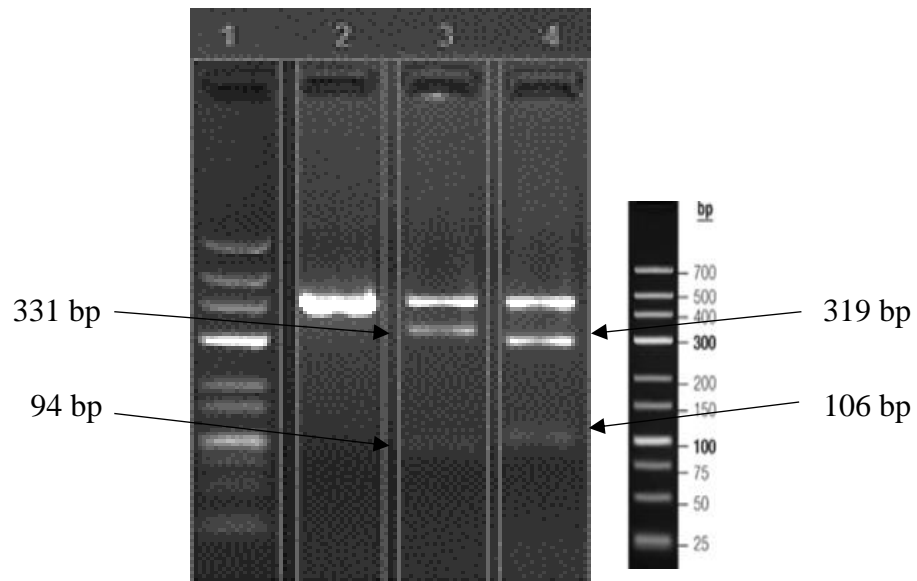


Figura 5. Patrones de PCR-RFLP que indican la presencia de mutaciones en un segmento del gen de *ARNr 23s* de resistencia a Claritromicina en las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos. Carril 1: Marcador de ADN de bajo peso molecular; Carril 2: fragmento de 425 bp; Carril 3: Digestión con *BbsI*; Carril 4: Digestión con *BsaI*.

Tabla 4. Distribución de las mutaciones puntuales detectadas mediante PCR-RFLP de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos.

| Fenotipo susceptible a | Porcentaje | Mutación | Porcentaje (%) |
|-------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| Claritromicina | (%) | puntual | |
| Resistente | 52.3 (23/44) | A2142G | 70 (7/10) |
| | | A2143G | 30 (3/10) |
| Sensible | 47.7 (21/44) | - | - |
| | | - | - |

7.1.9. Secuenciamiento de productos de amplificación del gen de *ARNr* 23s de resistencia a Claritromicina

Se confirmó la presencia de las mutaciones en las posiciones A2142G y A2143G observadas en el análisis de PCR-RFLP. Además, se observó mutaciones adicionales en las posiciones T2182C, C2195T. Finalmente se reporta que el 34.8% de los fenotipos resistentes a Claritromicina de las cepas de *H. pylori* aisladas presentan genotipo nativo para la secuencia parcial del gen de *ARNr* 23s evaluada (Figura 6) (Tabla 5)

| | | |
|------------|------|--|
| U27270.1 | 2111 | GTGAAAATTC CTCCTACCCG CGGCAAGACG GAAAGACCCC GTGGACCTTT |
| ATCC 43504 | | GTGAAAATTC CTCCTACCCG CGGCAAGACG GAAAGACCCC GTGGACCTTT |
| JG05 | | GTGAAAATTC CTCCTACCCG CGGCAAGACG GAAAGACCCC GTGGACCTTT |
| JG08 | | GTGAAAATTC CTCCTACCCG CGGCAAGACG GAAAGACCCC GTGGACCTTT |
| JG12 | | GTGAAAATTC CTCCTACCCG CGGCAAGACG GAAAGACCCC GTGGACCTTT |
| | | ***** |
| U27270.1 | 2161 | ACTACAACCT AGCACTGCTA ATGGGAATAT CATGCGCAGG ATAGGTGGGA |
| ATCC 43504 | | ACTACAACCT AGCACTGCTA ATGGGAATAT CATGCGCAGG ATAGGTGGGA |
| JG05 | | ACTACAACCT AGCACTGCTA ACGGGAATAT CATGCGCAGG ATAGGTGGGA |
| JG08 | | ACTACAACCT AGCACTGCTA ACGGGAATAT CATGCGCAGG ATAGGTGGGA |
| JG12 | | ACTACAACCT AGCACTGCTA ATGGGAATAT CATGCGCAGG ATAGGTGGGA |
| | | ***** |
| U27270.1 | 2211 | GGCTTTGAAG TAAGGGCTTT GGCTCTTATG |
| ATCC 43504 | | GGCTTTGAAG TAAGGGCTTT GGCTCTTATG |
| JG05 | | GGCTTTGAAG TAAGGGCTTT GGCTCTTATG |
| JG08 | | GGCTTTGAAG TAAGGGCTTT GGCTCTTATG |
| JG12 | | GGCTTTGAAG TAAGGGCTTT GGCTCTTATG |
| | | ***** |

Figura 6. Mutaciones puntuales en la posición A2142G, A2143G, T2182C y C2195T de la secuencia parcial del gen que codifica al *ARNr* 23S de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos.

Tabla 5. Distribución de los genotipos observados en las secuencias parciales del gen que codifica al ARNr 23S de las cepas de *H. pylori* resistentes a Claritromicina aisladas de pacientes peruanos.

| Genotipos de ARNr 23S | Porcentaje (%) | Mutaciones | Porcentaje (%) |
|-----------------------|----------------|-----------------|----------------|
| Tipo mutado | 65.2 (15/23) | A2142G | 40 (6/15) |
| | | A2143G | 6.7 (1/15) |
| | | T2182C | 26.6 (4/15) |
| | | C2195T | 6.7 (1/15) |
| | | A2142G + T2182C | 6.7 (1/15) |
| | | A2143G + T2182C | 13.3 (2/15) |
| Tipo nativo | 34.8 (8/23) | - | - |

7.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Bicarinalina sobre cepas caracterizadas de *Helicobacter pylori*

Se observó que la CMI requerida de Bicarinalina para inhibir el crecimiento del 50% de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos fue de 0.86µM. Además, la prueba de X^2 mostró que no existe asociación entre las cepas de *H. pylori* sensibles y resistentes a los ATM y las concentraciones de Bicarinalina evaluadas. La CMI de Bicarinalina frente a la cepa ATCC 43504 fue 3.9µM. (Tabla 6)

Tabla 6. CMI₅₀ de Bicarinalina y ATMs de referencia sobre cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos.

| | ATMs | CMI ₅₀ (μM) (μg/ml) | Rango de MICs (μg/ml) |
|---|----------------|--------------------------------|-----------------------|
| Cepas de <i>H. pylori</i> aisladas de pacientes peruanos | Bicarinalina | 0.86 (2.2) | <0.3 - >10 |
| | Claritromicina | 1.4 (0.5) | <0.25 - >2 |
| | Levofloxacino | 0.94 (0.7) | <0.25 - >2 |
| | Metronidazol | 23.4 (4.0) | <2 - >16 |
| | Amoxicilina | <0.07 (<0.03) | <0.03 - 0.24 |

La CMI de la Bicarinalina en la cepa de referencia de *H. pylori* ATCC 43504 fue de 3.9 μM (10 μg/ml)

7.3. Evaluación de la citotoxicidad de Bicarinalina

7.3.1. Evaluación de la citotoxicidad de Bicarinalina sobre macrófagos de la línea celular murina RAW 264.7

Se determinó que la concentración citotóxica requerida de Bicarinalina que causa la muerte celular del 50% de macrófagos viables fue de 26.8μM. Este resultado permitió obtener un índice de selectividad de 27. (Tabla 7)

7.3.2. Evaluación de la citotoxicidad de Bicarinalina sobre la línea celular gástrica NCI-N87

Se determinó que la concentración citotóxica requerida de Bicarinalina para causar la muerte del 50% células gástricas viables fue mayor de 1.7μM. Este resultado permitió obtener un índice de selectividad de 7. (Tabla 7)

Tabla 7. Evaluación de la citotoxicidad de Bicarinalina en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 y células gástricas NCI-N87.

| Evaluación de citotoxicidad de Bicarinalina | | |
|--|-------------------------------------|--------------------|
| | CC₅₀ (μM) (μg/ml) | IS |
| Macrófagos RAW 264.7 | 26.8 (68.4) * | 31.1 ^a |
| Células gástricas NCI-N87 | >1.7 (4.4) ** | >17.3 ^b |

a: IS = CC₅₀^{*} / CMI₅₀; b: IS = CC₅₀^{**} / CI₅₀

7.4. Evaluación de inhibición de adhesión de *Helicobacter pylori* sobre la línea celular gástrica NCI-N87

Se determinó que la concentración requerida de Bicarinalina para inhibir la adherencia del 50% de cepas de *H. pylori* sobre un modelo de cultivo celular gástrico es menor a 0.098μM. (Tabla 8)

Tabla 8. Concentración inhibitoria media (CI₅₀) de Bicarinalina para la inhibición de la adhesión de *H. pylori* sobre la línea celular gástrica NCI-N87.

| | CI₅₀ (μM) (μg/ml) |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| Células gástricas NCI-N87 | <0.098 (<0.25) |

VIII. DISCUSIÓN

Los venenos de hormigas son una fuente invaluable de recursos que podrían ser establecidos como agentes terapéuticos. Entre estos compuestos bioactivos se pueden encontrar estructuras peptídicas con actividad antimicrobiana, tales como los AMP. (10) La Bicarinalina es un AMP aislado del veneno de la hormiga *Tetramorium bicarinatum* que ha demostrado actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas y parásitos, con el potencial de convertirse en un “lead compound”. (16, 17, 103) Es así, que se evaluó su actividad antimicrobiana frente a un panel de cepas de *H. pylori*, el cual es un patógeno emergente a nivel global y de alta prevalencia en Perú (45-78%). (41, 45)

Durante la primera parte de la investigación se propuso caracterizar las cepas de *H. pylori* a partir de biopsias obtenidas mediante endoscopia de la mucosa gástrica de pacientes peruanos afectados con síntomas de dispepsia.

El procedimiento de obtención de las 44 cepas de *H. pylori* provenientes de pacientes dispépticos (Tabla 1) fue realizado considerando aquellas variables que puedan limitar su recuperación, cultivo y aislamiento, tales como el lugar de toma de muestra en la mucosa gástrica, (118, 119) el transporte de las muestras, (120) el medio de cultivo y las condiciones de incubación. (121-123)

Del mismo modo, a pesar de las exigencias requeridas para mantener la viabilidad de las cepas de *H. pylori*, el empleo de medios de cultivo con adición de suplementos nutritivos predispone a observar la presencia de colonias contaminantes. (122) Es así que el cribado microbiológico abarcó desde las características generales del cultivo hasta las características metabólicas

particulares de este microorganismo. (20) Se observó la formación de colonias pequeñas translucidas, típicas de *H. pylori*, luego de cinco días de incubación. (Figura 1) La tinción Gram permitió reconocer la presencia de bacterias Gram negativas de morfología bacilar curvada (Figura 2) y debido al metabolismo microaerobio de *H. pylori* se las identificó mediante una reacción de óxido-reducción como oxidasa positivo debido a que *H. pylori* emplea al oxígeno como aceptor de electrones durante el proceso de la cadena respiratoria; además, la formación de peróxido de hidrógeno derivado del empleo de oxígeno permitió identificarla como catalasa positivo. Adicionalmente *H. pylori* presenta una enzima responsable de su estabilidad de membrana, metabolismo y virulencia denominada ureasa, esto posibilita su identificación mediante la actividad de esta enzima y su capacidad de degradar la urea, catalogándola como ureasa positivo. (Figura 3) (20, 108)

Para verificar la identidad taxonómica de la bacteria se realizó la identificación molecular de *H. pylori* mediante un PCR convencional. Se observó la amplificación de un fragmento de 425bp del gen de *ARNr 23s* en el total de 44 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes peruanos dispépticos, (Figura 4). Esta región amplificada corresponde a la horquilla del dominio V de la subunidad 23 del ARNr en donde se ubica la peptidiltransferasa. Esta región del gen de *ARNr 23s* es una región conservada en el genoma de *H. pylori* y es un candidato para ser empleado en su detección e identificación; así como los genes *UreA*, *glmM*, *UreC*, *ARNr 16s*, *HSP60* y *VacA*. (124)

Se conoce que la PCR es una herramienta extensamente utilizada por su excelente sensibilidad y especificidad (>95%) comparada con los métodos convencionales;

(125) sin embargo, este rendimiento puede conllevar a riesgos de falsos positivos que podrían depender tanto de la muestra como de la técnica utilizada, los cuales se controlaron mediante el uso de la cepa ATCC 43504 de *H. pylori* como control positivo y la cepa ATCC 25922 de *E. coli* como control negativo; y mediante la evaluación de los primers utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y confirmando su identidad (99.9%) sobre cepas de *H. pylori*. (87, 109, 110)

De este modo, mediante la técnica de cultivo desarrollada, se determinó que la prevalencia de infección por *H. pylori* fue del 46.3% del total de pacientes con síntomas de dispepsia que representan a una población de la CMCH. (Tabla 1) El último reporte de prevalencia a este nivel realizado hace más de una década (año 2002) en una clínica privada de Lima-Perú, reporta valores de prevalencia del 45%.

(45) Estas observaciones que son contrastables con nuestros hallazgos y se respaldan en la asociación directa de riesgo de infección entre poblaciones con características socioeconómicas similares. (49) Por otro lado, se observó que el sexo no es un factor de riesgo de infección por *H. pylori* (mujer: 45.7%; hombre: 47.2%) (Anexo 4). (45, 48)

El diagnóstico de infección del total de pacientes evaluados fue contrastado mediante la prueba histológica, diagnóstico de rutina en la CMCH. Se observó una asociación significativa entre los casos de cultivos positivos y casos de histología positivos. Al comparar el número de hallazgos positivos entre cada técnica observamos una tasa de aislamiento por cultivo del 93.6%. Durante el análisis se observó la presencia de tres casos diagnosticados positivos por la técnica de histología que fueron diagnosticados negativos por la técnica de cultivo. Esta diferencia de resultados entre ambas técnicas corresponde a una baja densidad de

microorganismos presentes en la muestra, que a su vez presentaron una cruz (la menor cualificación) en la evaluación histológica de las biopsias gástricas. (64, 66) (Tabla 1)

Como parte de la caracterización de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos, se procedió a desarrollar pruebas de susceptibilidad a los fármacos de referencia, los cuales se optaron en base a la transición de los antimicrobianos utilizados en los tratamientos de primera línea (Claritromicina/ Amoxicilina o Metronidazol) y segunda línea (Levofloxacino) de la terapia de erradicación. (126, 127) Se observó un aumento en las tasas de resistencia antimicrobiana a Claritromicina y Levofloxacino, respecto a lo reportado entre el año de 1983 y el año de 2008 para Claritromicina (6.7% a 27%) (45, 128) y lo reportado en el año 2011 para Levofloxacino (36.9%), en Perú. (Tabla 3) (129) Este aumento de las tasas resistentes podría estar influenciada por la presión de selección ejercida por macrolidos y quinolonas, (130) antimicrobianos cuyo consumo se ha incrementado en los últimos años (70% respecto a otros antimicrobianos). (131, 132) Además, se ha observado que *H. pylori* podría iniciar su colonización a muy temprana edad en sus hospederos (tres meses de edad). Este hecho generaría un aumento en la carga de exposición a los fármacos. (48, 132)

Se observó que la tasa de resistencia a metronidazol en los pacientes dispépticos evaluados ha disminuido. Este aspecto resaltante se debe en parte a la disminución en la utilización de este fármaco como tratamiento contra *H. pylori* a causa de las altas tasas de resistencia reportadas en años anteriores (>50%). (Tabla 3) (45, 133) Esta reducción de uso de metronidazol disminuye la presión de selección ejercida por el antimicrobiano; además, los costos-beneficios implícitos en los de fenómenos

genéticos que confieren resistencia a metronidazol, (75, 76) y los cambios en las diversas enzimas involucradas en la activación de este profármaco (77) podrían condicionar metabólicamente la presencia de una variante resistente. (134, 135)

De este modo, las tasas de resistencia observadas en los pacientes dispépticos de la CMCH, indican que estos se deben de considerar como una población de alta resistencia a Claritromicina, aspecto clave en la elección de la terapia de erradicación de primera línea de *H. pylori*, según el actual consenso Maastricht. (4)

La importancia de evaluar las tasas de resistencia a Claritromicina se debe también al impacto que esta genera sobre la reducción de la tasa de erradicación de *H. pylori*, considerándose que de iniciar un tratamiento con la terapia triple empírica (Claritromicina/ Amoxicilina y IBP) en presencia de poblaciones resistentes a Claritromicina esta reduciría hasta en un 60% la tasa de erradicación de *H. pylori*. (5)

Es así, que como parte de la caracterización de las cepas de *H. pylori* se procedió a evaluar la susceptibilidad genotípica a Claritromicina, cuya resistencia antimicrobiana es una de las causas más importantes de fracaso terapéutico de la terapia de erradicación de *H. pylori*. (4, 73)

Se realizó un análisis dirigido al gen de *ARNr 23s* mediante la técnica de PCR-RFLP, técnica estandarizada y sugerida para la identificación genotípica de cepas de *H. pylori* resistentes a Claritromicina. Esta técnica permite la detección de mutaciones puntuales (A2142G y A2143G) más frecuentes observadas entre fenotipos resistentes de *H. pylori* (>90%) y que afectan la interacción del macrólido al ribosoma. (73, 86, 87, 136-139) Mediante esta técnica se obtuvo un patrón de

restricción en el 43.5% de los fenotipos resistentes a Claritromicina. Además, se observó que la transición A2142G la mutación puntual de mayor frecuencia. (Tabla 4) Sin embargo, reportes actuales indican cambios en sus frecuencias alcanzando valores similares (54.8%) a lo observado en los pacientes dispépticos de la CMCH. Esto sugiere la importancia de realizar una evaluación en regiones más extensas del gen de *ARNr 23s* que brinden información de nuevas mutaciones involucradas en la resistencia a Claritromicina. (140)

Mediante el análisis del secuenciamiento de las cepas de *H. pylori* fenotípicamente resistentes a Claritromicina se observó la presencia adicional de las mutaciones puntuales T2182C y C2195T. Estas mutaciones puntuales previamente reportadas, (137) pertenecen a un conjunto de mutaciones (A2115G, T2117C, G2141A, G2224A, C2245T, T2889C, C2611A y C2717T) que en la actualidad han sido referidas de conferir resistencia Claritromicina en las cepas de *H. pylori*, (73, 83) que en el caso de las mutaciones T2182C y C2195T también se han observado en cepas resistentes al macrólido Eritromicina y se sugiere puedan conferir mecanismos de resistencia cruzada entre macrolidos. (137) Por otro lado, se observó que ocho cepas fenotípicamente resistentes a Claritromicina no presentaron mutaciones en la región amplificada. Esta observación sugiere la presencia de mecanismos de resistencia alternos; siendo el caso, los cambios de expresión de proteínas de eflujo reportadas en cepas de *H. pylori*. (141) (Tabla 5)

Estas observaciones permiten considerar que la resistencia a ATMs es un problema emergente de salud pública por lo cual es necesario la búsqueda de soluciones alternativas. De este modo, los AMPs constituyen una diversa clase de moléculas de origen natural con un amplio espectro de actividad sobre microorganismos

patógenos, considerándose como prometedores candidatos para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. (91, 93)

Es así, que se evaluó el potencial de un nuevo AMP denominado Bicarinalina (KIKIPWGKVKDFLVGGMKAV-NH₂) aislado de la especie *Tetramorium bicarinatum* como un “lead compound” sobre cepas de *H. pylori*. En su evaluación inicial sobre la cepa de *H. pylori* ATCC 43504 se observó que la Bicarinalina tuvo un valor de CMI de 3.9 µM (Tabla 6). Este resultado es comparable con lo reportado para los AMPs Odorranaina (aislado de *Odorrana grahami*) (GLLRASSVWGRKYYVDLAGCAKD-NH₂) en donde se obtuvo una CMI de 8.1 µM sobre misma cepa de *H. pylori* ATCC 43504. (8) En otro estudio se observó que los AMPs Epi-1 (aislado de *Epinephelus coioides*) (GFIFHIIKGLFHAGKMIHGLV-NH₂) y Pardaxina (aislado de *Pardachirus marmoratus*) (GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSA-NH₂) presentaron una CMI de 8.1µM y >7.5 µM respectivamente sobre las cepas de *H. pylori* ATCC 43504, ATCC 700392 y ATCC 43629. (9) El posible mecanismo de acción de estos AMPs puede relacionarse a la distribución de aminoácidos hidrófobos (F, V, y I) y amoniácidos hidrofílicos (K y D) en sus secuencias. Esta distribución sugiere un comportamiento anfipático, que asociado a la presencia de aminoácidos con cargas positivas (K y H) permitirían una interacción sobre la membrana bacteriana. (17, 93) Además, estos datos sugieren que los AMPs tienen una actividad importante sobre diferentes cepas de *H. pylori* y que además la actividad de Bicarinalina sobre nuestra cepa de referencia de *H. pylori* es similar a los estudios con otros AMPs.

Luego se procedió a evaluar la actividad antimicrobiana de Bicarinalina sobre el panel de 44 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos y que fueron

caracterizadas a nivel de su resistencia fenotípica y genotípica. Se realizó el análisis de la CMI₅₀, este parámetro de tendencia central nos permite determinar la mínima concentración de una molécula capaz de inhibir el crecimiento en el 50% de aislados, y a su vez permite comparar una capacidad de respuesta específica o actividad antimicrobiana entre moléculas. (113, 114) Se observó que la CMI₅₀ de Bicarinalina (0.86 µM) fue menor al reporte de actividad observado con la cepa de referencia de *H. pylori* ATCC 43504 (CMI 3.9 µM). Además, se observó que la Bicarinalina requiere de menor concentración molar comparada a Claritromicina, Levofloxacino y Metronidazol con valores de CMI₅₀ de 1.4 µM, 0.94 µM y 23.4 µM respectivamente. (Tabla 6).

Adicionalmente, se analizó la distribución de las cepas sensibles y resistentes a cada antimicrobiano de referencia respecto a cada una de las concentraciones evaluadas de Bicarinalina. Se observó, por ejemplo, que existe una mayor proporción de cepas resistentes a Claritromicina y Levofloxacino a mayores concentraciones de Bicarinalina. (Anexo 5) (Anexo 6) Además, se observó que las cepas sensibles y resistentes a Metronidazol y Amoxicilina muestran una similar proporción tanto a menores y mayores concentraciones de Bicarinalina. (Anexo 7) (Anexo 8) (Anexo 9) Sin embargo, al realizar el análisis estadístico respectivo no hubo asociación significativa entre la frecuencia de cepas sensibles y resistentes de *H. pylori* a los antimicrobianos de referencia y la actividad antimicrobiana de Bicarinalina.

Es importante mencionar, que el mecanismo de acción propuesto para los AMP se fundamenta en las características físico-químicas de esta molécula y su capacidad de interactuar con la membrana plasmática de microorganismos, generando una pérdida de estabilidad directa de la membrana o la formación de poros que brinden

acceso intracelular al AMP propiciando su interacción con macromoléculas y organelas intracelulares, lo cual conduce a lisis o muerte celular. (93, 94) De este modo, la ausencia de una asociación significativa entre las actividades medidas con los antimicrobianos de referencia y los resultados obtenidos con Bicarinalina se deberían en parte a que las moléculas evaluadas no comparten el mismo mecanismo de acción, lo cual conduce a la necesidad de estudios que evalúen la actividad de Bicarinalina ya sea, por ejemplo, mediante técnicas de microscopía confocal, microscopía electrónica y/o modelos de biofísica de membranas a modo de elucidar el mecanismo de acción de este AMP en vistas de proponer nuevas estrategias de actividad antimicrobiana.

Además, se observó que Bicarinalina presenta baja toxicidad sobre la línea celular murina RAW 264.7 (CC_{50} 26.8 μ M) y la línea celular gástrica NCI-N87 (CC_{50} >1.7 μ M), con índices de selectividad de 31.1 y >17.3 para cada línea celular respectivamente. Estas diferencias observadas en los cultivos celulares son debidas a las diferencias funcionales de cada línea celular, indicando que Bicarinalina no es toxico en ambos modelos. (Tabla 7) Adicionalmente, se ha reportado un modelo de citotoxicidad de Bicarinalina sobre Linfocitos Humanos una CC_{50} de 67.8 μ M para Bicarinalina. (17) Según este modelo es posible indicar que este AMP presentaría un IS similar a nuestro reporte (27.1). De este modo Bicarinalina podría ser considerado como un compuesto alternativo no toxico y de adecuado perfil de actividad frente a cepas de *H. pylori*.

Finalmente, se conoce que la infección por *H. pylori* es un complejo mecanismo de procesos que parten desde la adherencia de la bacteria a la mucosa epitelial gástrica requerida para su colonización hasta el desarrollo de la enfermedad. Es así que se

desarrolló un modelo de infección de mucosa gástrica sobre la línea celular NCI-N87. Se observó que la CI_{50} de Bicarinalina necesaria para inhibir la adherencia de la cepa de *H. pylori* ATCC 43504 sobre el modelo celular fue $<0.098 \mu\text{M}$. (Tabla 8) Este valor fue cuarenta veces menor a lo obtenido en el ensayo de susceptibilidad de la cepa de *H. pylori* ATCC 43504 y diez veces menor al CMI_{50} de Bicarinalina sobre el panel de cepas aisladas de pacientes (Tabla 5) (Tabla 6). Estas observaciones sugieren que Bicarinalina no solo presenta capacidad antimicrobiana sobre las cepas de *H. pylori* sino también brindaría como segunda alternativa la posibilidad de evitar su infección mediante la prevención de la colonización de la mucosa epitelial gástrica por este patógeno. (142-144)

Por todo lo antes mencionado, Bicarinalina podría ser considerada como un “lead compound” de baja toxicidad y de adecuado perfil de actividad frente a cepas de *H. pylori* con el potencial de contribuir en este problema emergente de salud global y los problemas asociados a resistencia antimicrobiana.

IX. CONCLUSIONES

- Se logró establecer el cultivo microbiológico como modelo de ensayo para aislar y caracterizar las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes dispépticos peruanos.
- Se determinó que la concentración mínima inhibitoria de Bicarinalina necesaria para inhibir el crecimiento sobre el 50% de las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes peruanos fue de 0.86 μM .
- Se determinó que la Bicarinalina no presenta toxicidad sobre macrófagos pertenecientes a la línea celular murina RAW 264.7 y células de mucosa de la línea celular gástrica NCI-N87 con un índice de selectividad de 31.1 y >17.3 respectivamente indicando que la Bicarinalina no es toxico en ambos modelos celulares.
- Se determinó que la concentración inhibitoria media de Bicarinalina sobre la adhesión de *H. pylori* sobre la línea celular gástrica NCI-N87 fue de <0.098 μM .

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2014;19 Suppl 1:1-5.
2. IARC. Schistosomes, Liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, Francia: IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to Human; 1994 7 - 14 june. 1-241 p.
3. Fukase K, Kato M, Kikuchi S, Inoue K, Uemura N, Okamoto S, et al. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. *The Lancet*. 2008;372(9636):392-7.
4. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*. 2012;61(5):646-64.
5. Fischbach L, Evans EL. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(3):343-57.
6. Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012;2(2):303-36.
7. Cogo LL, Bustos CL, Dallarmi M, Gomez M, Machado M, Lima M, et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010;41:304 - 9.
8. Chen L, Li Y, Li J, Xu X, Lai R, Zou Q. An antimicrobial peptide with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Peptides*. 2007;28(8):1527-31.

9. Narayana JL, Huang HN, Wu CJ, Chen JY. Epinecidin-1 antimicrobial activity: In vitro membrane lysis and In vivo efficacy against *Helicobacter pylori* infection in a mouse model. *Biomaterials*. 2015;61:41-51.
10. Touchard A, Aili SR, Fox EG, Escoubas P, Orivel J, Nicholson GM, et al. The biochemical toxin arsenal from ant venoms. *Toxins (Basel)*. 2016;8(1).
11. Santos LD, Santos KS, de Souza BM, Arcuri HA, Cunha-Neto E, Castro FM, et al. Purification, sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2007;50(7):923-37.
12. David B, Grégoire C, Dandeu JP. Hymenoptera venoms. structure and physicochemical properties of allergens and the various constituents of venoms. *Rev fr Allergol*. 1997;37(8):1057-62.
13. Baek JH, Lee SH. Isolation and molecular cloning of venom peptides from *Orancistrocerus drewseni* (Hymenoptera: Eumenidae). *Toxicon : official journal of the International Society on Toxicology*. 2010;55(4):711-8.
14. Maroti G, Kereszt A, Kondorosi E, Mergaert P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res Microbiol*. 2011;162(4):363-74.
15. Hita Garcia F, Fisher BL. The ant genus *Tetramorium* Mayr in the Afrotropical region (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae): synonymisation of *Decamorium* Forel under *Tetramorium*, and taxonomic revision of the *T. decem* species group. *Zookeys*. 2014(411):67-103.

16. Rifflet A, Gavalda S, Tene N, Orivel J, Leprince J, Guilhaudis L, et al. Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide from the venom of the ant *Tetramorium bicarinatum*. *Peptides*. 2012;38(2):363-70.
17. Téné N, Bonnafe E, Berger F, Rifflet A, Guilhaudis L, Segalas-Milazzo I, et al. Biochemical and biophysical combined study of bicarinalin, an ant venom antimicrobial peptide. *Peptides*. 2016;79:103-13.
18. Espino A. Infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Latinoam*. 2010;21(2):323 - 7.
19. IARC. *Helicobacter pylori* Eradication as a Strategy for Preventing Gastric Cancer. Lyon, France: IARC International Agency for Reserch on Cancer, 2014 4-6 December 2013. Report No.: 8.
20. Dubois A. Spiral bacteria in the human stomach: the gastric *Helicobacters* *Emerg Infect Dis*. 1995;1(3):79-85.
21. NHI. *Helicobacter pylori* in Peptic ulcer diseases. NHI concensus development panel on *Helicobacter pylori* in Peptic ulcer diseases. *JAMA*. 1994;272(1):65-9.
22. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspect of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990;9(1):1-13.
23. Owen RJ. *Helicobacter* - species classification and identification. *Br Med Bull*. 1998;54(1):17-30.
24. Worku ML, Sidebotham RL, Walker MM, Keshavarz T, Karin QN. The relationship between *Helicobacter pylori* motility, morphology and phase of growth: implications for gastric colonization and pathology *Microbiology*. 1999;145(10):2803-11.

25. Covacci A. *Helicobacter pylori* Virulence and Genetic Geography. *Science*. 1999;284(5418):1328-33.
26. Moran AP, Svennerholm AM, Penn CW. Pathogenesis and host response of *Helicobacter pylori* *Trends Microbiol*. 2002;10(12):545-7.
27. Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun*. 1996;64(7):2445-8.
28. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(22):12778-83.
29. Prinz C, Schöniger M, Rad R, Becker I, Keiditsch E, Wagenpfeil S, et al. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res*. 2001;61(5):1903-9.
30. Algood HM, Cover TL. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(4):597-613.
31. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press; 2001.
32. Weeks DL. A H⁺-Gated Urea Channel: The link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*. 2000;287(5452):482-5.
33. Perez-Perez GI, Peek RMJ, Atherton JC, Blaser MJ, Cover TL. Detection of anti-VacA antibody responses in serum and gastric juice sample using type

- s1/m1 and s2/m2 *Helicobacter pylori* VacA antigen Clin Diagn Lab Immunol. 1999;6(4):489-93.
34. Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. Relationship of vacA genotypes of *Helicobacter pylori* to cagA status, cytotoxin production, and clinical outcome. Helicobacter. 1998;3(4):241-53.
35. Vinion-Dubiel AD, McClain MS, Cao P, Mernaugh RL, Cover TL. Antigenic diversity among *Helicobacter pylori* vacuolating toxins. Infect Immun. 2001;69(7):4329-36.
36. Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, et al. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter* Mol Microbiol. 1998;28(1):37-53.
37. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature. 1997;388(6442):539-47.
38. Fischer W, Püls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. Mol Microbiol. 2001;42(5):1337-48.
39. Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. Cell Microbiol. 2008;10(8):1573-81.
40. Hsu PI, Hwang IR, Citty D, Lai KH, El-Zimaity HM, Gutierrez O, et al. Clinical presentation in relation to diversity within the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. Am J Gastroenterol 2002;97(9):2231-8.

41. Everhart JE. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*. 2000;29(3):559-78.
42. Brown LM. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*. 2000;22(2):283-97.
43. Bastos J, Peleteiro B, Barros R, Alves L, Severo M, de Fatima Pina M, et al. Sociodemographic determinants of prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in Portuguese adults. *Helicobacter*. 2013;18(6):413-22.
44. Ozaydin N, Turkyilmaz SA, Cali S. Prevalence and risk factor of *Helicobacter pylori* in Turkey: a nationally-representative, cross-sectional, screening with the 13C-urea breath test. *BMC Public Health*. 2013;13(1215):1-12.
45. Ramirez-Ramos A, Sanchez S. *Helicobacter pylori* 25 años después (1983-2008): Epidemiología, Microbiología, Patogenia, Diagnóstico y Tratamiento. *Rev Gastroenterol Perú*. 2009;29(2):158-70.
46. Ramírez-Ramos A, Watanabe-Yamamoto J, Takano-Morón J, Gilman RH, Recavarren Arce S, Arias-Stella J, et al. Decrease in prevalence of peptic ulcer and gastric adenocarcinoma at the Policlinico Peruano Japonés, Lima, Perú, between the years 1985 and 2002. Analysis of 31.446 patients *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2006;38(3):139-46.
47. Ramírez-Ramos A, Gilman RH, Watanabe-Yamamoto J, Takano-Moron J, Arias-Stella J, Yoshiwara-Wakabayashi E, et al. Comparación de la prevalencia de la infección de estómago por el *Helicobacter pylori* en el Perú en población japonesa y peruana. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2005;35(4):219-24.

48. Ramirez-Ramos A. *Helicobacter pylori* en el Perú: Cambios en el tiempo en su prevalencia y su relación con la Patología Gastroduodenal Rev Gastroenterol Perú. 2003;23(1):11-5.
49. Wizla-Derambure N, Michaud L, Ategbo S, Vincent P, Ganga-Zandzou S, Turck D, et al. Familial and community environmental risk factors for *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2001;33(1):58-63.
50. Didelot X, Nell S, Yang I, Woltemate S, van der Merwe S, Suerbaum S. Genomic evolution and transmission of *Helicobacter pylori* in two Southafrican families. Proc Natl Acad Sci USA. 2013;110(34):13880-5.
51. Osaki T, Okuda M, Ueda J, Konno M, Yonezawa H, Hojo F, et al. Multilocus sequence typing of DNA from faecal specimens for the analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol. 2013;62(Pt 5):761-5.
52. Urita Y, Watanabe T, Kawagoe N, Takemoto I, Tanaka H, Kijima S, et al. Role of infected grandmothers in transmission of *Helicobacter pylori* to children in a Japanese rural town. J Paediatr Child Health. 2013;49(5):394-8.
53. Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. Lancet. 1991;337(8756):1503-6.
54. Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, et al. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. Gastroenterology. 1996;110(4):1031-5.

55. Yan TL, Hu QD, Zhang Q, Li YM, Liang TB. National rates of *Helicobacter pylori* recurrence are significantly and inversely correlated with human development index. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;37(10):963-8.
56. Kim MS, Kim N, Kim SE, Jo HJ, Shin CM, Lee SH, et al. Long-term follow-up *Helicobacter pylori* reinfection rate and its associated factors in Korea. *Helicobacter.* 2013;18(2):135-42.
57. Morgan DR, Torres J, Sexton R, Herrero R, Salazar-Martinez E, Greenberg ER, et al. Risk of recurrent *Helicobacter pylori* infection 1 year after initial eradication therapy in 7 Latin American communities. *JAMA.* 2013;309(6):578-86.
58. Soto G, Bautista CT, Roth DE, Gilman RH, Velapatiño B, Ogura M, et al. *Helicobacter pylori* reinfection is common in Peruvian adults after antibiotic eradication therapy. *J Infect Dis.* 2003;188(9):1263-75.
59. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med.* 2001;345(11):784-9.
60. Figueiredo C, Costa S, Karameris A, Machado JC. Pathogenesis of Gastric Cancer. *Helicobacter.* 2015;20 Suppl 1:30-5.
61. Veldhuyzen van Zanten SJ, Sherman PM. *Helicobacter pylori* infection as a cause of gastritis, duodenal ulcer, gastric cancer and nonulcer dyspepsia: a systematic overview. *CMAJ.* 1994;150(2):177-85.
62. EUROGAST. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. The EUROGAST Study Group. *Lancet.* 1993;341(8857):1359-62.

63. Taj Y, Essa F, Kazmi SU, Abdullah E. Sensitivity and specificity of various diagnostic tests in the detection of *Helicobacter pylori*. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2003;13(2):90-3.
64. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World J Gastroenterol*. 2014;20(36):12847-59.
65. Rimbara E, Sasatsu M, Graham DY. PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples. *Methods Mol Biol*. 2013;943:279-87.
66. Lee JY, Kim N. Diagnosis of *Helicobacter pylori* by invasive test: histology. *Ann Transl Med*. 2015;3(1):10.
67. Alem M, Alem N, Cohen H, England T, Hamed N, Moussazadeh M, et al. Diagnostic value of detection of IgM antibodies to *Helicobacter pylori*. *Exp Mol Pathol*. 2002;72(1):77-83.
68. Kazemi S, Tavakkoli H, Habizadeh MR, Emami MH. Diagnostic values of *Helicobacter pylori* diagnostic tests: stool antigen test, urea breath test, rapid urease test, serology and histology. *J Res med sci*. 2011;16(9):1097-104.
69. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16(2):167-80.
70. EHPSG. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. European *Helicobacter pylori* Study Group. *Gut*. 1997;41(1):8-13.

71. Ramirez-Ramos A, Mendoza-Requena D, Leey-Casella J, Guerra Valencia D. Estudio del *Helicobacter pylori* en el Perú. Rev Perú Med Exp Salud Publica. 2002;19(4):209-14.
72. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilionis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. Medicina (Kaunas). 2011;47(3):137-46.
73. Nishizawa T, Suzuki H. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing. Front Mol Biosci. 2014;1:19.
74. Francesco VD, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Rosania R, Ierardi E. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. World J Gastrointest Pathophysiol. 2011;2(3):35-41.
75. Masaoka T, Suzuki H, Kurabayashi K, Nomoto Y, Nishizawa T, Mori M, et al. Could frameshift mutations in the frxA and rdxA genes of *Helicobacter pylori* be a marker for metronidazole resistance? AP&Tss. 2006;2(1):81-7.
76. Chisholm SA, Owen RJ. 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. 2004;53(Pt 2):135-40.
77. Kwon DH, Osato MS, Graham DY, El-Zaatari FA. Quantitative RT-PCR analysis of multiple genes encoding putative metronidazole nitroreductases from *Helicobacter pylori*. Int J Antimicrob Agents. 2000;15(1):31-6.
78. Gerrits MM, Godoy AP, Kuipers EJ, Ribeiro ML, Stoof J, Mendonça S, et al. Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. Helicobacter. 2006;11(3):181-7.

79. Tseng YS, Wu DC, Chang CY, Kuo CH, Yang YC, Jan CM, et al. Amoxicillin resistance with beta-lactamase production in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(9):807-12.
80. Co EM, Schiller NL. Resistance mechanisms in an in vitro-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(12):4174-6.
81. Godoy AP, Reis FC, Ferraz LF, Gerrits MM, Mendonca S, Kusters JG, et al. Differentially expressed genes in response to amoxicillin in *Helicobacter pylori* analyzed by RNA arbitrarily primed PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;50(2):226-30.
82. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
83. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(2):280-322.
84. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3(2):163-75.
85. Bonev B, Hooper J, Parisot J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(6):1295-301.
86. Occhialini A, Urdaci M, Doucet-Populaire F, Bébéar CM, Lamouliatte H, Mégraud F. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point

mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(12):2724-28.

87. Umegaki N, Shimoyama T, Nishiya D, Suto T, Fukuda S, Munakata A. Clarithromycin-resistance and point mutations in the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* isolates from Japan. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15(8):906-9.

88. Nishizawa T, Suzuki H, Umezawa A, Muraoka H, Iwasaki E, Masaoka T, et al. Rapid detection of point mutations conferring resistance to fluoroquinolone in *gyrA* of *Helicobacter pylori* by allele-specific PCR. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):303-5.

89. Lee JW, Kim N, Nam RH, Park JH, Choi YJ, Kim JM, et al. GenoType HelicoDR test in the determination of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korea. *Scand J Gastroenterol.* 2014;49(9):1058-67.

90. Bonifácio BV, dos Santos Ramos MA, da Silva PB, Bauab TM. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 2014;13(1):1-10.

91. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res.* 2000;1(3):141-50.

92. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 2002;415(6870):389-95.

93. Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;24(6):536-47.

94. Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*. 2012;37(2):207-15.
95. Sorensen O, Borregaard N, A C. Antimicrobial peptides in innate immune responses. *Contrib Microbiol*. 2008;15:31-77.
96. Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical reviews in biotechnology*. 2012;32(2):143-71.
97. Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, Capovilla M, Reichhart JM, Lemaitre B, et al. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity*. 2000;13(5):737-48.
98. Epanand RM, Vogel HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1462(1-2):11-28.
99. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1462(1-2):55-70.
100. Yount NY, Yeaman MR. Immunocontinuum: perspectives in antimicrobial peptide mechanisms of action and resistance. *Protein Pept Lett*. 2005;12(1):49-67.
101. Luque-Ortega JR, van't Hof W, Veerman EC, Saugar JM, Rivas L. Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in *Leishmania*. *FASEB J*. 2008;22(6):1817-28.
102. Brown DG, Lister T, May-Dracka TL. New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24(2):413-8.

103. Téné N, Roche-Chatain V, Rifflet A, Bonnafé E, Lefranc B, Leprince J, et al. Potent bactericidal effects of bicarinalin against strains of the *Enterobacter* and *Cronobacter* genera. *Food Control*. 2014;42:202-6.
104. Ndip RN, MacKay WG, Farthing MJ, Weaver LT. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003;36(5):616-22.
105. Cellini L. *Helicobacter pylori*: a chameleon-like approach to life. *World J Gastroenterol*. 2014;20(19):5575-82.
106. Stevenson TH, Castillo A, Lucia LM, Acuff GR. Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media. *Lett Appl Microbiol*. 2000;30(3):192-6.
107. Miendje Deyi VY, Van den Borre C, Fontaine V. Comparative evaluation of 3 selective media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies under routine conditions. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68(4):474-6.
108. NHS. UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of *Helicobacter* species. In: Service NH, editor. London 2015.
109. Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, Griffy M, Beyer J, Flamm R, et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(2):477-80.
110. Ho SL, Tan EL, Sam CK, Goh KL. Clarithromycin resistance and point mutations in the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* isolates from Malaysia. *J Dig Dis*. 2010;11(2):101-5.
111. Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiol Lett*. 2013;339(1):1-9.

112. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2015 Contract No.: Version 5.0.
113. Hamilton-Miller JM. Calculating MIC₅₀. J Antimicrob Chemother. 1991;27(6):863-4.
114. Schmidt LH. The MIC₅₀/MIC₉₀: assessments of In vitro activities of antimicrobial agents that facilitate comparative agent-agent and agent-species susceptibility comparisons. ANMLDO. 1987;4(1):1-8.
115. CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved guideline-Second edition. Wayne, PA Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
116. Bagla VP, McGaw LJ, Elgorashi EE, Eloff JN. Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (*Podocarpaceae*) leaves. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2014;14(1):1-6.
117. Wayne WD. Bioestadística. Base para el análisis de ciencias de la salud. 4 ed. Mexico: Limusa; 2003.
118. El-Zimaity HM, Graham DY. Evaluation of gastric mucosal biopsy site and number for identification of *Helicobacter pylori* or intestinal metaplasia: role of the Sydney System. 30. 1999;1(72-7).
119. Kjoller M, Fischer A, Justesen T. Transport conditions and number of biopsies necessary for culture of *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1991;10(3):166-7.

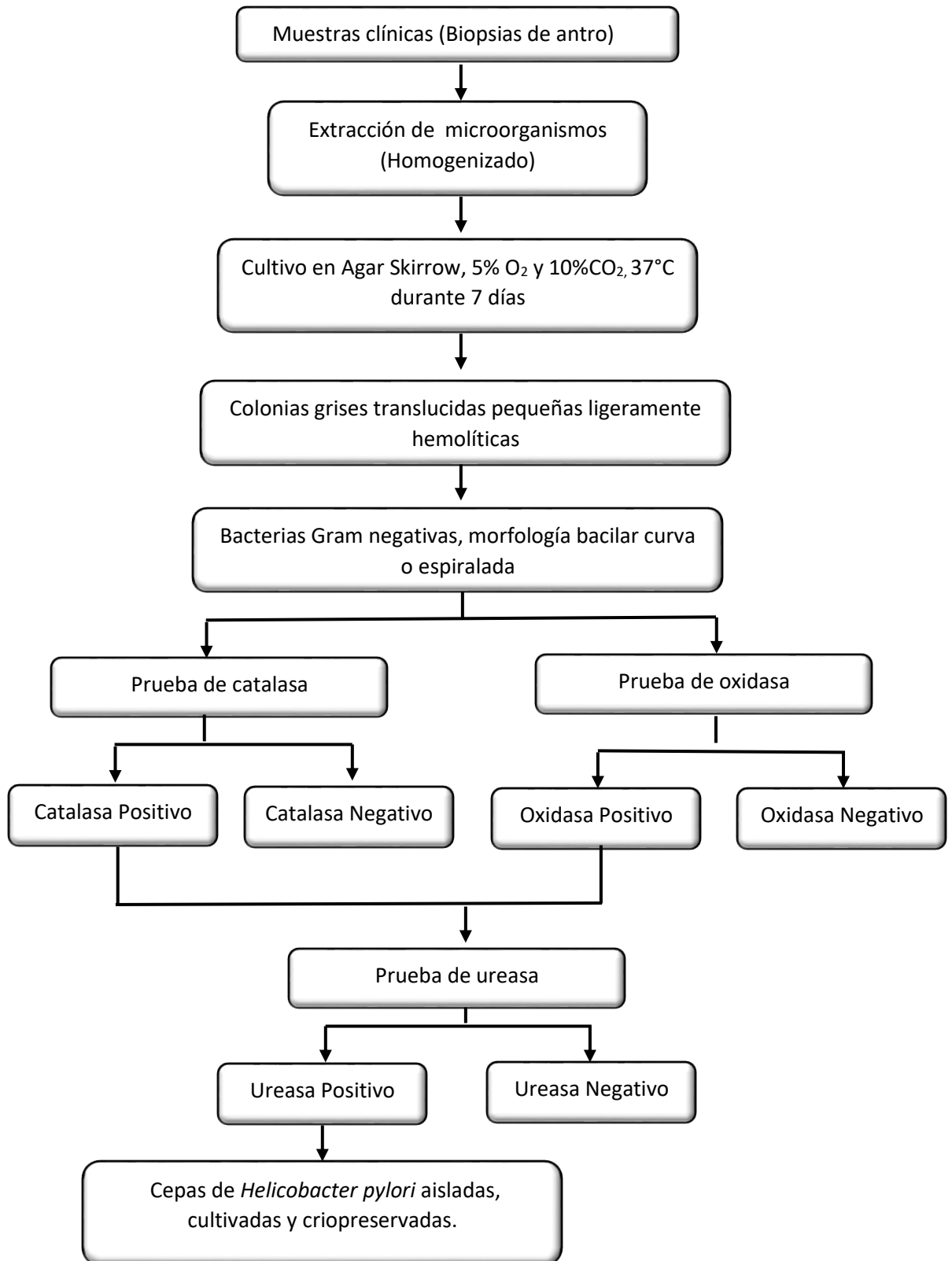
120. Morgan DR, Mathewson JJ, Freedman R, Kraft WG. Evaluation of a selective enrichment technique for the isolation of *Campylobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett. 1990;54(1-3):303-6.
121. Morton D, Bardhan KD. Effect of transport medium and transportation time on culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. J Clin Pathol. 1995;48(1):91.
122. Fresnadillo Martínez MJ, Rodríguez Rincón M, Blázquez de Castro AM, García Sánchez E, García Sánchez JE, Trujillano Martín I, et al. Comparative evaluation of selective and nonselective media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. Helicobacter. 1997;2(1):36-9.
123. Kusters JG, Gerrits MM, Van Strijp JA, Vandenbroucke-Grauls CM. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. Infect Immun. 1997;65(9):3672-9.
124. Lehours P, Mégraud F. *Helicobacter pylori* molecular diagnosis. Expert Rev Mol Diagn. 2011;11(4):351-5.
125. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, Wu MC, Shih HY, Wang SS, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. World J Gastroenterol. 2015;21(40):11221-35.
126. Fabre R, Sobhani I, Laurent-Puig P, Hedef N, Yazigi N, Vissuzaine C, et al. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests. Gut. 1994;35(7):905-8.

127. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon ATR, Bazzoli F, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the maastricht IV/ Florence Consensus Report. Gut. 2012;61.
128. Figueroa M, Cortés A, Pazos A, Bravo LE. Sensibilidad in vitro a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. Biomédica. 2012;32:32-42.
129. Mochizuki H, Noriega AP. Determinación de la susceptibilidad de cepas de *Helicobacter pylori* a Levofloxacino en formato pequeño y método de difusión en disco usando Agar yema de huevo. Rev Gastroenterol Perú. 2011;31(3):224-9.
130. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, et al. Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. Gut. 2013;62(1):34-42.
131. Wirtz V, Dreser A, R G. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997–2007. Rev Panam Salud Publica. 2010;27(3):219-25.
132. Ecker L, Ruiz J, Vargas M, Del Valle L, T O. Prevalencia de compra sin receta y recomendación de antibióticos para niños menores de 5 años en farmacias privadas de zonas periurbanas en Lima, Perú. RPMESP. 2016;33(2):215-23.
133. Ghotaslou R, Leylabadlo HE, Asl YM. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: A recent literature review. World J Methodol. 2015;5(3):164-74.
134. Andersson DI, Hughes D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. FEMS microbiology reviews. 2011;35(5):901-11.

135. Oz T, Guvenek A, Yildiz S, Karaboga E, Tamer YT, Mumcuyan N, et al. Strength of selection pressure is an important parameter contributing to the complexity of antibiotic resistance evolution. *Molecular biology and evolution*. 2014;31(9):2387-401.
136. Abdollahi H, Savari M, Javad Zahedi M, Darvish Moghadam S, M HA. Detection of A2142C, A2142G, and A2143G mutations in 23s rRNA gene conferring resistance to Clarithromycin among *Helicobacter pylori* isolates in Kerman, Iran. *Iran J Med Sci*. 2011;36(2):104-10.
137. Kim JM, Kim JS, Kim N, Kim YJ, Kim IY, Chee YJ, et al. Gene mutations of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from Korean patients. *J Microbiol Biotechnol*. 2008;18(9):1584-9.
138. De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Burattini O, et al. Prevalence of primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains over a 15 year period in Italy. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(4):783-5.
139. De Francesco V, Zullo A, Ierardi E, Giorgio F, Perna F, Hassan C, et al. Phenotypic and genotypic *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance and therapeutic outcome: benefits and limits. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(2):327-32.
140. De Francesco V, Zullo A, Giorgio F, Saracino I, Zaccaro C, Hassan C, et al. Change of point mutations in *Helicobacter pylori* rRNA associated with clarithromycin resistance in Italy. *J Med Microbiol*. 2014;63(Pt 3):453-7.
141. Hirata K, Suzuki H, Nishizawa T, Tsugawa H, Muraoka H, Saito Y, et al. Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25 Suppl 1:S75-9.

142. Horemans T, Kerstens M, Clais S, Struijs K, van den Abbeele P, Van Assche T, et al. Evaluation of the anti-adhesive effect of milk fat globule membrane glycoproteins on *Helicobacter pylori* in the human NCI-N87 cell line and C57BL/6 mouse model. *Helicobacter*. 2012;17(4):312-8.
143. Diesing. A-K, Nossol. C, Faber-Zuschratter. H, Zuschratter. W, Renner. L, Sokolova. O, et al. Rapid Interaction of *Helicobacter pylori* with Microvilli of the Polar Human Gastric Epithelial Cell Line NCI-N87. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013;296(12):1800-5.
144. Jung YJ, Lee KL, Kim BK, Kim JW, Jeong JB, Kim SG, et al. Usefulness of NCI-N87 cell lines in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa model. *Korean J Gastroenterol*. 2006;47(5):357-62.

Anexo 2. Cribado microbiológico para la identificación y aislamiento de cepas de *Helicobacter pylori*.



Anexo 3. Especies bacterianas empleadas como control positivo y negativo para las pruebas bioquímicas catalasa, oxidasa y ureasa.

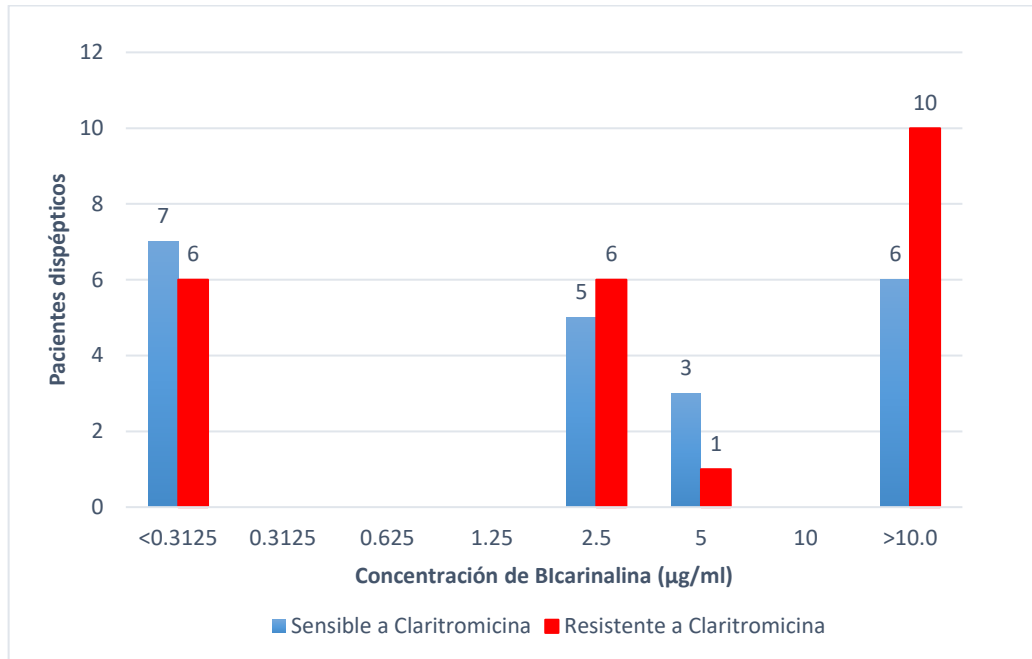
| Prueba | Control | Especie Bacteriana |
|-------------------|----------------|--|
| Bioquímica | | |
| | | |
| Catalasa | Positivo | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 |
| | Negativo | <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 12344 |
| Oxidasa | Positivo | <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853 |
| | Negativo | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 |
| Ureasa | Positivo | <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453 |
| | Negativo | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 |

Anexo 4. Distribución de casos según sexo del total de casos contrastados por histología.

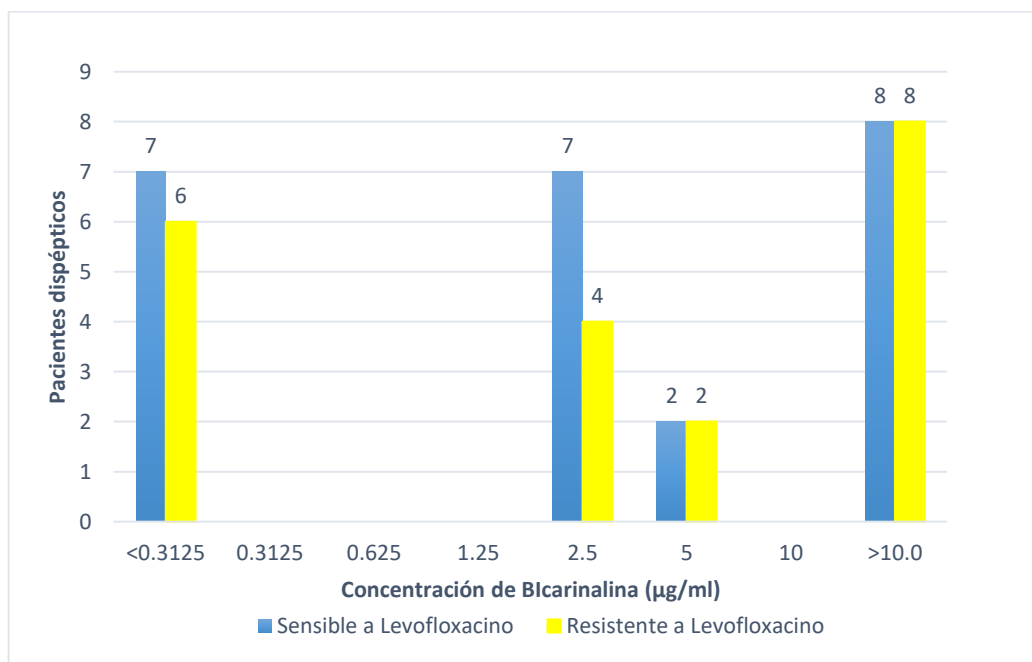
| | Sexo | | Total de casos |
|---------------------------------|---------------|--------------|-----------------------|
| | Hombre | Mujer | |
| Casos contrastados | 35 | 59 | 95 |
| Cultivos positivos ^a | 17 | 27 | 44 |
| Cepas aisladas ^b | 17 | 27 | 44 |
| Histología positivos | 18 | 29 | 47 |

a: Cultivos positivos con presencia de H. pylori identificadas según punto 6.1.4.4 a partir de muestra clínica; b: Cepas de H. pylori aisladas, cultivadas y criopreservadas.

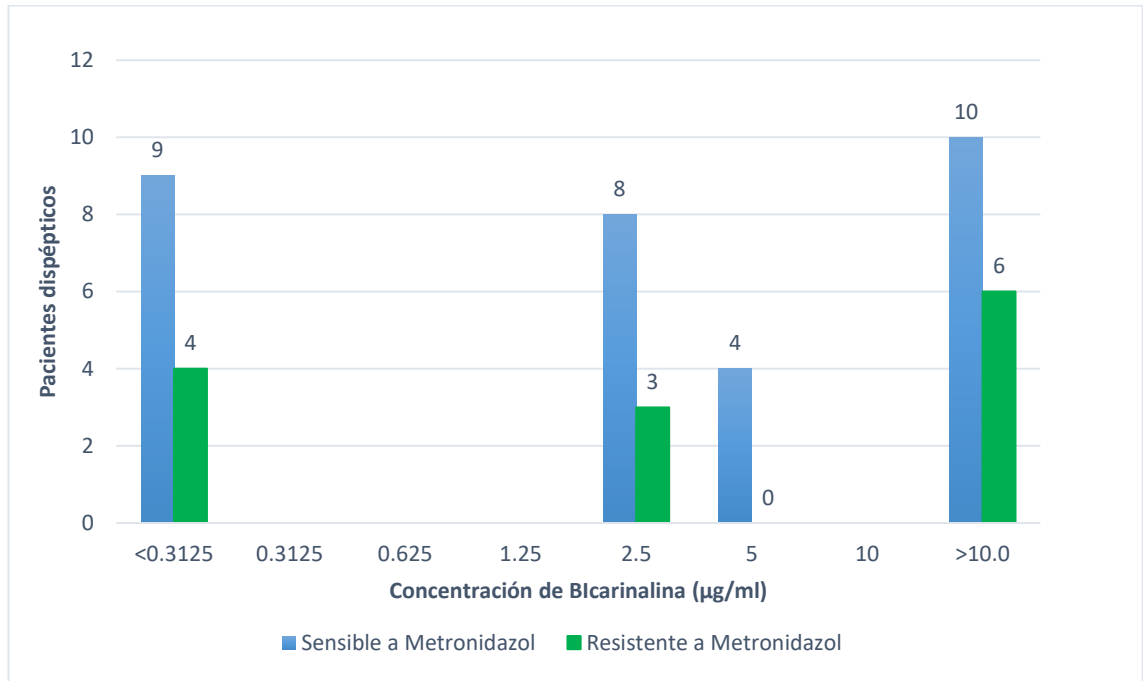
Anexo 5. Distribución de fenotipos susceptibles a Claritromicina de las cepas caracterizadas de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos peruanos.



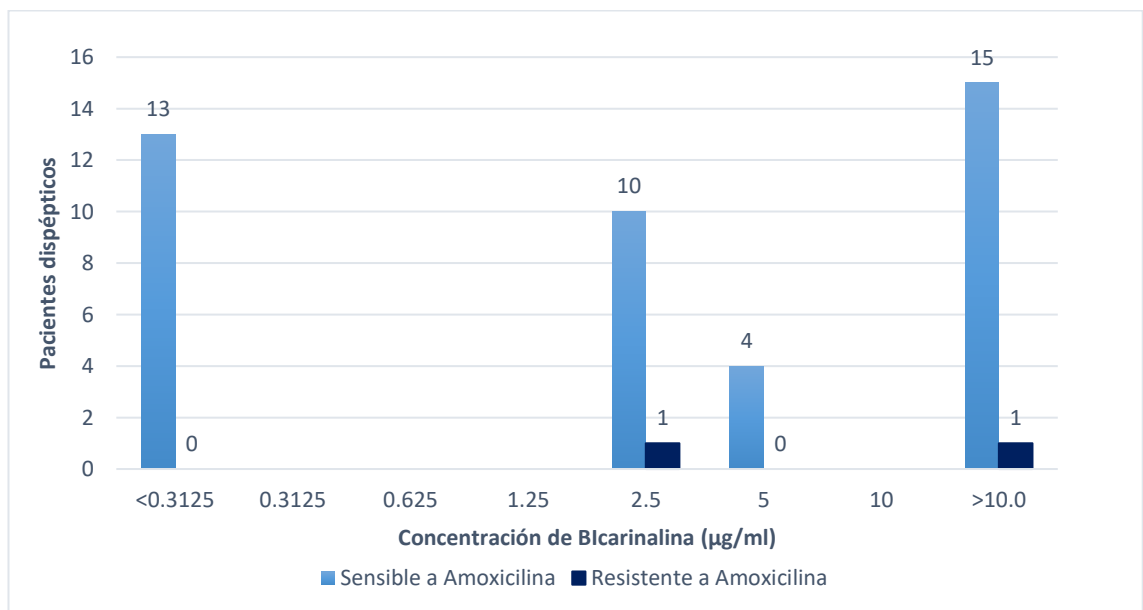
Anexo 6. Distribución de fenotipos susceptibles a Levofloxacino de las cepas caracterizadas de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos peruanos.



Anexo 7. Distribución de fenotipos susceptibles a Metronidazol de las cepas caracterizadas de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos peruanos.



Anexo 8. Distribución de fenotipos susceptibles a Amoxicilina de las cepas caracterizadas de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos peruanos.



Anexo 9. Reporte del estadístico chi-cuadrado (X^2) respecto a la asociación de actividad antimicrobiana de Bicarinalina (MIC_{50}) y la susceptibilidad de los ATMs de referencia sobre las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos peruanos.

| Bicarinalina | | | | | |
|------------------------------|-------------------|----------------|----------------|-------|-------|
| | $\leq 0.86 \mu M$ | $> 0.86 \mu M$ | Porcentaj e | X^2 | p^* |
| Total de cepas | 24 | 20 | 100 | | |
| Sensibles a Claritromicina | 12 | 9 | 47.7 | 0.109 | 0.741 |
| Resistentes a Claritromicina | 12 | 11 | 52.3 | 3 | |
| Total de cepas | 24 | 20 | 100 | | |
| Sensibles a Levofloxacino | 14 | 10 | 54.5 | 0.305 | 0.580 |
| Resistentes a Levofloxacino | 10 | 10 | 45.5 | 6 | |
| Total de cepas | 24 | 20 | 100 | | |
| Sensibles a Metronidazol | 17 | 14 | 70.5 | 0.003 | 0.952 |
| Resistentes a Metronidazol | 7 | 6 | 29.5 | 6 | |
| Total de cepas | 24 | 20 | 100 | | |
| Sensibles a Amoxicilina | 23 | 19 | 95.5 | 0.017 | 0.895 |
| Resistentes a Amoxicilina | 1 | 1 | 4.5 | 5 | |

* $p < 0.05$