

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**EFFECTO DEL ETANOL Y LA VITAMINA C EN LA
SECRECIÓN DE INTERLEUCINA-8 Y ÓXIDO NÍTRICO DE
CÉLULAS GÁSTRICAS EXPUESTAS A
*Helicobacter pylori***

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

Q.F.B. AÍDA MARIANA SANTIAGO LOMELÍ

**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Florencia Vargas Vorácková**

México, D.F.

2002

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, se encuentra dentro del padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 309-0

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca-crédito otorgada por CONACYT con el número de registro: 152990

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por mostrarme que en los brazos de la debilidad está la fuerza, ansiosa de poder salir, en las garras del dolor, el placer que espera su momento y en un camino lleno de obstáculos, la oportunidad que se presenta con ellos.

A mi Madre, Aída, porque cada uno de mis logros es un reflejo de su esfuerzo y amor infinito.

A mi Padre, Javier, por impulsarme a ser mejor cada día.

A la Dra. Florencia Vargas, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y guiarme con sus valiosos conocimientos.

A la Dra. Concepción Gutiérrez, por brindarme su apoyo incondicional y ser un ejemplo a seguir en mi vida.

A el Dr. Humberto González, por su acertada asesoría y colaboración en este trabajo.

A Vero Luqueño y Lulú Gómez, por toda la ayuda, la paciencia y todos los *Helicobacters* sembrados.

A la M.C. Margarita Camorlinga por obsequiarme amablemente las células AGS.

A todos mis compañeros de laboratorio que hacen que los días de trabajo sean mejores.

CONTENIDO

	Página
1. Resumen	1
2. Antecedentes	1
2.1. Epidemiología de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	1
2.2. Características generales de <i>Helicobacter pylori</i>	2
2.3. Factores de patogenicidad de <i>Helicobacter pylori</i>	3
2.4. Respuesta inmune a la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	5
2.5. Interleucina-8 y <i>Helicobacter pylori</i>	6
2.6. Oxido nítrico y <i>Helicobacter pylori</i>	7
2.7. Etanol y <i>Helicobacter pylori</i>	8
2.8. Vitamina C y <i>Helicobacter pylori</i>	9
3. Justificación	11
4. Objetivos	12
4.1. General	12
4.2. Particulares	12
5. Hipótesis	12
6. Metodología	12
7. Resultados	15
8. Discusión	29
9. Bibliografía	31

1. Resumen

La infección por *Helicobacter pylori* no siempre se asocia con un padecimiento clínico. Esto sugiere la existencia de factores que modulan la interacción *H. pylori*-huésped. Dentro de los factores dietéticos que podrían ejercer tal modulación se encuentran el etanol y la vitamina C. El etanol es un conocido agente dañino, mientras que la vitamina C, debido a sus propiedades antioxidantes, parece ser protectora.

Este estudio *in vitro* evaluó el efecto del etanol y la vitamina C en la secreción de Interleucina-8 (IL-8) y en la síntesis de óxido nítrico (ON) de células gástricas epiteliales expuestas a *H. pylori*.

Se sembraron células AGS (adenocarcinoma gástrico) a una densidad de 2×10^5 y se cultivaron durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron expuestas a *H. pylori* (cepa CCUG 17874) en una relación bacteria/célula de 100:1. Simultáneamente, se adicionaron etanol y/o vitamina C en concentraciones de 100 mM y 150 μ M, respectivamente. Después de 6 horas de exposición, se cuantificó IL-8 mediante ELISA y nitritos/nitratos por ensayo colorimétrico. Los resultados fueron resumidos como medianas e intervalos (valores mínimo y máximo) y analizados mediante la prueba U de Mann-Whitney.

En ausencia de *H. pylori*, no se observó secreción de IL-8, y la síntesis de ON se incrementó de 605.46 μ M a 672.97 μ M con la exposición a etanol ($P=0.047$), y a 691.45 μ M con la exposición combinada a etanol y vitamina C ($P=0.076$). La exposición a *H. pylori* indujo la secreción de IL-8 a 943.83 pg/mL, y disminuyó la síntesis de ON a 447.81 μ M ($P=0.0679$). La secreción de IL-8 inducida por el *H. pylori* disminuyó a 490 pg/mL con el etanol ($P=0.0004$), y a 671.11 pg/mL con la combinación de etanol y vitamina C ($P=0.012$). La síntesis de ON, disminuida por la presencia de *H. pylori*, se incrementó a 672.15 μ M con la adición concomitante de ambos etanol y vitamina C ($P=0.055$).

La infección por *H. pylori* induce la secreción de IL-8 pero no de ON en células AGS. El etanol, al reducir secreción de IL-8 e inducir la síntesis de ON en presencia de *H. pylori*, podría estar ejerciendo un efecto tóxico tanto sobre las células AGS como sobre el propio microorganismo. En ausencia de etanol, e independientemente de la infección por *H. pylori*, la síntesis de ON inducida por la vitamina C sugiere un efecto pro- más que antioxidante.

2. Antecedentes

2.1. Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es considerado el agente etiológico de la gastritis y de las úlceras pépticas y es un factor de riesgo importante para el desarrollo del adenocarcinoma gástrico.

La infección por *H. pylori* tiene una distribución mundial amplia, y su prevalencia en los países desarrollados es de aproximadamente el 25%, a diferencia del 80% que se presenta en los países en vías de desarrollo. Sin embargo, la incidencia de enfermedades asociadas a la infección no muestra esta amplia distribución, lo que puede deberse a los factores genéticos heterogéneos entre los hospederos, al nivel socioeconómico, a diferencias ambientales o a la existencia de distintos genotipos de la bacteria.

La mayoría de los niños en países en vías de desarrollo están infectados, y la infección persiste hasta la madurez. En México, se encontraron anticuerpos contra *H. pylori* en 30% de los niños menores de diez años, alcanzando esta frecuencia el 70% en sujetos mayores a 50 años (Robles-Díaz et al., 1993). En los países desarrollados, la infección en niños es menos frecuente, aumentando en forma gradual con la edad.

En adultos, la prevalencia alta de infección se asocia a condiciones socioeconómicas y nivel educacional bajos, mientras que en niños, la infección por *H. pylori* muestra una relación directa con las fuentes de agua (Olmos et al. 2000).

2.2. Características generales de *Helicobacter pylori*

H. pylori es una bacteria Gram negativa, unipolar, multiflagelada, microaerófila, espiral, con extremos redondeados, que mide 0.5 a 1.0 micras de ancho por 2.5 a 4.0 micras de largo. En la mucosa gástrica humana presenta forma curvada o ligeramente espiral. Cuando se cultiva en medio sólido, las formas espirales son pocas o nulas. Estudios acerca de la superficie externa de la bacteria utilizando ácido tánico revelan que cuenta con un glicocálix distintivo que mide alrededor de 40 nm de espesor. La pared celular se encuentra cubierta con subunidades anulares de 12 a 15 nm de diámetro. Cuatro a seis flagelos se encuentran unidos a un polo de *H. pylori*, cada uno de cerca de 30 nm de espesor y presentan un bulbo terminal membranoso que es una extensión de la cubierta flagelar.

Los cultivos prolongados dan origen a la presencia de formas cocoides de *H. pylori*, que también aparecen después de exposición a oxígeno. Se asume que estas formas son indicativas de un estado de latencia que le permite sobrevivir en el ambiente, donde las condiciones no son favorables para el crecimiento. Debido a que este microorganismo es un microaerófilo obligado, la concentración óptima de oxígeno para el cultivo es de 2 a 8%. Para el aislamiento primario y subcultivo de cepas frescas es necesario dióxido de carbono extra, sin embargo en medio sólido esta dependencia disminuye con pases repetidos.

La coloración de Gram de las colonias muestra bacterias curvas o en forma de bastón. Si las pruebas bioquímicas primarias dan como resultado catalasa positivo, oxidasa positivo y ureasa positivo, muy probablemente las colonias son de *H. pylori* (Goodwin et al., 1993).

La habilidad de *H. pylori* para causar la diversidad de enfermedades depende de factores del hospedero, de la bacteria y del ambiente. Factores bacterianos críticos para la colonización de este microorganismo en la mucosa incluyen su ureasa, flagelos, adhesinas y γ -glutamyltranspeptidasa. El lipopolisacárido, la ureasa y la citotoxina vacuolante se encuentran dentro de los factores que le permiten persistir durante décadas, generando una respuesta inflamatoria intensa que lleva a daño de las células del hospedero. Los genes de la isla *cag* de patogenicidad también contribuyen a la respuesta inflamatoria, ya que inician una cascada de transducción de señales que resulta en la producción de interleucina-8 (IL-8). Las citocinas proinflamatorias y la respuesta de citocinas TH1 exacerba este proceso. Los productos de las enzimas sintetasa inducible de óxido nítrico y ciclooxigenasa pueden perturbar el balance entre la apoptosis de células epiteliales gástricas (formación de úlceras) y su proliferación (cáncer).

La respuesta TH1 del hospedero y los anticuerpos dirigidos contra *H. pylori* no eliminan al microorganismo, lo que representa grandes retos para el desarrollo de vacunas. *H. pylori* es el microorganismo más diverso genéticamente que se conoce, lo que contribuye a explicar la severidad de las enfermedades producidas por las distintas cepas (McGee et al., 2000).

2.3. Factores de patogenicidad de *Helicobacter pylori*

Ureasa

La ureasa de *H. pylori* puede encontrarse tanto dentro de su citoplasma como en su superficie. Esta doble localización puede asociarse a las múltiples funciones de la enzima, como proteger a la bacteria de la acidez, funcionar como factor de adhesión, estimular fagocitos para producir citocinas inflamatorias, inducir efectos tóxicos en las células epiteliales gástricas y dañar directamente el DNA celular. La hidrólisis de la urea tiene efectos en las células de la mucosa gástrica que pueden llevar a la formación de úlceras. El daño inducido a la mucosa por la ureasa también puede estar ligado a la habilidad del amoníaco a inducir la formación de vacuolas en el citoplasma de células *in vitro* (Figura, 1997).

Fosfolipasa

La fosfolipasa producida por *H. pylori* puede contribuir a la modificación de la mucosa gástrica protectora y así favorecer la ulcerogénesis. La bacteria puede producir diferentes tipos de fosfolipasas: A1, A2 y C. Estas enzimas parecen actuar en la zona rica en fosfolípidos de las células epiteliales gástricas y en los componentes fosfolipídicos del moco gástrico, generando lisolecitina y ácidos grasos que son componentes ulcerogénicos (Figura, 1997).

Lipopolisacárido (LPS)

El LPS de *H. pylori* se encuentra también implicado en la patogénesis de la infección de la bacteria. La actividad inmunológica del LPS se considera baja, y es resultado del patrón de fosforilación de su componente lipídico A, que puede prolongar la infección y contribuir a la inflamación crónica en la mucosa gástrica.

Asimismo, el LPS puede tener un papel importante en las respuestas autoinmunes en la mucosa gástrica. La estructura del antígeno O específico en diferentes cepas es similar a los antígenos de grupo sanguíneo Lewis^x o Lewis^y que se expresan en la mucosa gástrica humana normal. Este parecido molecular puede ser causa de la formación de algunos autoanticuerpos inducidos por *H. pylori*, que llevan al desarrollo de gastritis atrófica. Los antígenos Lewis se expresan más frecuentemente en las cepas *cagA* positivas que en las *cagA* negativas (Shimoyama y Crabtree, 1998).

Además, puede contribuir a alterar la integridad de las células epiteliales gástricas debido a su habilidad de unirse a la laminina, proteína de la matriz extracelular, previniendo que ésta interactúe con su ligando (Figura, 1997).

Citotoxina

La citotoxina vacuolante (*vacA*), la cual induce la formación de vacuolas citoplasmáticas en células eucarióticas, es producida por aproximadamente el 50% de las cepas de *H. pylori* y la infección por estas cepas es más común en pacientes que presentan úlceras pépticas. Se ha demostrado que la actividad biológica de la proteína *vacA* aumenta con la exposición a pH ácido. *VacA* se considera como un factor importante en el aumento de daño a la mucosa en la infección por *H. pylori*.

El gen A de esta citotoxina vacuolante se presenta en todas las cepas de *H. pylori*. Existen dos regiones variables en *vacA*. Una se encuentra en la segunda mitad de la secuencia señal (*s1a/s1b* y *s2*) y la otra se encuentra en la región media del gen (*m1* y *m2*). Estudios recientes demuestran la asociación entre la diversidad en este gen y la actividad de la citotoxina que conlleva a un aumento de la inflamación gástrica. Las cepas *s1/m1* muestran una mayor actividad de la toxina *in vitro* que las *s1/m2*, las cepas *m1* se asocian con aumento del daño al epitelio gástrico, mientras que las cepas *s1a* se asocian con mayor infiltración de linfocitos y neutrófilos en la mucosa *in vivo*. Estos resultados sugieren que las cepas *s1a/m1* son el tipo alélico más virulento (Shimoyama y Crabtree, 1998).

Debido a que se han descrito distintos alelos del gen *vacA* de *H. Pylori*, se han realizado estudios de la distribución geográfica tanto de los alelos de este gen como de los del gen *cagA*. Los resultados muestran que en el norte y este europeo se presenta el subtipo *s1a*. En Francia e Italia el subtipo *s1a* y el *s1b*, mientras que en España y Portugal predomina el *s1b*. En América del Norte los subtipos *s1a* y *s1b* tienen una prevalencia equitativa. En Centro y Sudamérica la mayoría de las cepas son subtipo *s1b*. En el este de Asia se observa el subtipo *s1c*. La distribución de los alelos *m1* y *m2a* es equitativa excepto por la península Ibérica y Centro y Sudamérica, donde *m1* es prevalente. El subtipo *m2b* se encuentra exclusivamente en el este de Asia. En todas las partes del mundo, los genotipos *vacA s1/cagA* positivos se asocian a úlceras pépticas (Van Doorn et al., 1999).

Isla de patogenicidad *cag*

CagA codifica una proteína inmunodominante de alto peso molecular (120-140 kDa), la cual se encuentra presente en aproximadamente 60% de las cepas de *H. pylori*. *In vivo*, la infección con cepas *cagA* positivas da como resultado un aumento de las respuestas inmunes de la mucosa lo que lleva a gastritis más intensas. También se ha asociado con úlceras pépticas, gastritis atrófica y cáncer gástrico. Se ha demostrado que *cagA* es parte de una isla de patogenicidad de 40 kilobases que contiene alrededor de 30 genes. Se piensa que las proteínas codificadas por la isla *cag* funcionan como un sistema de secreción para la exportación de factores bacterianos involucrados en la activación epitelial del hospedero (Shimoyama y Crabtree, 1998). Los genotipos (*cagA* positivo, *vacA* tipo *s1*) se han asociado con resultados clínicos más severos o respuestas diferentes a la terapia anti-*H. pylori*.

Alcohol deshidrogenasa

H. pylori produce alcohol deshidrogenasa (ADH), esta enzima le permite producir energía bajo condiciones anaeróbicas. La ADH cataliza el último paso de la fermentación de glucosa a etanol así como la transformación de etanol a acetaldehído. De esta forma el acetaldehído puede acumularse en el tejido gástrico y causar daño, promoviendo la erosión y ulceración de la mucosa (Figura, 1997).

2.4. Respuesta inmune

Histológicamente, la respuesta del hospedero en la infección por *H. pylori* se caracteriza por la infiltración de la mucosa gástrica por células plasmáticas, linfocitos, neutrófilos y monocitos. La respuesta inmune inflamatoria juega un papel importante en la inducción del daño gástrico.

En la gastritis aguda causada por la infección con *H. pylori*, los neutrófilos inician el proceso inflamatorio como respuesta al patógeno. Los neutrófilos activados tienen muchas propiedades que pueden contribuir al daño tisular. La quimiotaxis y la activación de estas células puede inducirse directamente por productos de *H. pylori* y también indirectamente a través de la cascada de citocinas inflamatorias.

El epitelio gástrico secreta citocinas que tienen propiedades de atracción de neutrófilos, tales como IL-8 y GRO α , en respuesta a la infección bacteriana. *In vitro*, la expresión de IL-8 en células epiteliales gástricas es regulada positivamente por el TNF- α y la IL-1 producidos por la mucosa gástrica en respuesta a la infección por *H. pylori*. Las citocinas inflamatorias se encuentran incrementadas en pacientes infectados por cepas *cagA* positivas.

Se ha informado que el mRNA de la IL-8 y la IL-1 α y β se expresa tempranamente durante la infección, mientras que el TNF α , el GM-CSF y el MCP-1 se expresan tardíamente. Este patrón sugiere que la IL-8 atrae neutrófilos en una fase temprana y posteriormente se activan macrófagos e incrementa la migración de monocitos dentro de la lámina propia de la mucosa gástrica como resultado de la infección (Jung et al., 1997).

Después de la inflamación aguda inicial y los cambios asociados a la permeabilidad gástrica, la exposición continua a los antígenos bacterianos resulta en la generación de una respuesta específica de células T y B hacia *H. pylori*, que también puede contribuir al daño de la mucosa gástrica (Shimoyama y Crabtree, 1998).

Dentro del infiltrado celular que se origina durante la gastritis mediada por *H. pylori*, se presenta una frecuencia considerable de células CD4⁺ TH1 que producen INF γ y se caracterizan por ser citotóxicas, sin embargo no se detectan células de tipo TH2. Se ha observado que el INF γ puede inducir la unión de la bacteria a las células epiteliales gástricas, evento seguido por apoptosis de éstas. Más aún, estudios realizados en ratones han demostrado que la gastritis se reduce en ausencia del INF γ .

En apoyo a estos descubrimientos, se ha detectado la expresión de moléculas B7-1 y B7-2 en biopsias gástricas, las cuales son importantes en la activación de células T. Estos hallazgos han llevado a la idea de que la gastritis mediada por *H. pylori* podría ser considerada como una enfermedad autoinmune, que es iniciada por la bacteria, pero mediada a largo plazo por células TH1 que son citotóxicas para las células epiteliales gástricas. No sólo las células T, sino también las B han sido consideradas responsables de la autoinmunidad potencial durante la infección con *H. pylori*. Se ha observado que los pacientes con gastritis mediada por la bacteria producen autoanticuerpos contra la bomba protónica de las células gástricas parietales, y anticuerpos anticanaliculares (Lohoff et al., 2000).

2.5. Interleucina-8 y *Helicobacter pylori*

Las quimiocinas son un tipo de citocinas que muestran actividad quimiotáctica para los leucocitos. Existen más de 20 miembros de esta superfamilia, y todos ellos se encuentran involucrados directa o indirectamente en respuestas inflamatorias. Las quimiocinas se clasifican en dos grandes familias con base en el arreglo de los primeros dos o cuatro residuos conservados de cisteína. En las quimiocinas C-X-C, las dos primeras cisteínas se encuentran separadas por un aminoácido (X), mientras que en las C-C, éstas se encuentran adyacentes una a otra.

En general, las quimiocinas C-X-C muestran actividades quimiotácticas para neutrófilos pero no para monocitos, mientras que las C-C son quimiotácticas para monocitos y linfocitos, pero no tienen efecto en neutrófilos. El primer grupo incluye IL-8 y GRO α , mientras que el segundo incluye RANTES, MCAF, MIP-1 α y MIP-1 β .

IL-8 es un modulador clave de la inducción de migración y activación de neutrófilos en la mucosa gástrica infectada por *H. pylori*. Es producida por las células epiteliales gástricas en respuesta a la infección, y su expresión es inducida por la adhesión de la bacteria a la superficie celular. Múltiples genes contenidos en la isla de patogenicidad *cag* parecen estar involucrados en inducir la respuesta epitelial de IL-8 por la adhesión del *H. pylori*. La activación del factor de transcripción nuclear- κ B (NF- κ B) se ha asociado con esta respuesta. Los intermediarios reactivos de oxígeno, cuya producción se incrementa en la infección por la bacteria podrían también modular la expresión de esta interleucina en la mucosa gástrica (Shimada y Terano, 1998).

Las cepas de *H. pylori* que poseen la isla de patogenicidad *cag* inducen gastritis más severa y aumentan el riesgo de desarrollar úlcera péptica y cáncer gástrico. Un mecanismo específico mediante el cual las cepas *cagA* positivas podrían ejercer este efecto es mediante la regulación de la producción de IL-8. En contacto con células epiteliales gástricas, *H. pylori* activa múltiples cascadas de señales de transducción que regulan la secreción de IL-8, incluyendo el NF- κ B y proteincinasas, eventos que dependen de la presencia de genes en la isla *cag* (Peek, 2001).

Varios estudios han demostrado que las cepas *cagA* positivas de *H. pylori*, pero no las *cagA* negativas inducen la secreción de IL-8 tanto *in vivo* como *in vitro*. Más aún, la mutagénesis de genes de la isla de patogenicidad *cag* suprime la habilidad de inducción de la IL-8, por lo que estos genes han sido asociados con la capacidad de inducción de inflamación de la bacteria. Sin embargo *cagA* por sí solo no parece ser un marcador del poder inflamatorio de *H. pylori* (Audibert et al., 2000).

Utilizando homogenados de tejido, se han demostrado niveles elevados de IL-8 en la mucosa gástrica de pacientes con infección por *H. pylori*. Mediante el método de ELISA, los niveles de IL-8 correlacionan con la severidad histológica de la gastritis asociada a la infección.

El gen *pic B*, que se encuentra cerca de la isla de patogenicidad *cag*, es esencial para la inducción de la expresión de IL-8 por células epiteliales gástricas *in vitro*. Las cepas de *H. pylori* que contienen el gen *pic B*, también expresan *cagA in vivo*.

Se ha informado que las biopsias gástricas de pacientes infectados por cepas *cagA* positivas muestran infiltración de monocitos y polimorfonucleares más severa, coexpresando RNAm de IL-8 y óxido nítrico sintetasa inducible (ONSi). La IL-8 y el exceso de óxido nítrico (ON) pueden jugar un papel importante en la patogénesis de las enfermedades duodenales asociadas a *H. pylori* (Li et al., 2000).

2.6. Óxido nítrico y *Helicobacter pylori*

El ON es una molécula lipofílica altamente difusible, cuyas acciones dependen tanto de su concentración como forma dentro de la célula. La bioquímica del ON radica en que cuenta con un electrón libre, lo que lo hace un radical libre estable. La estabilidad del ON depende de su concentración y su vida corta en los sistemas biológicos es de segundos.

A pesar de que el ON por sí mismo no interactúa con proteínas o ácidos nucleicos, puede combinarse directamente con especies locales aceptoras de electrones para formar especies reactivas de ON (ERON), tales como ON_2 , N_2O_3 y N_2O_4 . Estas especies reactivas se forman cuando el ON reacciona con radicales oxígeno o superóxido. Estas ERON pueden causar lesiones por reacciones oxidativas posteriores con proteínas en el tejido. En algunas situaciones, las reacciones de ERON pueden inducir la muerte celular.

Bajo condiciones de estrés que semejan condiciones inflamatorias o patológicas, el ON puede combinarse con O_2^- para formar peroxinitrito (ONOO^-). El peroxinitrito es una ERON nucleofílica muy potente, capaz de nitrar compuestos que contienen fenol tales como los residuos de tirosina en las proteínas. El peroxinitrito puede inducir daño en el DNA, lipoperoxidación y degradación de proteínas que pueden llevar a daño y eventualmente muerte de la célula.

La familia de ON sintasas se encuentra conformada por tres distintas isoformas. Todas median la oxidación de L-arginina a citrulina y ON. Las isoformas neuronal (ONSn) y la endotelial (ONSe) son expresadas constitutivamente y reguladas a nivel post-transcripcional. Un mecanismo de activación de las ONS constitutivas involucra la unión de calmodulina a la enzima seguido por un incremento del nivel del calcio libre intracelular.

La tercera isoforma es conocida como sintetasa inducible de ON (ONSi) y se encuentra regulada a nivel transcripcional y es independiente de calcio. En varios sistemas celulares, se ha observado que la ONSi es regulada positivamente por el $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ y el LPS, vía segundos mensajeros como NF- κ b, AP-1 y cAMP resultando en la producción de ON.

El ON contribuye a la modulación de funciones fisiológicas claves en el sistema digestivo, pero también puede actuar como mediador crítico de daño tisular en varios desórdenes intestinales. Esto puede explicarse por la habilidad de las diferentes concentraciones de ON para producir efectos completamente opuestos en el mismo tejido. Es decir, si el ON se produce en pequeñas cantidades, ejerce efectos benéficos, mientras que la producción de altas cantidades de ON puede ser perjudicial.

Las acciones del ON derivadas de ONSn y ONSe involucran interacciones con grupos hemo, tales como la guanilil ciclasa soluble. Del mismo modo, el ON derivado de estas isoformas constitutivas actúa como antioxidante en eventos agudos tales como la isquemia-perfusión. Es un regulador importante de la secreción de moco en el estómago y su efecto se produce vía la estimulación de la guanilil ciclasa en las células epiteliales.

El ON es un mediador importante en el tono vascular en el tracto gastrointestinal, como en todo el cuerpo. Causa relajación del músculo liso vascular, aumentando el flujo sanguíneo como resultado de la dilatación de arteriolas submucosas.

Por otra parte, el ON derivado de ONSi se encuentra involucrado en la respuesta del huésped mediada por una gran variedad de óxidos de nitrógeno (Wallace y Miller, 2000)

El ON se encuentra en el estómago humano inflamado, así como en los tumores gastrointestinales, lo que sugiere que la producción de óxido nítrico debida a ONSi tiene un papel patológico. Asimismo, se ha demostrado que la expresión de ONSi en la mucosa gástrica disminuye después de la erradicación de *H. pylori* (Antos et al., 2001).

En sus investigaciones, Son et al. reportan que no se observa correlación entre la infección por *H. pylori* y la expresión de ONSi en tejido gástrico. Sin embargo, estudios recientes muestran que su expresión es significativamente mayor en muestras *H. pylori* positivas que en negativas. Ellos explican que esta diferencia podría deberse a fallas metodológicas en la detección de la bacteria y al tipo de cepa de *H. pylori* que se presenta en la región geográfica de estudio.

El gen para ONSi contiene un sitio de unión para el NF- κ B, y se ha demostrado que *H. pylori* es capaz de estimular la activación de este factor e inducir apoptosis en células epiteliales gástricas AGS. Así mismo, la infección por la bacteria incrementa la expresión de ONSi y la producción de nitritos en estas células, mientras que la inhibición de la activación del NF- κ B bloquea la expresión del gen y la producción de nitritos en las células AGS estimuladas por *H. pylori*. Estos resultados indican que la bacteria puede activar al NF- κ B e inducir la expresión de ONSi, aumentando la producción de ON y causando apoptosis en células epiteliales gástricas (Lim et al., 2001).

Del mismo modo, Watanabe et al., sugieren que *H. pylori* induce apoptosis en células epiteliales gástricas vía óxido nítrico y que la expresión de ONSi juega un papel importante en el daño a las células.

2.7. Etanol y *Helicobacter pylori*.

Al ingerirse una gran cantidad de alcohol, la mucosa gástrica se daña presentando eritema y ulceraciones superficiales. Este efecto es revertido con la abstinencia. Los pacientes alcohólicos muestran una incidencia mayor de desarrollo de gastritis crónica en el antro. Así mismo, la infección por *H. pylori* es más común en personas que beben grandes cantidades de alcohol.

Una consecuencia del metabolismo del alcohol en el estómago es la producción local de acetaldehído, sustancia altamente reactiva, que podría afectar la mucosa. Sin embargo, existe gran controversia sobre si el alcohol realmente puede causar gastritis crónica en el hombre (Lieber, 1997).

A pesar de que el moco protege a la mucosa gástrica contra el etanol, una fracción del etanol ingerido es metabolizado, por lo que la mucosa puede estar expuesta al etanol en concentraciones que dependen de la calidad (estructura) y a la cantidad (grosor) de la capa de moco. Más aún, existen reportes de que el moco no protege en contra del etanol así como de otros agentes dañinos exógenos tales como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, ya que se ha demostrado que pueden penetrar la barrera causando, a altas concentraciones, exfoliación epitelial (Blasiak et al., 2000).

Se ha encontrado que la ingesta de alcohol precedente a la infección de *H. pylori* promueve la progresión de la inflamación de la mucosa gástrica (Suzuki et al., 1999) y que la incubación de células de la mucosa gástrica con etanol aumenta la producción de aniones superóxido y radicales hidroxilo en comparación con células no tratadas (Bagchi et al., 1999).

Bujanda et al. Reportaron que el consumo de alcohol facilita el desarrollo de gastritis superficial y crónica atrófica, así como el desarrollo de cáncer orofaríngeo, esofágico, gástrico y de colon. Por otra parte, se ha mencionado que el consumo moderado de alcohol puede favorecer la supresión y eventual eliminación de *H. pylori*. Sin embargo, a mayor nivel de consumo, el efecto antimicrobiano podría revertirse debido a los efectos adversos sistémicos generados (Bremner et al., 2000).

2.8. Vitamina C y *Helicobacter pylori*

La vitamina C comprende dos formas, el ácido dehidroascórbico y el potente antioxidante ácido ascórbico. El ácido ascórbico es un sólido cristalino blanco muy soluble en agua. Contiene dos grupos ionizables con valores de pKa de 4.25 y 11.8 respectivamente, por lo que el ascorbato es la forma predominante en la mayoría de los compartimentos corporales excepto en el jugo gástrico.

El ascorbato es sintetizado por plantas y muchos animales, sin embargo los primates (incluyendo humanos), los cerdos de guinea y algunos peces no logran su síntesis debido a que no cuentan con la enzima gulonolactona oxidasa que cataliza la última reacción en la biosíntesis de este compuesto.

El ascorbato es un buen agente reductor, la donación de un electrón da lugar al radical semidehidroascorbato (ascorbil), mientras que la pérdida de un segundo electrón convierte este radical a dehidroascorbato, molécula inestable. Existen rutas metabólicas que pueden reciclar el radical ascorbil y el dehidroascorbato a ascorbato usando NADH o GSH como fuentes de poder reductor. El dehidroascorbato también puede descomponerse no enzimáticamente generando gran diversidad de productos.

El radical ascorbil es muy poco reactivo, esta pobre actividad es la esencia de los efectos antioxidantes del ascorbato. El ascorbato puede reducir radicales libres muy reactivos como $RO^\bullet$, $RO_2^\bullet$, $OH^\bullet$, $ON_2^\bullet$, así como interaccionar con varias especies reactivas no radicales como el ácido hipocloroso, el ozono, y agentes nitrantes derivados del peroxinitrito (Halliwell et al., 2001).

La vitamina C, además de interaccionar con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, es capaz de regenerar otras moléculas antioxidantes como el α -tocoferol, el glutatión (GSH), el urato y el β -caroteno, a partir de sus respectivas especies radicales. Es un antioxidante efectivo por diversas razones, tanto el ascorbato como el radical ascorbil tienen bajos potenciales de reducción y pueden reaccionar con la mayoría de los radicales y oxidantes biológicamente relevantes. Además, el radical ascorbil muestra baja reactividad debido a la estabilidad que proporciona la resonancia del electrón no apareado.

Otra importante función biológica de la vitamina C es su interacción con iones de metales de transición con actividad redox, tales como hierro y cobre. La reducción de estos iones por el ascorbato podría tener efectos deletéreos debido a la producción de radicales hidroxilo o radicales lipoxil (LO $\bullet$) por la reacción de los iones metálicos reducidos con peróxido de hidrógeno o lipohidroperóxidos (LOOH). A pesar de que esta reacción de

Fenton ocurre *in vitro*, su relevancia *in vivo* ha sido motivo de controversia, siendo la disponibilidad de los iones metálicos catalíticos *in vivo* el punto de debate. Se piensa que los niveles de los iones metálicos libres son muy reducidos debido a que son secuestrados por proteínas que unen metales tales como ferritina, transferrina y ceruloplasmina. Sin embargo, durante el daño tisular, los iones metálicos podrían liberarse de sus compartimentos y subsecuentemente interaccionar con el ascorbato.

Carr y Frei (1999) mencionan que aparentemente la vitamina C no actúa como pro-oxidante bajo condiciones fisiológicas, ya que de 44 estudios *in vivo*, 38 muestran una reducción en marcadores de daño oxidativo en DNA, lípidos y proteínas, en 14 estudios no se encontró cambio y solamente 6 mostraron un incremento en el daño oxidativo después de suplementos con vitamina C. Varios de estos estudios muestran una combinación de efectos dependiendo de los sistemas de estudio o los diseños experimentales. Aún en la presencia de fierro, la vitamina C reduce el daño oxidativo *in vivo*, a pesar de sus conocidas propiedades pro-oxidantes en sistemas amortiguadores que contienen este metal.

Por otra parte, Song et al., han demostrado que el ascorbato puede actuar como pro-oxidante, pero el mecanismo mediante el cual este compuesto induce acción oxidativa y apoptosis no está bien establecido. Estudios realizados por este grupo muestran una acción oxidante del ascorbato en células PC12 y cortes de cerebro, donde parece estar involucrado el reciclamiento de ascorbato.

Los procesos de reducción de dehidroascorbato citosólico (por la dehidroascorbato reductasa o por reacciones químicas) causan oxidación de componentes celulares vitales y este estrés oxidativo podría disparar apoptosis. Se piensa que el dehidroascorbato es transportado eficientemente dentro de las células vía un transportador de glucosa (GLUT). Las observaciones de estos investigadores soportan la hipótesis de que el ascorbato es oxidado a dehidroascorbato por oxígeno en solución (medio de cultivo o plasma) y el dehidroascorbato es transportado dentro de las neuronas mediante GLUT donde se reduce nuevamente a ascorbato generando estrés oxidativo. Además una cantidad elevada de dehidroascorbato en la célula es un factor crítico para la generación del estrés, debido a que los mecanismos encargados de combatirlo podrían no ser suficientes.

En el tejido gástrico, las concentraciones de ácido ascórbico son varias veces más elevadas que en el plasma o jugo gástrico y éstas no se encuentran afectas por la enfermedad, lo que sugiere que los niveles de vitamina C en el jugo gástrico en individuos normales son alcanzados vía un sistema de transporte transepitelial. El ácido ascórbico se acumula en la mucosa gástrica desde el plasma en contra de un gradiente de concentración mientras que es liberado hacia el jugo gástrico a favor de gradiente (Waring et al., 1998).

Los niveles de ácido ascórbico en el jugo gástrico se encuentran disminuidos en pacientes con gastritis infectados por *H. pylori*. Esta condición podría exacerbar el daño oxidativo, ya que la bacteria induce daños al DNA y, por lo tanto mutaciones, como resultado del incremento en la actividad de especies reactivas de oxígeno en la mucosa gástrica (Everett et al., 2001). Además, se ha observado que las cepas *cagA+* de *H. pylori* producen más oxirradicales y una gran acumulación de neutrófilos (Suzuki et al., 1999).

El daño en la gastritis asociada a *H. pylori* puede ser causado directamente por la bacteria o ser resultado de la reacción inflamatoria. Si ocurriera lo último, la destrucción celular por especies reactivas de oxígeno (liberados por leucocitos polimorfonucleares y otras células inflamatorias) podría estar involucrada. Esto es particularmente importante debido a que la producción de radicales libres y la lipoperoxidación están fuertemente

ligados al daño tisular, formando parte de la patogénesis de las lesiones crónicas y posiblemente del cáncer.

Entre los factores que previenen el daño peroxidativo, la vitamina C es de los más importantes, ya que también puede prevenir la síntesis de compuestos nitrosos en el estómago, protegiendo la mucosa gástrica de los daños oxidativos asociados a estos compuestos.

Los bajos niveles de ácido ascórbico en pacientes con gastritis pueden deberse a una secreción reducida, al aumento en la oxidación o utilización debido a la inflamación, al consumo de *H. pylori* o a la combinación de estos factores.

Se ha demostrado que la atrofia gástrica producida por la infección por *H. pylori* se refleja principalmente en la reducción de los niveles de vitamina C en el jugo gástrico, ya que los niveles de ésta no se recuperan después de la erradicación de la bacteria (Farinati et al., 1996).

Se ha demostrado que *H. pylori* es capaz de degradar el ácido ascórbico. Esta actividad puede deberse a la oxidación de este compuesto, ya que la degradación puede inhibirse mediante el compuesto reductor DTE y la concentración de ácido dehidroascórbico generado es proporcional al ácido ascórbico degradado. Debido a que *H. pylori* es oxidasa positivo, se ha propuesto que la oxidación del ácido ascórbico se lleve a cabo en una molécula de tipo citocromo C (Odum y Andersen, 1995).

Estudios en diversas poblaciones han demostrado que una alta ingesta de alimentos ricos en vitamina C se asocia con una reducida incidencia de cáncer gástrico. Pacientes que han recibido suplementos de ácido ascórbico muestran aumento en su concentración en plasma, jugo gástrico y en las células del tracto gastrointestinal. Sin embargo, en los pacientes con gastritis, los niveles de ácido ascórbico son aún menores con el suplemento. Esto sugiere que el efecto protector de la vitamina C puede mejorarse si la gastritis es tratada (Waring et al., 1996).

Así mismo, se ha demostrado que la concentración del radical ascorbil es mayor en pacientes con gastritis asociada a *H. pylori* comparada con sujetos con histología gástrica normal, lo que reitera el papel protector del ácido ascórbico, ya que actúa como "amortiguador" de los radicales libres generados (Drake et al., 1996).

3. Justificación

Helicobacter pylori es considerado el agente etiológico de la gastritis y de las úlceras pépticas y es un factor de riesgo para el desarrollo del adenocarcinoma gástrico. Se ha postulado que el daño a la mucosa gástrica que ejerce la bacteria se debe en gran parte a la inflamación que produce, ya que las células gástricas liberan citocinas capaces de activar neutrófilos los cuales generan grandes cantidades de radicales libres. Se ha propuesto que la vitamina C interacciona con los radicales libres generados, disminuyendo el daño. Por el contrario, el etanol parece intensificar la reacción de inflamación. Sin embargo, no se han realizado estudios *in vitro* sobre el perfil de secreción de interleucina-8 y producción de óxido nítrico en presencia de estos dos agentes en células infectadas por *H. pylori*. En México, estos dos agentes tienen gran impacto en la población ya que ambos son consumidos en altas dosis, y estos estudios podrían explicar las manifestaciones clínicas de los sujetos infectados por la bacteria.

4. Objetivos

4.1. General

Evaluar el efecto del etanol y de la vitamina C sobre la secreción de interleucina-8 y de óxido nítrico de células epiteliales gástricas expuestas a *Helicobacter pylori in vitro*.

4.2. Particulares

- Evaluar el efecto del etanol en la secreción de IL-8 y óxido nítrico en células epiteliales gástricas expuestas a *H. pylori in vitro*.
- Evaluar el efecto de la vitamina C en la secreción de IL-8 y óxido nítrico en células epiteliales gástricas expuestas a *H. pylori in vitro*.
- Evaluar el efecto combinado de la vitamina C y del etanol en la secreción de IL-8 y óxido nítrico en células epiteliales gástricas expuestas a *H. pylori in vitro*.

5. Hipótesis

Debido a que el etanol puede promover la progresión de la inflamación de la mucosa gástrica, la secreción de interleucina-8 será mayor en la exposición de células epiteliales gástricas a *H. pylori*. Así mismo, la producción de óxido nítrico aumentará en las células expuestas al etanol y a la infección con *H. pylori* debido al estrés oxidativo que producen estos factores.

La vitamina C, potente antioxidante, será capaz de interaccionar con los radicales libres generados en la exposición a *H. pylori*, disminuyendo tanto la secreción de interleucina-8 como la producción de óxido nítrico.

La combinación de etanol y vitamina C en las células epiteliales gástricas expuestas a *H. pylori* provocará un efecto amortiguador en la secreción de interleucina-8 y producción de óxido nítrico.

6. Metodología

Este proyecto se realizó en el laboratorio de Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Células de epitelio gástrico

Se cultivaron células de carcinoma gástrico (AGS), proporcionadas amablemente por el laboratorio de la M. en C. Margarita Camorlinga, en medio de cultivo RPMI (GIBCO 1640), suplementado con 10% de suero bovino fetal (BioWhitaker) y 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina GIBCO) en botellas para cultivo celular COSTAR de 250 mL.

Para los experimentos, las células AGS en cultivo fueron tripsinizadas (tripsina GIBCO), lavadas, y contadas en cámara de Neubauer, para obtener 2×10^5 células por mL y fueron sembradas en cajas Petri para cultivo celular de 35 mm.

Exposición a *Helicobacter pylori*

Se utilizó la cepa comercial de *Helicobacter pylori* CCUG 17874. La cepa se inoculó en placas de agar Casman, suplementadas al 10% con sangre de caballo. Las placas se incubaron a 37°C durante 3 días en jarras anaeróbicas en condiciones de microaerofilia (Oxígeno 5%, CO₂ 10% y Nitrógeno 85%). La identificación de la bacteria se realizó en base a los siguientes parámetros: morfología colonial, tinción de Gram, pruebas de oxidasa y ureasa.

Para la exposición a las células, se preparó una suspensión de 2×10^7 bacterias/ml en medio de cultivo RPMI suplementado con suero bovino fetal sin antibióticos.

El primer experimento (n=2) consistió en determinar el menor tiempo en el que la secreción de Interleucina-8 (IL-8) fuera mayor en la exposición de las células AGS a *H. pylori*: 2×10^5 células AGS fueron cultivadas por 24 horas, posteriormente se retiró el medio de cultivo y se agregó 1 mL de la suspensión de *H. pylori*, obteniéndose una relación de aproximadamente 100 bacterias por célula (100:1). Se obtuvieron los sobrenadantes a las 3, 6, 12 y 24 horas y se cuantificó la IL-8 mediante ELISA (Quantikine human IL-8 R&D Systems). El menor tiempo en el que la secreción de IL-8 fue máxima fue a las 6 horas, por lo que los demás experimentos se realizaron a este tiempo.

Así mismo, se realizó un experimento (n=1) en el cual las células AGS fueron expuestas a diferentes concentraciones de *H. pylori*, con el fin de asegurar que la secreción de IL-8 dependía de la bacteria: 2×10^5 células fueron cultivadas durante 24 horas, posteriormente fueron expuestas a la suspensión de *H. pylori* (100:1), y a diferentes diluciones de ésta (1:2, 1:4, 1:10 y 1:20). A las 6 horas se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la IL-8.

Exposición a etanol

Las células AGS con o sin *H. pylori* fueron expuestas a etanol a una concentración 100 mM (n=15). Del mismo modo, se llevó a cabo una curva de exposición de las células AGS a diferentes concentraciones de etanol (25, 50, 100, 150, 250 y 500 mM) con y sin presencia de *H. pylori* (n=1). Se determinó la secreción de IL-8 y de óxido nítrico a las 6 horas.

Exposición a vitamina C

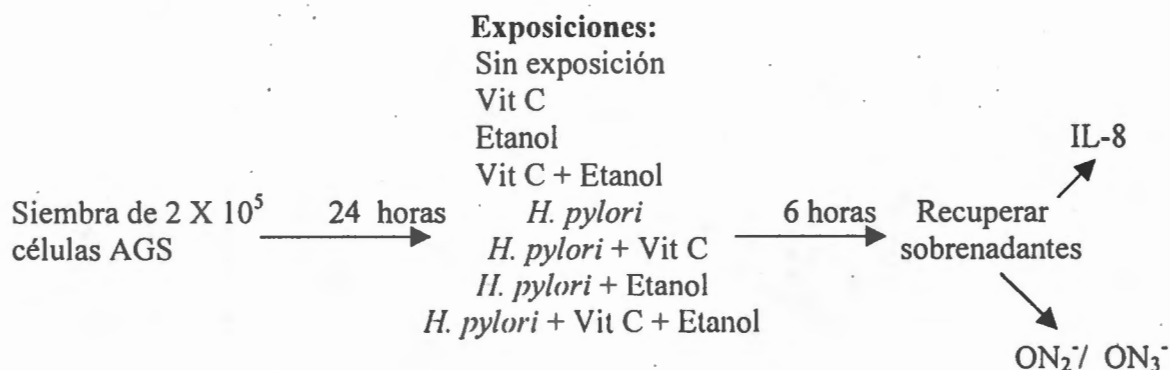
Las células AGS con o sin *H. pylori* fueron expuestas a vitamina C en una concentración 150 µM (n=15). También se realizó la exposición de las células a diferentes concentraciones de vit C 375, 750 y 1500 µM (n=1), recuperándose los sobrenadantes a las 6 horas para determinar IL-8. Adicionalmente, las células fueron expuestas a otro antioxidante conocido, N-acetilcisteína 10 mM (n=1).

Exposición a etanol y vitamina C

Ambos compuestos en las concentraciones antes mencionadas, se adicionaron al medio de cultivo con o sin *H. pylori*, según el caso, de modo que la exposición fuera simultánea (n=15).

Se realizó otro experimento (n=1), en el cual los sobrenadantes de las células AGS con los diferentes tratamientos (vitamina C, etanol y/o *H. pylori*) se recuperaron a las 6, 12, 24 y 36 horas, para determinar IL-8 y óxido nítrico.

Diseño Experimental



Quantikine human IL-8 R&D Systems

Este ensayo emplea la técnica cuantitativa de inmunoensayo enzimático tipo "emparedado". La microplaca se encuentra pre-cubierta con un anticuerpo monoclonal específico para IL-8. Los estándares, las muestras y el conjugado se colocan en los pozos de la placa y cualquier molécula de IL-8 presente es emparedada por el anticuerpo inmovilizado y el anticuerpo policlonal ligado a enzima específico para la citocina. Después de lavar para remover cualquier sustancia y/o reactivo anticuerpo-enzima no unido, se adiciona una solución sustrato a los pozos y se desarrolla color en proporción a la cantidad de IL-8 unida. Al detenerse el desarrollo del color, se mide su intensidad con un espectrofotómetro.

Ensayo Oxido Nítrico ($\text{ON}_2^-/\text{ON}_3^-$) R&D Systems

La naturaleza transitoria y volátil del ON provoca que su detección sea compleja. Sin embargo, la mayoría del ON es oxidado a nitritos y nitratos, por lo que las concentraciones de estos aniones se han utilizado como medida cuantitativa de la producción de ON. Después de la conversión de los nitratos a nitritos se realiza una medición espectrofotométrica de los nitritos utilizando una reacción de Griess.

El ensayo R&D incluye la conversión de nitratos a nitritos por la enzima nitrato reductasa. La detección de nitritos se determina como un producto colorido azo de la reacción de Griess que absorbe en la región visible a 540 nm.

La reacción de Griess se basa en una reacción diazo de dos pasos, en la cual el nitrito acidificado produce un agente nitrosante que reacciona con ácido sulfanílico para producir un ion diazonio. Este ion se acopla con N-(1-Naftil)etilidiamina para formar el derivado azo cromóforo que absorbe a la longitud de onda mencionada.

Manejo estadístico

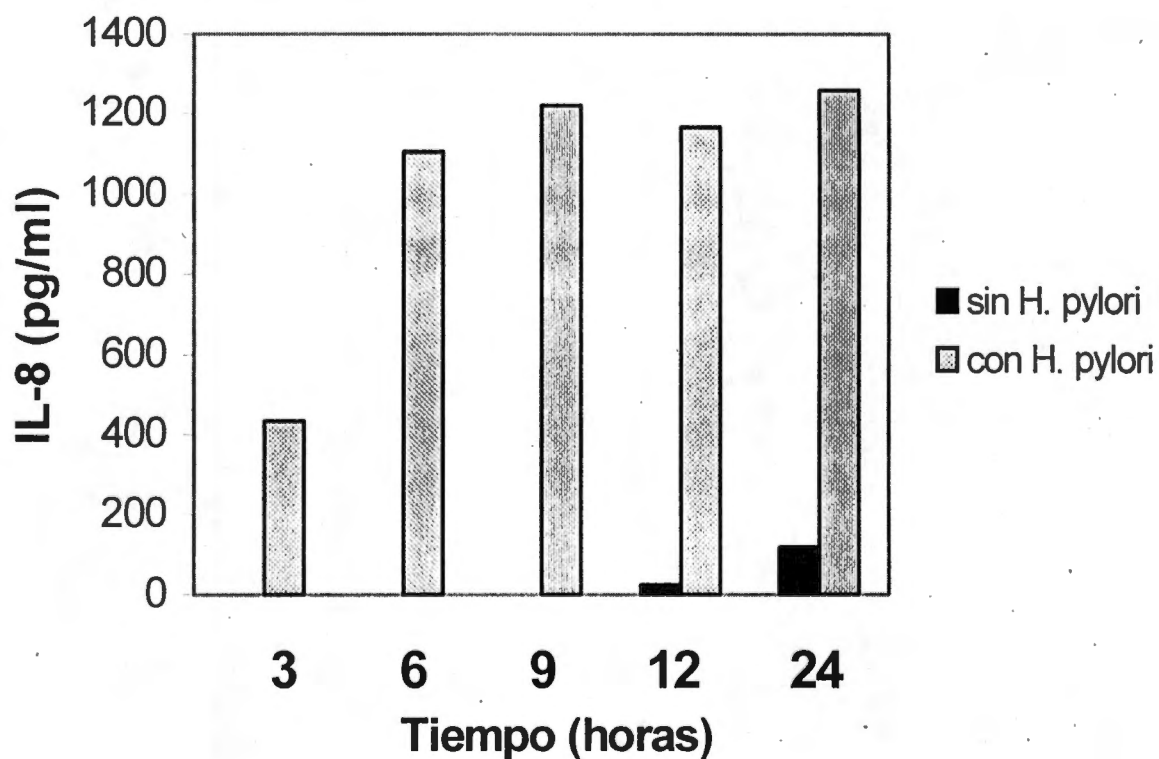
Los datos se resumieron en términos de medianas y cuartiles. Las comparaciones entre exposiciones y control se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

7. Resultados

Exposición a *Helicobacter pylori*

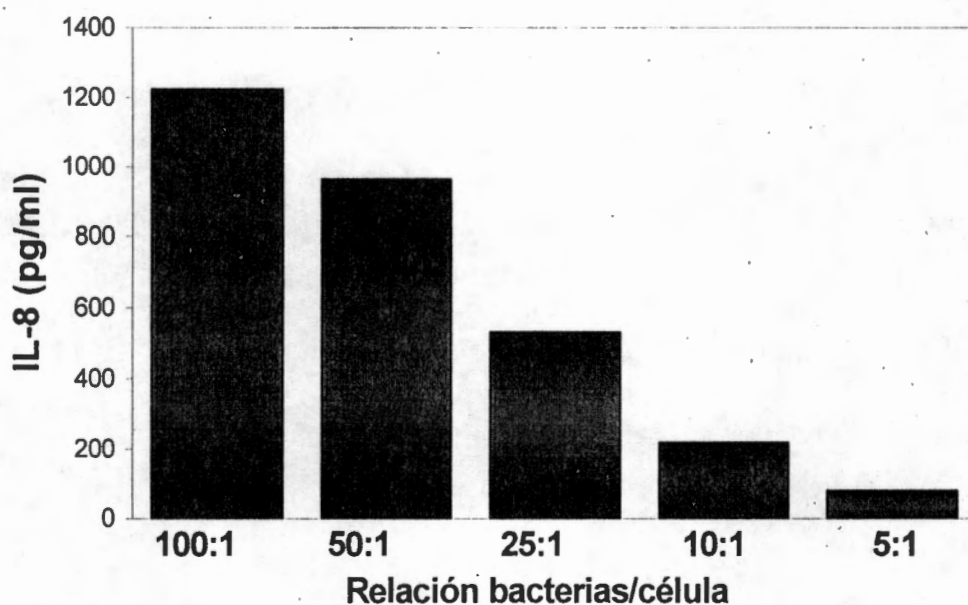
Las células AGS expuestas a *H. pylori* secretaron IL-8 desde las 3 horas, con una mediana igual a 434 pg/mL, incrementándose a las 6 horas, mediana igual a 1103.54 pg/mL, y manteniéndose hasta las 24 horas. En ausencia de *H. pylori*, las células AGS no secretaron IL-8 de manera significativa (Figura 1).

Figura 1. SECRECIÓN DE IL-8 POR CÉLULAS AGS A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN a *H. pylori*



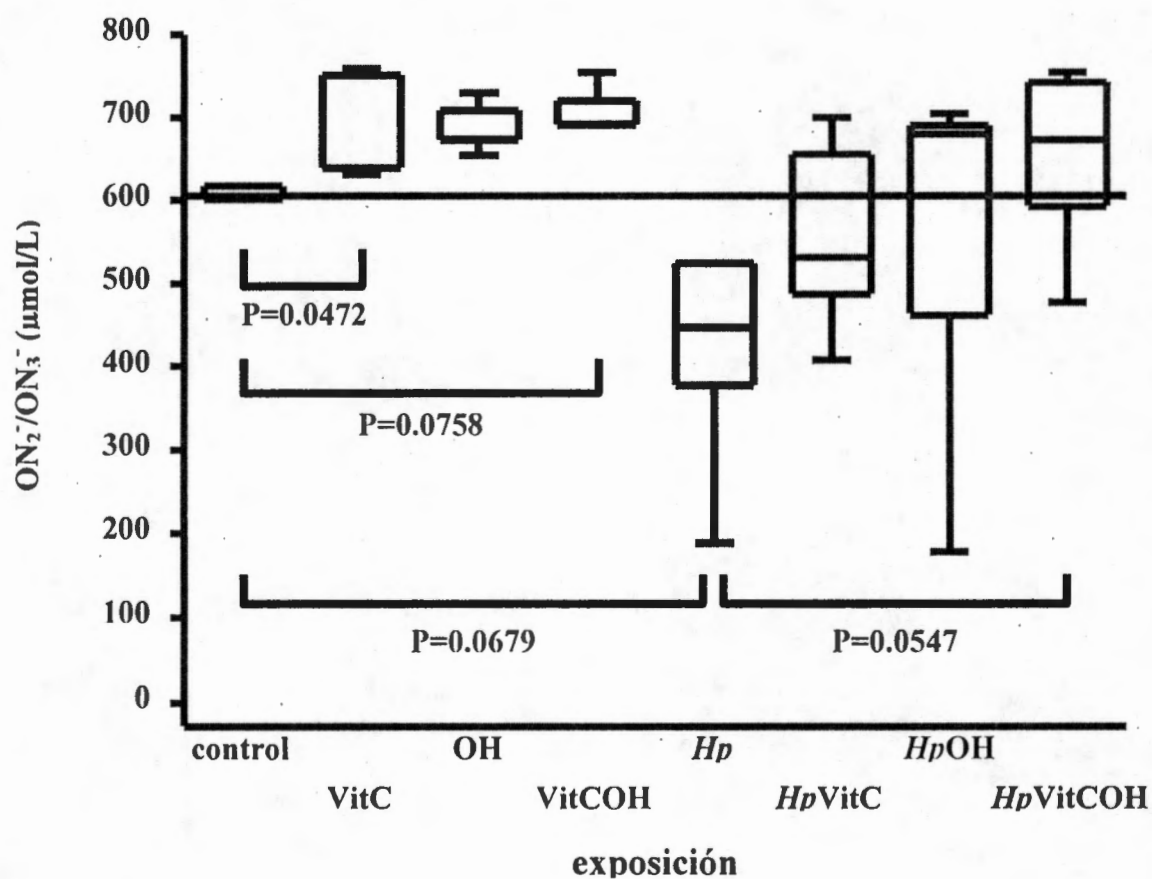
Asimismo, la secreción de IL-8 fue proporcional a la concentración de *H. pylori* con un valor de 1224.02 pg/mL en relación 100:1 (bacterias/célula) y 526.15pg/mL en relación 5:1 (Figura 2).

**Figura 2. SECRECIÓN DE IL-8 POR CÉLULAS AGS
EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *H. pylori***



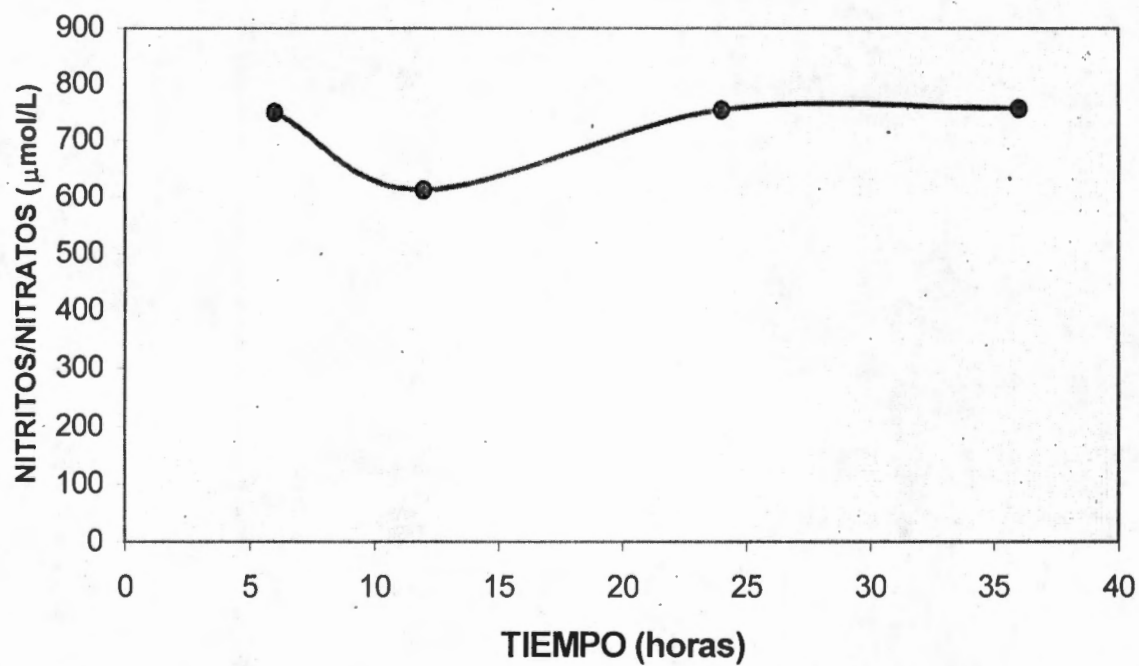
El ON presente en los sobrenadantes de las células AGS expuestas a *H. pylori* (mediana igual a 450 μM) fue significativamente menor al control (mediana igual a 605.46 μM) con $P=0.0679$ (Figura 3).

Figura 3. ON EN SOBRENADANTES DE CÉLULAS AGS SEGÚN EXPOSICIÓN



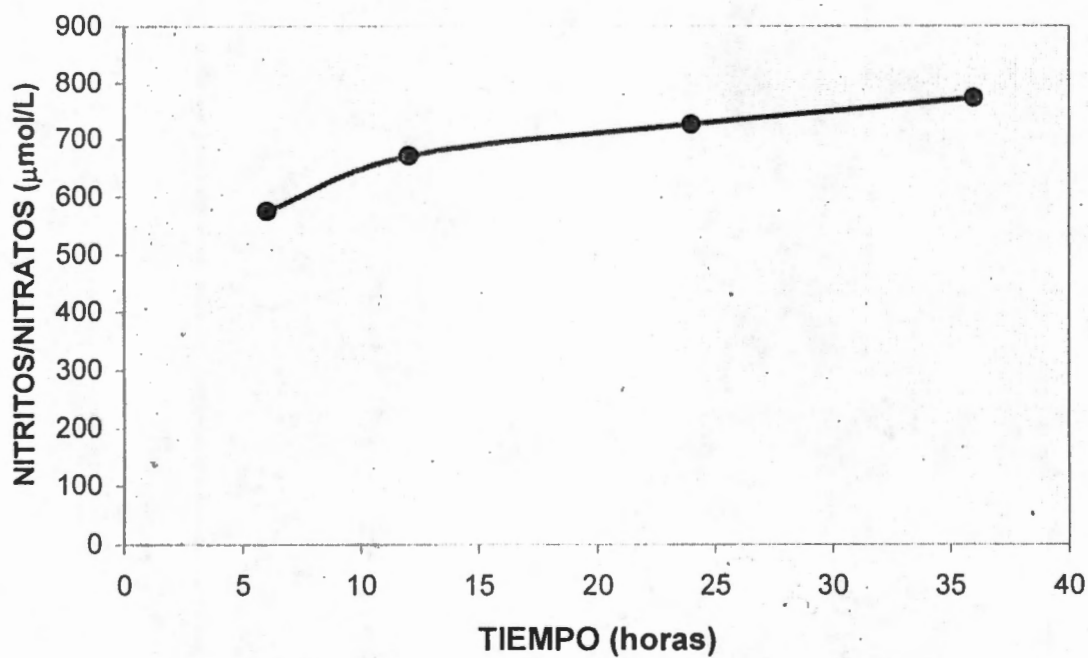
Esta secreción no mostró cambio importante con respecto al tiempo de exposición, valor mínimo de 612.55 μM y valor máximo de 755.91 μM (Figura 4).

FIGURA 4. ON EN SOBRENADANTES DE CÉLULAS AGS A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN A *H. pylori*



Las células AGS, en ausencia de *H. pylori*, mostraron un aumento en el ON respecto al tiempo de cultivo, de 574.84 μM a 772.79 μM (Figura 5).

Figura 5. ON EN SOBRENADANTES DE CÉLULAS AGS A DIFERENTES TIEMPOS DE CULTIVO

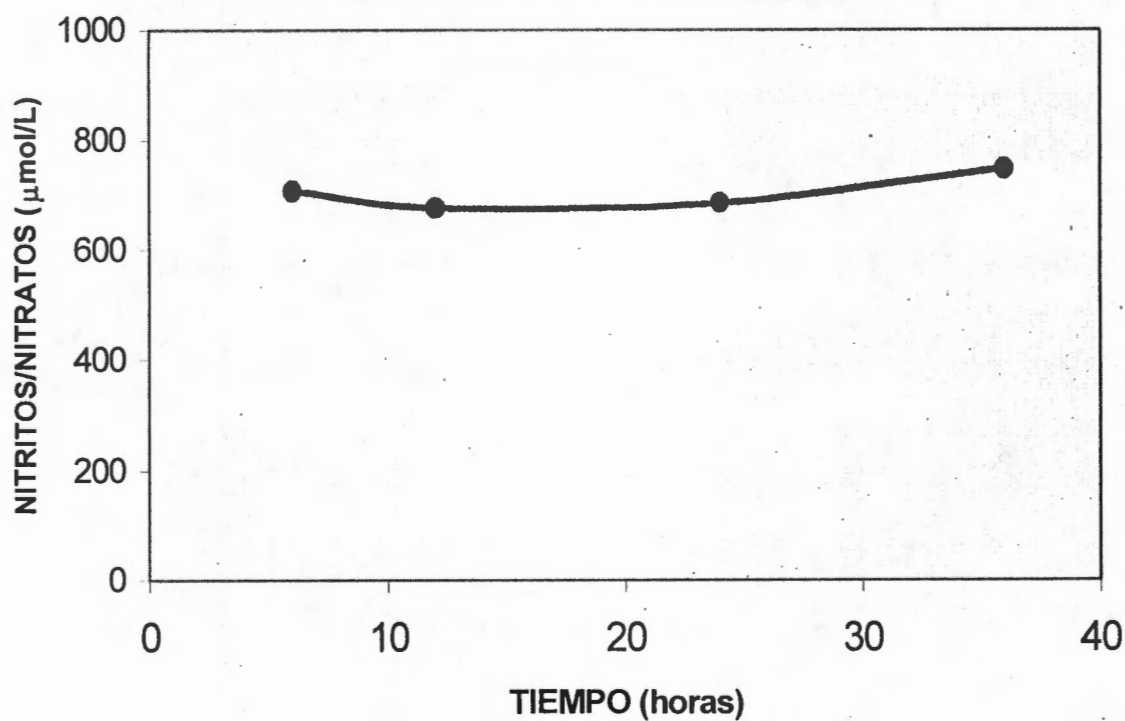


Exposición a etanol

Las células AGS no secretaron IL-8 en presencia de etanol. La mediana de secreción de ON de las células AGS tratadas con etanol fue de $672.97 \mu\text{M}$, con tendencia a ser mayor que el control, mediana igual a $605.46 \mu\text{M}$ (Figura 3).

Se observó que el etanol parece no tener efecto en la secreción de ON respecto al tiempo de exposición, valor mínimo de $677.35 \mu\text{M}$ y valor máximo de $748.31 \mu\text{M}$ (Figura 6).

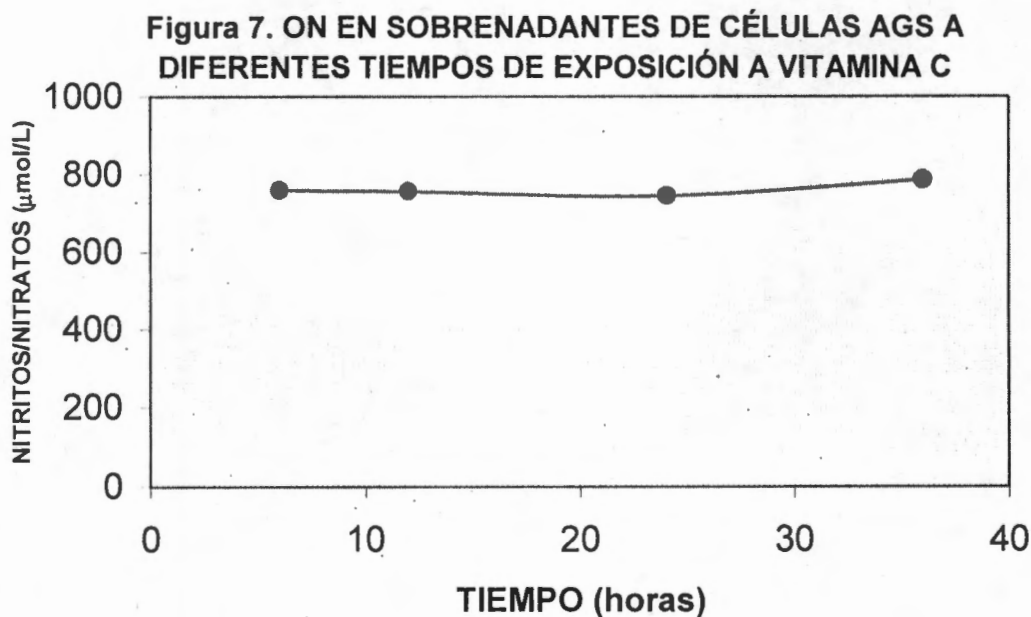
Figura 6. ON EN SOBRENADANTES DE CÉLULAS AGS A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN A ETANOL



Exposición a vitamina C

Las células AGS no secretaron IL-8 en presencia de vitamina C. La adición de vitamina C al medio de cultivo provocó un incremento significativo en la secreción de ON con una mediana de 638.43 μM respecto al control, mediana igual a 605.46 μM y $P=0.0472$ (Figura 3).

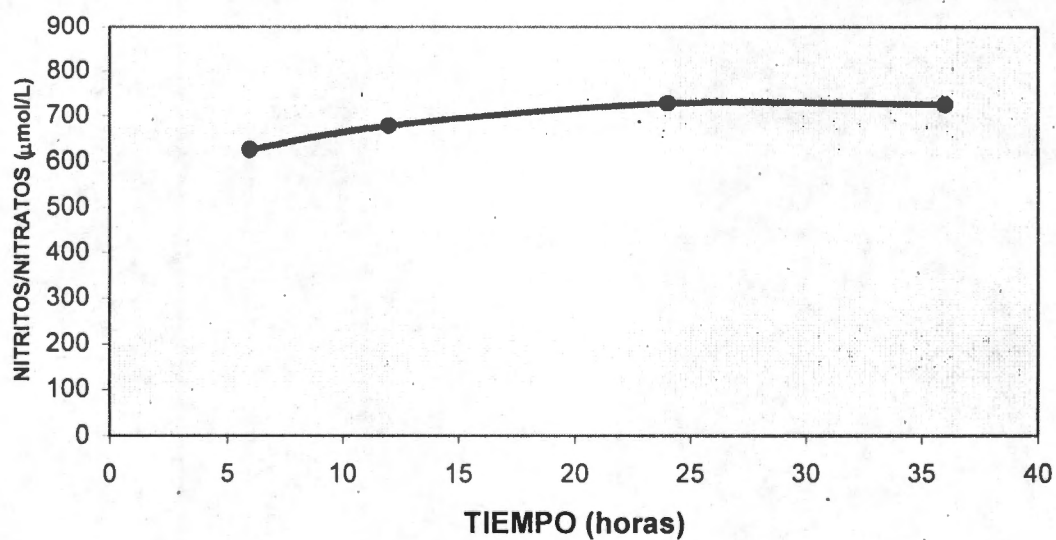
La presencia de vitamina C parece no tener efecto en la secreción de ON con respecto al tiempo de exposición, valor mínimo 744.98 μM y valor máximo 787.85 μM (Figura 7).



La exposición concomitante vitamina C/etanol a las células AGS provocó un aumento significativo en la secreción de ON, mediana de 691.45 μM , con respecto al control, mediana igual a 605.46 μM y $P=0.0758$ (Figura 3).

Así mismo, estos compuestos causaron un incremento en la secreción de ON respecto al tiempo de exposición, valor mínimo de 626.215 μM y valor máximo de 727.89 μM (Figura 8).

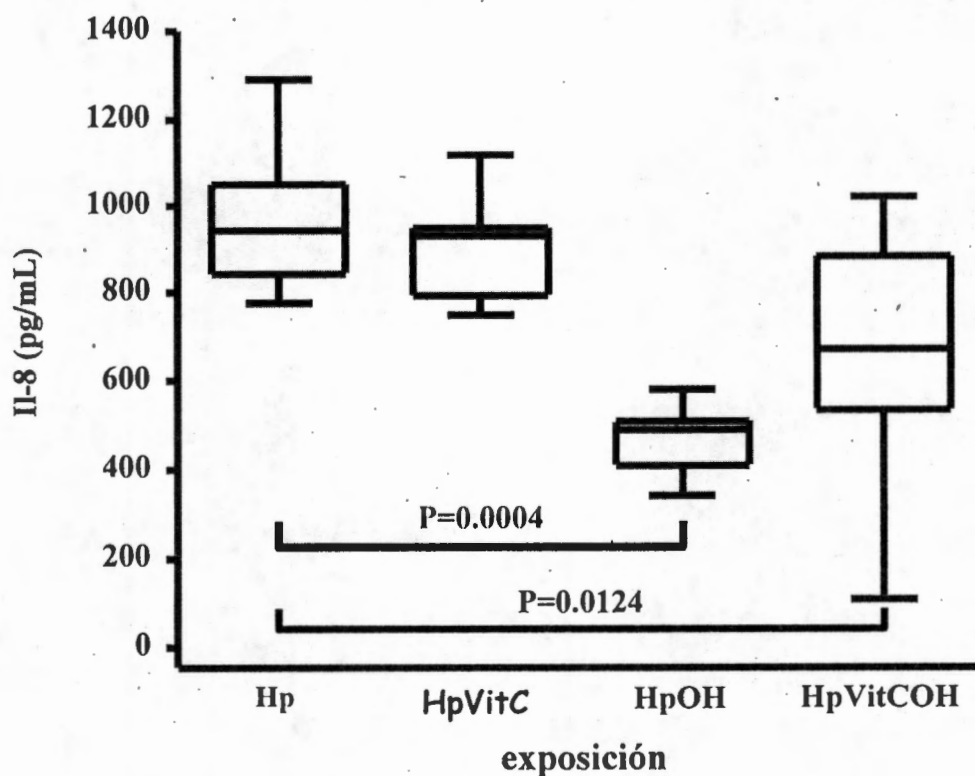
Figura 8. ON EN SOBRENADANTES DE CÉLULAS AGS A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN A ETANOL Y VITAMINA C



Exposición a etanol en presencia de *H. pylori*

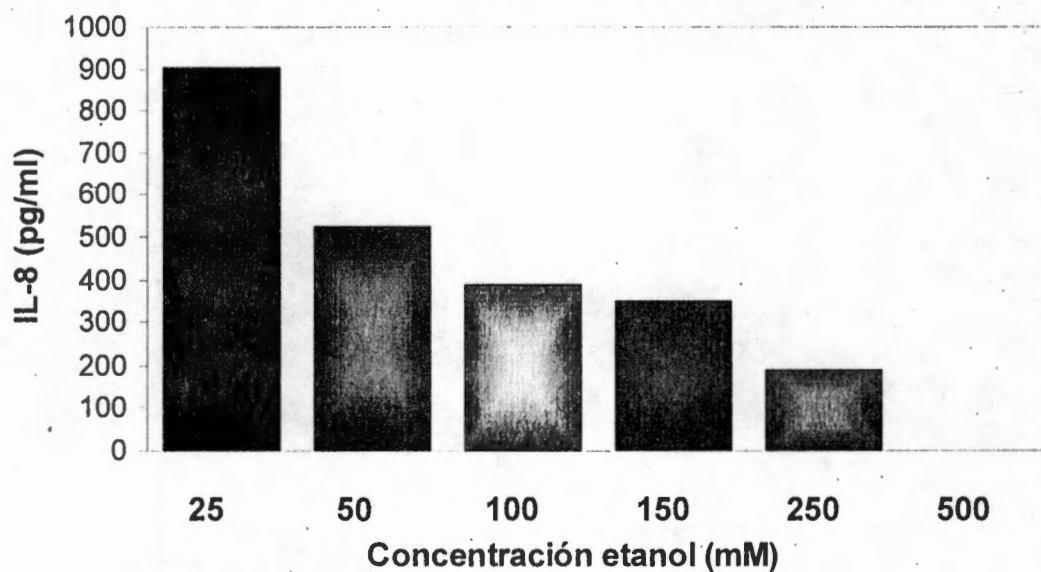
Las células AGS tratadas con etanol expuestas a la bacteria mostraron un decremento significativo en la secreción de IL-8 con respecto al control, de una mediana de 943.83 pg/ml a una mediana igual a 490 pg/ml y $P=0.0004$ (Figura 9).

Figura 9. IL-8 en sobrenadantes de células AGS según exposición



Asimismo, a mayor concentración de etanol, la secreción de IL-8 fue menor (Figura 10).

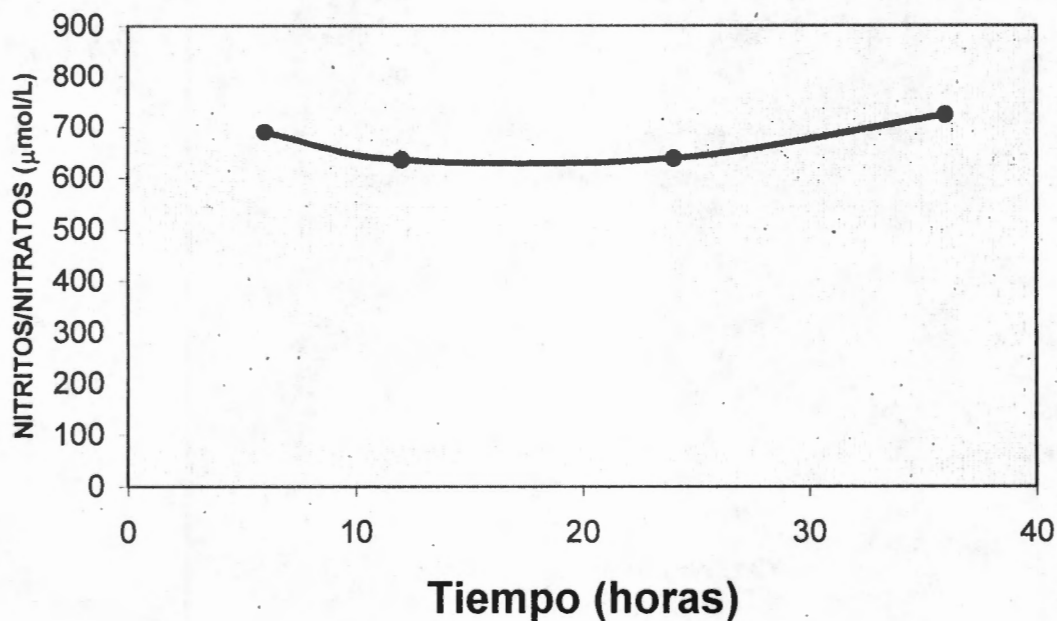
Figura 10. SECRECIÓN DE IL-8 EN CÉLULAS AGS EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL EN PRESENCIA DE *H. pylori*



La secreción de ON en esta exposición fue de una mediana de 650 μ M con tendencia a ser mayor que las células expuestas sólo a la bacteria, mediana igual a 447.81 μ M (Figura 3).

La secreción de ON parece no variar con respecto al tiempo de exposición, valor mínimo de 634.84 y valor máximo de 722.21 μM (Figura 11).

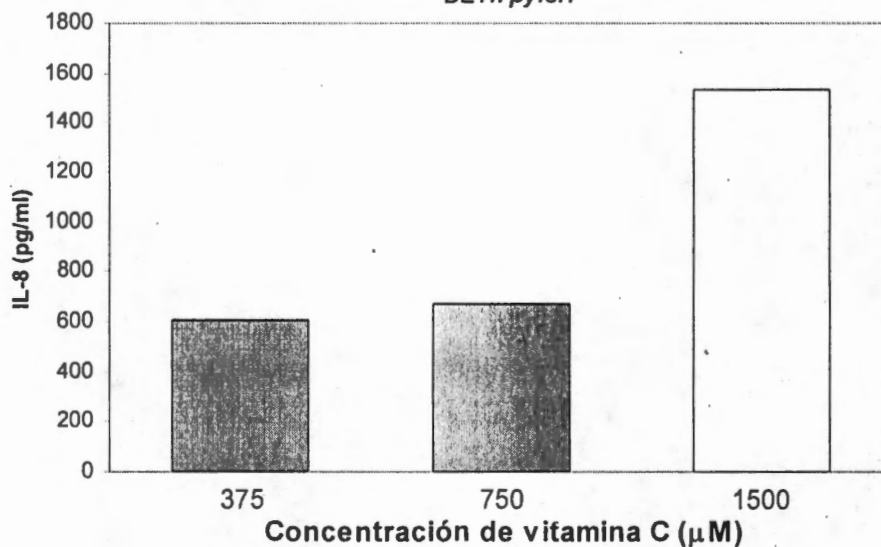
Figura 11. ON EN SOBRENADANTES DE CÉLULAS AGS A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN A ETANOL EN PRESENCIA DE *H. pylori*



Exposición a vitamina C en presencia de *H. pylori*

La exposición de vitamina C a las células AGS en presencia de *H. pylori* no provocó cambio significativo en la secreción de IL-8, mediana igual a 900 pg/mL, respecto al control, mediana igual a 943.83 pg/ml (Figura 9). Sin embargo, el aumento de la concentración de vitamina C causó un incremento en la secreción de la interleucina (Figura 12). La presencia de N-acetilcisteína en el medio de cultivo provocó que la secreción de IL-8 fuera nula.

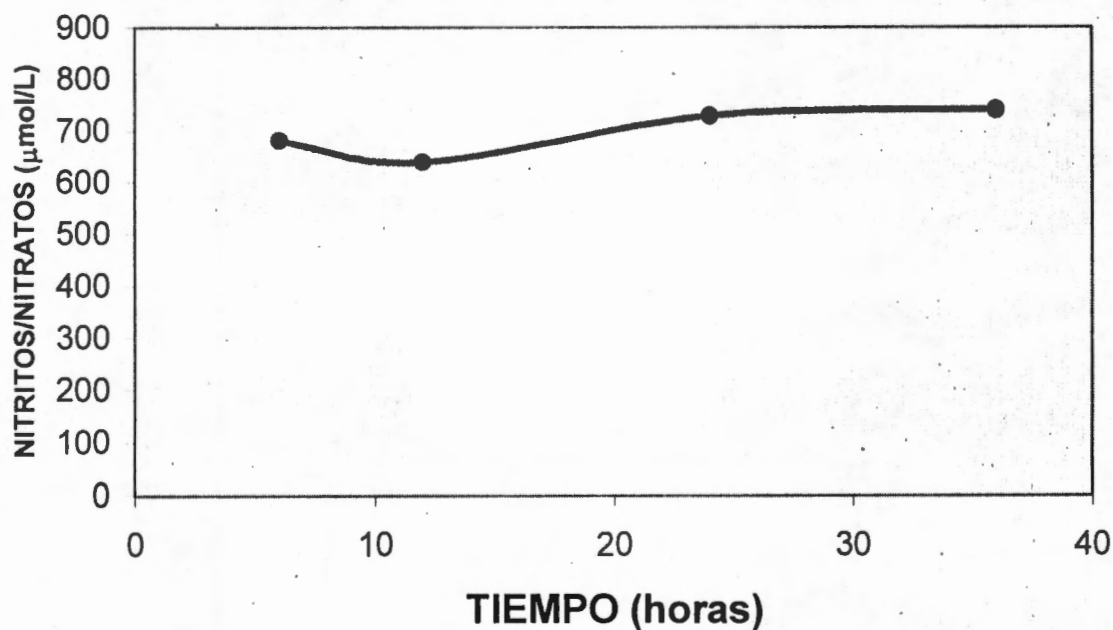
Figura 12. SECRECIÓN DE IL-8 EN CÉLULAS AGS EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VITAMINA C EN PRESENCIA DE *H. pylori*



La mediana de la secreción de ON por efecto de la vitamina C y el *H. pylori* fue de 500 μM , con una tendencia a ser mayor que las células expuestas sólo a la bacteria, mediana igual a 447.81 μM (Figura 3).

Se observó un incremento en la secreción de ON con respecto al tiempo de exposición, valor mínimo de 638.21 μM y valor máximo de 740.94 μM (Figura 13).

Figura 13. ON EN SOBRENADANTES DE CÉLULAS AGS A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN A VITAMINA C EN PRESENCIA DE *H. pylori*

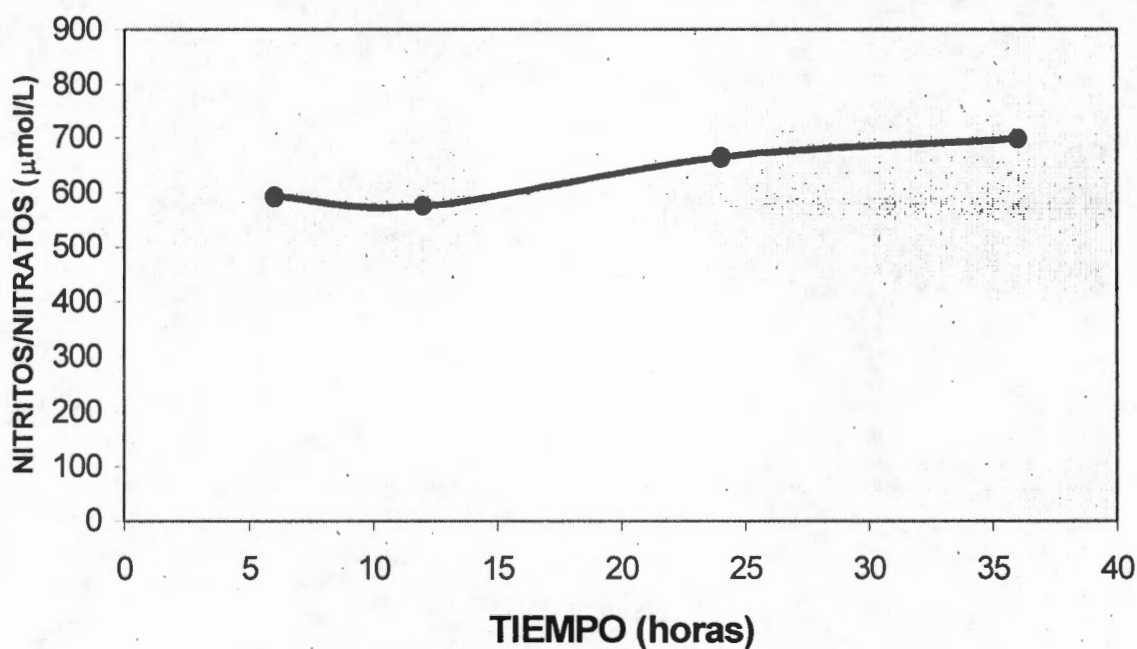


La exposición concomitante vitamina C/etanol en presencia de *H. pylori* provocó un decremento significativo en la secreción de IL-8 en las células AGS, de una mediana de 943.83 pg/ml a una mediana de 671.11 pg/ml y $p=0.0124$ (Figura 9).

Así mismo, se observó un incremento significativo en la cantidad secretada de ON con mediana de 650 μM respecto a las células expuestas sólo a la bacteria, mediana de 447.81 μM y $P=0.0547$ (Figura 3).

La secreción de ON aumentó respecto al tiempo de exposición a etanol y vitamina C en presencia de *H. pylori*, valor mínimo de 574.34 μM y valor máximo de 697.46 μM (Figura 14).

Figura 14. ON EN SOBRENADANTES DE CÉLULAS AGS A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN A ETANOL Y VITAMINA C EN PRESENCIA DE *H. pylori*



8. Discusión

Mediante los experimentos realizados, se confirma que *Helicobacter pylori* es capaz de inducir la secreción de IL-8 en células AGS *in vitro*. Esta capacidad de inducción ha sido relacionada con la presencia de la isla de patogenicidad *cag* y la cepa utilizada en esta investigación fue *cagA/vacA* positiva. La secreción de IL-8 comienza tempranamente desde las 3 horas, alcanzando su umbral máximo a las 6 horas y manteniéndose hasta las 24 horas. En ausencia de *H. pylori*, las células AGS secretan IL-8, aún con la adición de etanol y/o vitamina C.

La exposición simultánea de células AGS a *H. pylori* y etanol ocasionó un decremento significativo en la secreción de IL-8 con respecto a la observada con la exposición a *H. pylori* solo. Sin embargo, a medida que la concentración de etanol se incrementó en el medio, la secreción de IL-8 disminuyó. Estos resultados podrían explicarse por un efecto antimicrobiano del etanol sobre el *H. pylori*. Brenner y cols. (2001) informaron que niveles bajos de alcohol pueden dañar e incluso eliminar la bacteria. Al haber menos bacterias viables en el medio, la inducción de secreción de IL-8 es menor. Esto no excluye la posibilidad que el etanol ejerza, asimismo, un efecto dañino sobre las células AGS, lo cual explicaría también la secreción reducida de IL-8.

La exposición a *H. pylori* y vitamina C, no ocasionó una secreción diferencial de IL-8 con respecto a la exposición a *H. pylori* solo. Sin embargo, a concentraciones crecientes de vitamina C, la secreción de IL-8 se incrementó. Este efecto es contrario al esperado, y podría explicarse por una acción pro-oxidante de la vitamina C.

La exposición a *H. pylori*, etanol y vitamina C ocasionó secreción de IL-8 significativamente menor a la inducida por *H. pylori* solo. Sin embargo, comparada con la exposición a *H. pylori* y etanol, esta secreción fue mayor y podría estar determinada, nuevamente, por una acción pro-oxidante de la vitamina C.

En cuanto al ON, su presencia fue cuantitativamente menor en el sobrenadante de células expuestas a *H. pylori*. Estos resultados son contrarios a lo ya informado. Sin embargo, en la mayoría de las investigaciones publicadas se ha evaluado la expresión de la ONSi, que no necesariamente refleja la síntesis de ON. Además, muchos de estos estudios se hicieron en muestras de tejido gástrico, cuya respuesta es diferente a la de líneas celulares únicas. Lim y cols. (2001) realizaron un estudio similar al nuestro, observando un incremento en la síntesis de nitritos ante la exposición a *H. pylori*. Las explicaciones potenciales a esta respuesta diferencial pudieran estar en las concentraciones de bacterias utilizadas, que fueron mucho más elevadas (hasta una relación 500:1, bacterias/célula), y en los tiempos de exposición, que fueron más prolongados (hasta 36 hrs). A este respecto, al incrementar los tiempos de exposición en nuestro estudio, la cantidad de ON en los sobrenadantes no se incrementó.

Por otro lado, es importante considerar que no todo el ON cuantificado refleja daño, ya que este radical participa también en funciones biológicas normales de la célula. A este respecto, el estudio de Lim y cols. muestra que la ONSi se expresa a partir de una relación 200:1 bacterias/célula, lo que implicaría que en la relación 100:1 la producción de ON es solamente endógena. La disminución del óxido nítrico en las células expuestas al *H. pylori* podría deberse al daño que les causa la bacteria, de modo que menos células se encuentren produciendo el ON que necesitan para sus funciones vitales y no haya producción inducida. En cambio en una relación mayor bacterias/célula, el óxido nítrico total sería la suma del

endógeno más el inducido, observándose incremento. Así mismo, las células sobrevivientes serían capaces de secretar IL-8 en respuesta al daño que genera el *H. pylori*.

La vitamina C, tanto en células expuestas como en no expuestas a *H. pylori*, provocó un aumento de ON en los sobrenadantes. Esto podría explicarse por su efecto pro-oxidante. El papel pro-oxidante de la vitamina C ha sido muy polémico. Sin embargo, Song y cols. (2001), mostraron que la acumulación de dehidroascorbato en células PC12 y cortes de cerebro causa oxidación de componentes celulares vitales generando estrés oxidativo. Asimismo, Odum y Andersen (1995) informaron que *H. pylori* es capaz de oxidar el ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico, mismo que penetra en las células gástricas donde es reducido a ascorbato con la generación concomitante de radicales libres.

Como era de esperar, la exposición a etanol provocó un incremento de ON, reflejo del estrés oxidativo de las células. La presencia concomitante de etanol y vitamina C tuvo un efecto aditivo, ya que aumentó la cantidad ON producida, y probablemente debida al estrés oxidativo generado por los dos compuestos.

Conclusiones

Contrario a lo hipotetizado, el etanol no provocó aumento de la IL-8 en las células AGS en presencia de *H. pylori*, ya que al parecer, además de tener un efecto deletéreo en las células es capaz de dañar a la bacteria. Sin embargo, el etanol incrementó el óxido nítrico, debido al estrés oxidativo que genera.

Así mismo, se rechaza la hipótesis del papel de la vitamina C como antioxidante, y se propone un efecto pro-oxidante, ya que es capaz de incrementar el óxido nítrico secretado, así como la IL-8.

La exposición concomitante a etanol y vitamina C en células AGS en presencia de *H. pylori* provocó un efecto amortiguador en la secreción de IL-8, determinado principalmente por el etanol; en cuanto a la secreción de óxido nítrico, el efecto de ambas exposiciones es aditivo.

9. Bibliografia

Antos D, Ender G, Reider G, Stolte M. Inducible nitric oxide synthase expression before and after eradication of *H. pylori* in different forms of gastritis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 30:127-131.

Audibert C, Janvier B, Grignon B. Correlation between Il-8 induction, *cagA* status and *vacA* genotypes in 153 french *H. pylori* isolates. *Res Microbiol* 2000; 151:191-200.

Bagchi D, McGinn T, Balmoori J, Stohs S. Mechanism of gastroprotection by bismuth subsalicylate against chemically induced oxidative stress in cultured human gastric cells. *Dig Dis Sci* 1999; 44:2419-2428.

Blasiak J, Trzeclak A, Malecka E. In vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde in human lymphocytes and the gastrointestinal tract mucosa cells. *Toxicol in vitro* 2000; 14:287-295.

Brenner H, Bode G, Adler G, Hoffmeister A. Alcohol as a gastric disinfectant? The complex relationship between alcohol consumption and current *H. pylori* infection. *Epidemiol* 2001; 12:209-214.

Bujanda L. The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:74-82.

Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 1999; 13:1007-1024.

Drake I, Davies M, Mapstone N, Schorah C. Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals. *Carcinogen* 1996; 17:559-562.

Everett S, Singh R, Leuratti C, White K, Neville P. Levels of malondialdehyde-deoxyguanosine in the gastric mucosa: Relationship with lipidperoxidation, ascorbic acid, and *H. pylori*. *Cancer Epidemiol* 2001; 10:369-376.

Farinati F, Libera G, Cardin R, Morali A. Gastric antioxidant, nitrites and mucosal lipoperoxidation in chronic gastritis and *H. pylori* infection. *J Clin Gastroenterol* 1996; 22:275-281.

Figura N. *Helicobacter pylori* factors involved in the development of gastroduodenal mucosal damage and ulceration. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25:S149-S163.

Goodwin S, Worsley B. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; 22:5-19.

Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. *Mutation Res* 2001; 475: 29-35.

- Jung H, Kim J, Song S. *H. pylori* induces an array of proinflammatory cytokines in human gastric epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12:473-480.
- Li C, Pignatelli B, Ohshima H. Coexpression of IL-8 and inducible nitric oxide synthase in gastric mucosa infected with *cagA+* *H. pylori*. *Dig Dis Sci* 2000; 45:55-62.
- Lim J, Kim H, Kim K. NF- κ B, inducible nitric oxide synthase and apoptosis by *Helicobacter pylori* infection. *Free Rad Biol Med* 2001; 31:355-366.
- McGee D, Mobley H. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Curr Opin Gastroenterol* 2000; 16:24-31.
- Odum L, Andersen L. Investigation of *Helicobacter pylori* ascorbic acid oxidating activity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 10:289-294.
- Olmos J, Rios H, Higa R. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Argentina. *J Clin Gastroenterol* 2000; 31:33-37.
- Peek RM. *Helicobacter pylori* strain-specific activation of signal transduction cascades related to gastric inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G525-G530.
- Robles-Diaz G, Dehesa M, Sanchez A. Investigation of time and mode of infection by *Helicobacter pylori* in a Mexican population. *Gastroenterology* 1993; 104:A179.
- Shimada T, Terano A. Chemokine expression in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol* 1998; 33:613-617.
- Shimoyama T, Crabtree J. Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1998; 43:S2-S5.
- Sobala G, Chorah C, Sanderson M, Dixon M, Tompkins D. Ascorbic acid in the human stomach. *Gastroenterology* 1989; 97:357-363.
- Son H, Rhee J, Park D, Kim Y, Choi K. Inducible nitric oxide synthase expression in gastroduodenal diseases infected with *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2001; 6:37-43.
- Song J, Shin S, Ross G. Oxidative stress induced by ascorbate causes neuronal damage in an *in vitro* system. *Brain Res* 2001; 895:66-72.
- Suzuki H, Mori M, Seto K, Kai A, Kawaguchi C. *H. pylori* associated gastric pro- and antioxidant formation in mongolian gerbils. *Free Rad Biol Med* 1999; 26:679-684.
- Suzuki H, Mori M, Seto K, Nagahashi S. *H. pylori* inoculation promotes gastric mucosal inflammation in mongolian gerbils. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14:1062-1069.

Van Doorn L, Figueiredo C, Megraud F, Carneiro F, Quint W. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1999; 116: 823-830.

Wallace J, Miller M. Nitric oxide in mucosal defense: A little goes a long way. *Gastroenterology* 2000; 119:512-520.

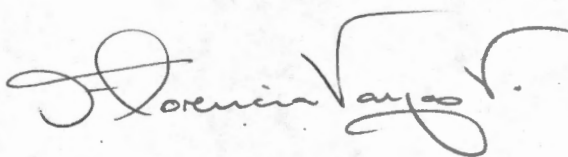
Waring A, Drake I, Schorah C, White K. Ascorbic acid and total vitamin C concentrations in plasma, gastric juice and gastrointestinal mucosa. *Gut* 1996; 38:171-176.

Waring A, Schorah C. Transport of ascorbic acid in gastric epithelial cells *in vitro*. *Clin Chim Acta* 1998; 275:137-149.

Watanabe S, Takagi A, Koga Y, Miwa T. *Helicobacter pylori* induces apoptosis in gastric epithelial cells through inducible nitric oxide. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15:168-174.

Esta tesina fue aprobada por el jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

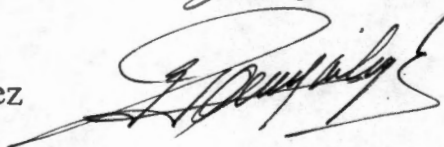
Dra. Florencia Vargas Voráckova



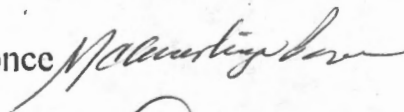
Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz



Dr. Humberto González Márquez



M.C. Margarita de la Luz Camorlinga Ponce



M.C. Verónica Gabriela Luqueño Martínez

