

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DEL ÁCIDO  $\gamma$ -AMINO- $\beta$ -HIDROXIBUTÍRICO (GABOB) SOBRE EL DAÑO  
GASTRODUODENAL INDUCIDO POR LA PRESENCIA DE *Helicobacter pylori* Y  
EL USO CRÓNICO DE ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS EN  
PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:

**M en Biol. Exp. MARÍA DE LOS ANGELES HERNÁNDEZ  
RAMÍREZ**

CO-DIRECCIÓN

**DRA. FLORENCIA VARGAS VORÁCKOVÁ  
DRA. MA. CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ**

ASESORÍA

**DRA. MA. DEL CARMEN MALDONADO BERNAL**

MÉXICO D. F., Julio de 2015

---



**CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO**

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL de la alumna MARIA DE LOS ANGELES HERNANDEZ RAMIREZ, matrícula 208180076, quien cumplió con los 315 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 90 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL, 45 créditos de PUBLICACION y 45 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL. Con fecha primero de julio del 2015 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

**EFFECTO DEL ACIDO y-AMINO-β-  
HIDROXIBUTIRICO (GABOB)  
SOBRE EL DAÑO  
GASTRODUODENAL INDUCIDO  
POR LA PRESENCIA DE  
Helicobacter pylori Y EL USO  
CRONICO DE  
ANTIINFLAMATORIOS NO  
ESTEROIDEOS EN PACIENTES  
CON ARTRITIS REUMATOIDE**

Cabe mencionar que la aprobación de la Idónea Comunicación de Resultados tiene un valor de 45 créditos y el programa consta de 540 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

APROBAR

Presidente

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

JURADO

Secretaria

DRA. MARIA DEL CARMEN MALDONADO  
BERNAL

Vocal

DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ

Vocal

DRA. VARENKA JULIETA BARBERO BECERRA

---

**Este trabajo fue realizado en el departamento de Gastroenterología y Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en el Laboratorio de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa y en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría CMN, Siglo XXI, IMSS**

**El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.**

**El Doctorado en Biología Experimental fue apoyado por la beca otorgada durante el periodo 2008-2011 por parte de CONACYT con el No. de registro 162320**

**La escritura de la tesis del Doctorado en Biología Experimental fue apoyado por la beca otorgada durante el periodo Agosto-Diciembre de 2012 por parte del ICYTDF con el No. de registro 19186**

---

---

## COMITÉ TUTORIAL

Co-directora

**Dra. Florencia Vargas-Vorácková**  
Departamento de Gastroenterología  
INCMNSZ  
[Florencia.vargas@quetzal.innsz.mx](mailto:Florencia.vargas@quetzal.innsz.mx)  
*Requiescat in pace*

Co-directora

**Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz**  
Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
UAM-Iztapalapa  
[mcgr@xanum.uam.mx](mailto:mcgr@xanum.uam.mx)

Asesora

**Dra. Ma. del Carmen Maldonado Bernal**  
Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica  
Hospital Infantil de México Federico Gómez.  
[cmaldobe@yahoo.com](mailto:cmaldobe@yahoo.com)

---

---

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **“Efecto del ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico (GABOB) sobre el daño gastroduodenal inducido por la presencia de *Helicobacter pylori* y el uso crónico de antiinflamatorios no esteroideos en pacientes con Artritis Reumatoide”** con fecha 1 de julio de 2015

## **JURADO DE EXÁMEN**

Presidente

**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**

Profesor Titular

Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
UAM-Iztapalapa

Secretaria

**Dra. Ma. del Carmen Maldonado Bernal**

Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica  
Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Vocal

**Dra. Varenka J. Barbero Becerra**

Translational Research Unit Medica Sur Clinic & Foundati

Vocal

**Dra. Leticia Bucio Ortiz**

Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
UAM-Iztapalapa

---

---

## Agradecimientos

**Gracias Dios** por permitirme seguir adelante...por alcanzar una meta más...por ser mi luz en la oscuridad cuando no puedo ver más...

**Papá Angel:** Gracias por cuidarme, por seguir guiándome continuamente y por todas las enseñanzas que me sigues brindando.

**Papás (Alicia y Juan):** Gracias por su amor incondicional, por la confianza brindada, por el apoyo en todas mis decisiones buenas o malas, por ser mi sostén y por aguantar mi mal humor!

**Tiux, (Tío Rodolfo):** Gracias por la confianza, el apoyo incondicional y todo lo que aprendo de Ud. día a día...

**Hermanos:** José Juan, Miguel, Cristina, Maricela (Paloma) y Pepe: Gracias por su apoyo incondicional y por estar siempre ahí. Sobrinos Juan Fe y Naomi, tan lindos y bellos que nos trajeron la felicidad que nos faltaba, siempre serán mis amores chiquitos... Gracias por formar parte de mi vida...

**Rodrigo:** Gracias por tu apoyo, comprensión y el amor que me brindas día a día..., por lo que tú y yo sabemos...

**Tíos:** Carmen, Javier y Refugio, Gracias por el apoyo que recibo de Uds.

---

---

**Dra. Conchita:** Mil gracias por acogerme en su laboratorio, por brindarme su confianza y apoyo incondicional, por todas las enseñanzas y su cariño.

**Dra. Vargas:** Gracias por confiar en mí a ciegas, sin preguntar nada, por todo lo que aprendí de Ud. Siempre estará en mi corazón.

“Aunque nos parezca que se han ido para siempre y que nos han dejado solos... La memoria del corazón siempre permanecerá intacta...”

**Dra. Maldonado:** Gracias por el apoyo, las enseñanzas brindadas y su cariño.

**Dr. Luis E. Gómez-Quiroz:** Gracias por su apoyo y por todas las enseñanzas brindadas.

**Dr. Jorge Hernández:** Gracias por el apoyo, por cada muestra de paciente...

**Amigas:** Leti, Varenka, Inés, Eli, Corelly, Elsa, Paulina, Alejandra, Xochil: Gracias por su apoyo incondicional y su complicidad en esta aventura que emprendí a su lado...

---

---

*“Cuando empieza la tormenta todos actúan según su naturaleza:  
algunos quedan mudos de terror,  
otros huyen,  
otros se esconden  
y algunos despliegan las alas como águilas y rugen como el viento...”*

---



## Índice

### Abreviaturas

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	5
.....1.1 Artritis Reumatoide.....	5
.....1.2 Antiinflamatorios no esteroideos.....	5
.....1.3 <i>Helicobacter pylori</i> .....	7
.....1.4 Respuesta Inflamatoria al daño.....	10
2. Antecedentes.....	12
3.	
Justificación.....	16
4. Objetivos.....	18
.....4.1 Objetivo General.....	18
.....4.2 Objetivos Particulares.....	18
5. Hipótesis.....	19
6. Métodos.....	20
.....6.1 Tamaño de Muestra.....	20
.....6.2 Pacientes.....	20
.....6.3 Variables a Medir.....	21
.....6.4 Diseño Experimental.....	23
.....6.5 Metodologías.....	24
.....6.5.1 Determinación de la secreción de citocinas y otras moléculas.....	24
.....6.5.2 Determinación de la expresión de RNAm de IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , iNOS, CGRP, COX-1 y COX-2 por PCR en tiempo real.....	25
.....6.5.3 Determinación de COX-1, COX-2, NF- $\kappa$ B y Smad3 mediante inmunoblot.....	27
.....6.5.4 Determinación de COX-1, COX-2 y Caspasa 3 mediante Inmunohistoquímica.....	28
.....6.5.4.1 Evaluación de grado de Tinción.....	29
.....6.5.5 Evaluación Histológica.....	29
.....6.6 Análisis Estadístico.....	29
7. Resultados.....	30

---

.....7.1 Datos demográficos de los pacientes.....	30
.....7.2 Elementos de Inflamación y muerte celular en la mucosa gástrica....	31
.....7.2.1 Evaluación de Sydney.....	31
.....7.3 Secreción in situ de TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-8 y NO.....	32
.....7.3.1 Producción plasmática de IL-10, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ y NO.....	37
.....7.4 Expresión de RNAm de IL-10, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , iNOS, CGRP, COX-1 y COX-2.....	38
.....7.5 Expresión de las enzimas COX-1 y COX-2 y factores de transcripción NF- $\kappa$ B y Smad3.....	43
.....7.6 Expresión de las COX-1 y COX-2.....	48
8. Discusión.....	51
9. Conclusión.....	63
.....9.1 Conclusiones Parciales.....	63
.....9.2 Conclusión General.....	63
10. Bibliografía.....	64
11. Anexos.....	81
12. Artículo.....	88
.....12.1 Effect of GABOB in the inflammatory response of rheumatoid arthritis patients with <i>H. pylori</i> and NSAIDs Treatment.....	88

## Abreviaturas

- *H pylori*: *Helicobacter pylori*
- AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos
- GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico
- AR: Artritis Reumatoide
- GABOB: ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico
- SODA: Severity of dyspepsia assessment (por sus siglas en ingles)
- COX-2: Ciclooxygenasa tipo 2
- COX-1: Ciclooxygenasa tipo 1
- IARC: Agency for Research on Cancer
- IFN- $\gamma$ : Interferon
- IL-1 $\beta$ : Interleucina 1beta
- GABA<sub>A</sub> -: Receptor de GABA tipo A
- GABA<sub>B</sub>: Receptor de GABA tipo B
- CGRP: Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina
- PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>
- iNOS: Sintetasa de Oxido Nítrico inducible
- SIDA: Inmunocompromiso severo
- VSG: Velocidad de Sedimentación Globular
- PCR: Proteína C reactiva
- RT-PCR: Retrotranscriptasa- Reacción en cadena de la polimerasa
- ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Acido sulfúrico
- UPL: Universal Probe Library
- GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato Deshidrogenasa
- BCA: Acido Bicinconinico
- H&E: Hematoxilina-Eosina

## Resumen

### Introducción

La bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) y los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) son las principales causas de los desórdenes gastrointestinales. El tratamiento oral con el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) regula las respuestas inflamatorias en los modelos de artritis reumatoide (AR).

### Objetivo

En el presente trabajo investigamos el efecto anti-inflamatorio de la ingestión oral del GABOB, un producto metabólico del GABA, en pacientes dispépticos con AR e ingesta crónica de AINEs para determinar si la colonización de *H. pylori* contribuye a la asociación entre los AINEs y el daño péptico.

### Métodos

En el estudio se incluyeron 26 pacientes bajo tratamiento de AINEs y con síntomas dispépticos. A todos los pacientes se les determinó si tenían o no infección por *H. pylori*. Se determinó la secreción y expresión de TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , IL-10, IL-8, NO y TGF- $\beta$  en biopsias de antro y duodeno antes y después del tratamiento con el GABOB. También se realizó inmunohistoquímica y la evaluación de Sydney, así como el cuestionario de evaluación de gravedad dispéptica (SODA).

### Resultados

De los 26 pacientes incluidos en el estudio 10 fueron *H. pylori* positivo y 16 *H. pylori* negativo. No se encontró co-relación entre la dosis, tipo de AINEs, tiempo de

consumo y presencia/ausencia de *H. pylori* con el tipo de gastropatía. En biopsias de antro se encontraron valores elevados de IL-8 en pacientes *H. pylori* positivo aún cuando no se encontró co-relación con el infiltrado inflamatorio. Los datos mostraron que la secreción de IL-8 aumento en biopsias de duodeno de pacientes *H. pylori* positivo. También se encontró un aumento en Smad3 pero en biopsias de duodeno de *H. pylori* negativo, mientras que el TGF- $\beta$  disminuyó en el plasma de los mismos pacientes. No hubo cambios significativos como resultado del tratamiento con el GABOB.

### Conclusión

Debido a que existe controversia acerca del papel que desempeña *H. pylori* y el uso crónico de los AINEs en el riesgo de padecer daño gástrico, los hallazgos de este trabajo sugieren que el uso crónico y el tipo de AINEs puede ser un factor independiente del riesgo de daño a la mucosa gástrica y duodenal así como la presencia de la bacteria *H. pylori* puesto que no modifica la respuesta inflamatoria en la población estudiada, a pesar de la mejoría en los síntomas dispépticos después del tratamiento con el GABOB.

**Abstract**

**Background:** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) are the major causes of gastric disorders. Oral GABA treatment down regulates inflammatory responses in rheumatoid arthritis (RA) models. We investigated the anti-inflammatory effect of oral ingestion of GABOB in dyspeptic patients with RA and NSAID intake to establish if *H. pylori* colonization contributes to the association between NSAID and peptic damage.

**Methods:** Twenty six patients with RA who took NSAIDs and dyspeptic symptoms were recruited. Patients were tested for *H. pylori* infection. TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , IL-10, IL-8, NO, TGF- $\beta$  expression and secretion were determined in antrum and duodenum biopsy and plasma before and after GABOB treatment. Immunohistochemistry and Sydney evaluation were also performed. Severity of dyspepsia assessment (SODA) test was applied.

**Results:** Ten patients were *H. pylori* positive, and sixteen *H. pylori* negative. No correlation between the dose, type of NSAID, time consuming and the presence of *H. pylori* with gastropathy present were found. IL-8 presented higher values in antrum, in positive *H. pylori* patients, and it correlated with greater inflammatory infiltration. Our data showed changes that IL-8 secretion increases in *H. pylori* positive duodenum biopsy, also an increased Smad3 expression was found in negative *H. pylori* duodenum biopsies, and a decreased plasma TGF- $\beta$  level in the same patients. Data did not show significant changes as a result of GABOB treatment.

**Conclusions:** These findings suggest that 60% of *H. pylori* positive and 69% of *H. pylori* negative patients considered an improvement in dyspepsia tolerability as a result of the GABOB treatment. However, we believe that four weeks of GABOB treatment did not improved inflammatory mediators in gastric biopsies, nor in plasma levels.

## 1. Introducción

### 1.1. Artritis Reumatoide

En la actualidad, la artritis reumatoide (AR) es un problema de salud pública importante, debido a que afecta a aproximadamente al 1% de la población mundial con una relación de 3:1 en mujeres con respecto a hombres (Alarcón, 1995). La artritis reumatoide se considera una enfermedad autoinmune y de etiología desconocida, que se caracteriza por ocasionar inflamación crónica de las articulaciones y tejidos circundantes (Emery, *et al.*, 2002). La vida y las actividades cotidianas de las personas con artritis reumatoide suelen verse afectadas principalmente por el dolor y las deformidades que ocurren en manos y pies ocasionados por esta enfermedad, estos síntomas derivan en una incapacidad total de la persona que la padece, e incluso en pocos años llega a ocasionar la muerte. La destrucción de las articulaciones puede ocurrir dentro de un período de uno a dos años después de la aparición de la enfermedad (Moctezuma, 2002; Aho, *et al.*, 1986).

Debido a que no se conocen las causas específicas de la artritis reumatoide, la enfermedad se ha tratado durante muchos años con diferentes fármacos como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), que buscan limitar la inflamación y el dolor ocasionado por la artritis reumatoide.

### 1.2. Antiinflamatorios no esteroideos

Los AINEs son fármacos que se caracterizan por su acción antipirética, analgésica y antiinflamatoria, son agentes altamente efectivos para el control del dolor musculoesquelético y la inflamación en una variedad de enfermedades asociadas con ella como la artritis reumatoide y la osteoartritis. Además son los fármacos más



ampliamente usados en el mundo. Se reconoce que la mayoría de los pacientes con AR que reciben AINEs, mejoran su calidad de vida. Pertenecen a este grupo los silicilatos, pirezolonas, índoles y derivados (indometacina, sulindaco), un grupo heterogéneo de ácidos orgánicos (diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno), oxicanos (piroxicam), ketorolaco, nimesulida, meloxicam, etc.

Los efectos benéficos de los AINEs se deben a su habilidad para inhibir a las ciclooxigenasas (COX)- 1 y 2, enzimas relacionadas con la producción de prostaglandinas en los sitios de inflamación, las cuales al disminuir su producción, disminuyen la inflamación (Tegeeder, *et al.*, 2001). La COX-1 participa en la síntesis de las PG mucosas, en cambio la COX-2 es la forma inducible, pues se expresa en respuesta al daño tisular. La acción antiinflamatoria de los AINEs depende de la inhibición de la COX-2 (Tegeeder, *et al.*, 2001). Sin embargo, un efecto a nivel tópico de los AINEs es producir una lesión que depende del índice de disociación o pKa que tengan (el rango del pKa de la mayoría de ellos está entre 3 y 5), lo que significa que en una solución ácida aumenta la proporción de moléculas no ionizadas, muy liposolubles, que pueden cruzar la membrana plasmática. Por tal razón estos fármacos se concentran preferentemente en los lugares de mayor acidez como el estómago, médula renal y zonas con isquemia o inflamación, se sabe que hay una atenuación del contenido de fosfolípidos y la hidrofobicidad de la superficie de la capa de moco gástrico disminuye (Lichtenberger, *et al.*, 1995).

Es esencial hacer una selección y monitoreo cuidadoso de efectos potencialmente adversos, estos fármacos son bien tolerados por la mayoría de los pacientes. Los eventos gastrointestinales inducidos por los AINEs son más comúnmente reportados

como efectos adversos de una u otra clase de drogas. Varios estudios han mostrado un aumento en la prevalencia de úlceras pépticas.

En los pacientes con AR es bien conocido que tienen mayor tendencia a desarrollar una variedad de desórdenes gastrointestinales superiores. El uso a largo plazo de los AINEs es aceptado como el factor de riesgo más importante en el desarrollo de ulceración péptica, sin embargo, pocos estudios han sido realizados en pacientes con AR. La prevalencia de úlcera gástrica y duodenal ha sido reportada en un 13 % y 11 % en pacientes con artritis crónica que consumen AINEs pero solo el 0.3 % y el 1.4 % en la población sin uso regular de AINEs (Scheiman, 1996). En un estudio británico fue detectado un 36% de enfermedades de úlcera péptica en pacientes con AR, pero no se observó diferencia entre los grupos con úlcera y los no ulcerados en tratamiento con AINEs (Farah, *et al.*, 1988).

Además de los agentes químicos como los AINEs, existen también agentes patógenos, como *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), capaces de dañar la mucosa gástrica. Estos agentes son la mayor causa de las enfermedades gastroduodenales y son los principales factores patogénicos en la úlcera péptica (Brzozowski, *et al.*, 2006).

### 1.3. *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria Gram negativa, tiene forma de bacilo curvo que posee de 4 a 6 flagelos peritricos, coloniza la mucosa gástrica humana, es microaerofílica y produce las enzimas ureasa, catalasa y oxidasa para adaptarse al microambiente que infecta (Hernandez and Moge-Najera, 1994).

*H. pylori* causa inflamación crónica en la mayoría de las personas infectadas. Durante la fase temprana de la infección la unión de *H. pylori* con las células epiteliales induce la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1 (Naumann, *et al.*, 1999; Keates, *et al.*, 1999), los cuales son responsables de la secreción de quimiocinas como IL-8, entre otras (Peek, *et al.*, 2010) capaces de reclutar células polimorfonucleares (PMN), principalmente neutrófilos al sitio de infección. Después se inicia la secreción de RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 (Goodwin, *et al.*, 1986). Este patrón sugiere que la IL-8 y quimiocinas de la misma familia atraen granulocitos en una fase temprana y posteriormente se incrementa la migración de células mononucleares, estas estirpes celulares, producen citocinas proinflamatorias capaces de activar las diferentes células reclutadas. Después de la inflamación aguda inicial, la exposición continua a los antígenos bacterianos induce la generación de una respuesta específica de células T y B (Perez-Perez, *et al.*, 1998; Negrini, *et al.*, 1997; Harris, *et al.*, 2000; Smythies, *et al.*, 2000).

Existen diferentes factores de virulencia bacteriana que juegan un papel importante en el establecimiento de la infección por *H. pylori*, tales como la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*). La isla fue descubierta en los 1990's y se identificó que la expresión de esta isla está fuertemente asociada a la ulceración péptica (Cover, *et al.*, 1990; Cabtree, *et al.*, 1991). La isla tiene un DNA de inserción de 40 kb y este codifica entre 27 y 31 genes (Akopyants, *et al.*, 1998; Censini, *et al.*, 1996; Covacci and Rappuoli, 2000), el gen 18 codifica componentes bacterianos para el aparato de secreción tipo IV que exporta proteínas bacterianas a través de la membrana bacteriana al interior de las células epiteliales gástricas del hospedero, lo cual le confiere una mayor patogenicidad (Wroblewski, *et al.*, 2010).

La infección por *H. pylori* es la principal causa de la gastritis crónica, que es también el hallazgo histológico más común en pacientes que consumen AINEs y éste es más estrechamente asociado con la úlcera péptica (Marshall, 1995). Está presente en más del 90% de los pacientes con úlcera duodenal (Walsh and Peterson, 1995).

La infección por *H. pylori* representa una de las infecciones bacterianas más comunes en el mundo, en países en vías de desarrollo, como México, la seroprevalencia fluctúa entre el 80% y el 90% (Perez-Perez, *et al.*, 2004). *H. pylori* es la única bacteria clasificada como carcinógeno humano por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) y se ha asociado a diversas enfermedades gastroduodenales. La infección generalmente se adquiere en etapas tempranas de la vida y sólo décadas más tarde se presentan las diferentes patologías (Sipponen, 1992; Uemura, *et al.*, 2001).

La importancia de conocer los procesos que involucra la fisiopatología gástrica radica en que hoy en día el cáncer gástrico representa un problema de salud pública, es el cuarto tipo de cáncer más frecuente y ocupa el segundo lugar a nivel mundial. En México, en las últimas décadas se ha informado un incremento de 4.43 a 9 casos por cada 100 000 habitantes (Fuentes-Pananá, *et al.*, 2009; Torres-Jasso and Sánchez-López, 2011). *H. pylori* es el principal determinante de la aparición del cáncer gástrico (Correa, 1996). El riesgo de desarrollar cáncer gástrico es seis veces mayor en la población infectada con *H. pylori* (Parsonnet, 1995). *H. pylori* es una bacteria que infecta aproximadamente el 50% de la población mundial (Amsterdam, *et al.*, 2006).

#### 1.4. Respuesta Inflamatoria de daño

La infección por *H. pylori* favorece el establecimiento de un cuadro inflamatorio crónico el cual produce daño del epitelio gástrico que progresa al cáncer. (Kusters, *et al.*, 2006). *H. pylori* induce infiltración en la mucosa gástrica de leucocitos polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos T y B y estimula la secreción de IL-8 y otras moléculas que participan en la inflamación (Ando, *et al.*, 2006).

La respuesta inmune juega un papel fundamental en el daño causado al epitelio gástrico durante la infección por *H. pylori*. Los neutrófilos activados liberan radicales libres del oxígeno y del nitrógeno que pueden dañar las células del epitelio gástrico (Cabtree, 1996). Citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pueden inducir la apoptosis de células epiteliales gástricas (Wang, *et al.*, 2001; Rudi, *et al.*, 1998) y alterar la secreción de moco participando en la lesión de la mucosa gástrica además estimulan las células parietales incrementando la síntesis de gastrina y por lo tanto la secreción de ácido, esto altera la homeostasis del estómago. El TNF- $\alpha$  disminuye además el número de células D del antro, en respuesta a la colonización crónica por *H. pylori*. La inhibición de secreción de ácido por niveles elevados de IL-1 $\beta$ , podrían promover el desarrollo de atrofia gástrica, lo cual es un paso inicial en la vía que conduce a carcinogénesis en el estómago (El-Omar, 2001).

Otra citocina que se expresa en la infección por *H. pylori* es la interleucina 10 (IL-10), aunque su participación en este proceso no está muy claro, se sabe que es una citocina antiinflamatoria potente y una importante reguladora de la respuesta inmune de la mucosa. En estudios realizados en ratones deficientes de IL-10, se ha propuesto que la IL-10 endógena es un inhibidor de la respuesta inmune protectora contra la infección por *H. pylori*. Además esta citocina, participa en la regulación

(negativa o a la baja) de las respuestas inflamatorias gástricas inducidas por *H. pylori*, lo que confiere una ventaja de supervivencia a esta bacteria, promoviendo más efectivamente la colonización de la mucosa gástrica (Chen, *et al.*, 2001). El TGF- $\beta$ , es una citocina multifuncional que regula diversos procesos celulares y juega un papel central en diferentes estados de la cicatrización de la herida y regula positivamente este proceso (Martin, 1997; Tanigawa, *et al.*, 2005). El TGF- $\beta$  es liberado por los eosinófilos, entre otras células durante la infección por *H. pylori* y puede modular la capacidad de la mucosa gástrica para mantener o regenerarse así misma (Prevete, *et al.*, 2013).

El papel que desempeña *H. pylori* en pacientes que reciben AINEs ha sido investigado con resultados controversiales como en la llamada gastritis reactiva, que se ha sugerido como un descubrimiento prevalente característico en pacientes que consumen AINEs, pero también puede ser detectado en asociación con el reflujo biliar, alta ingesta de alcohol o cirugía gástrica (Taha and Russell, 1993; Sobala, *et al.*, 1993).

En nuestros días, el papel que desempeña *H. pylori* en combinación con los AINEs en la inducción de la respuesta inmune de la mucosa gástrica, permanece sin ser comprendido completamente. Pocos estudios han examinado la interacción potencial entre los AINEs y la bacteria *H. pylori* produciendo resultados contradictorios. Esta problemática ha propiciado la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento y prevención del daño gástrico, una alternativa para tratar éste desorden patológico es el uso del GABA y algunos análogos de éste.

## 2. Antecedentes

Se ha demostrado que el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y varios agentes GABAérgicos son reguladores importantes de las funciones gastrointestinales en el sistema nervioso central. El GABA es un neurotransmisor presente en el sistema nervioso central y periférico. En el sistema nervioso entérico tiene acciones estimuladoras e inhibitoras en las neuronas colinérgicas mesentéricas postganglionares. El GABA está localizado en células epiteliales y fibras nerviosas intrínsecas de la mucosa gástrica y la administración exógena estimula la liberación de la gastrina e inhibe la liberación de la somatostatina en el antro gástrico de rata, vía receptor (Weigert, *et al.*, 1998). Se ha demostrado que GABA puede aumentar la proliferación celular, posee un efecto antiulcerogénico y es importante en la regulación de ácido gástrico y en la secreción de moco gástrico (Hara, *et al.*, 1990; Abbas, *et al.*, 1988).

Existe evidencia de que la administración central de agonistas y antagonistas de GABA causan una alteración significativa en la motilidad, secreción gástrica y el transporte de electrolitos intestinales (Marcoli, *et al.*, 2000; Rotondo, *et al.*, 2010). Algunos estudios sugieren la modulación de la secreción de ácido gástrico en ratas y la influencia de la formación de úlceras gástricas experimentales. Estos efectos parecen ser inducidos por su actividad inhibitoria sobre los factores de defensa de la mucosa. Reportes en la literatura, indican que existen dos tipos de receptores de GABA: GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. Estos receptores están localizados en membranas gástricas en todas las regiones del estómago de rata y en las neuronas sensoriales aferentes primarias y modulan la neurotransmisión nociceptiva (Harty, *et al.*, 2004). El GABA también es capaz de modular el tono gástrico a través de receptores

GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> (Gallego-Sandín, *et al.*, 2004). Se sabe que el GABA realiza sus efectos antiulcerogénicos a través de sus diferentes receptores (Minano, *et al.*, 1987; Erdo, *et al.*, 1989). El bloqueo del receptor GABA<sub>A</sub> previene las acciones de GABA en las células endócrinas del antro gástrico y su activación resulta en una consistente actividad antiulcerogénica (Minano, *et al.*, 1987). El receptor GABA<sub>B</sub> inhibe las neuronas colinérgicas y por lo tanto, bloquea la contracción del músculo liso.

El baclofen, un agonista del receptor GABA<sub>B</sub>, atenúa la dispepsia funcional y parece actuar mediante un mecanismo central (Liu, *et al.*, 2011). Sin embargo, existe un desacuerdo general en la literatura concerniente a los efectos GABAérgicos característicos sobre la secreción de ácido y la ulceración. Se ha reportado que el GABA por sí mismo, aumenta (Tsai, *et al.*, 1987), disminuye (Bhargava, *et al.*, 1985) y puede influenciar la secreción de ácido gástrico. En años recientes, ha quedado claro un entrecruzamiento entre el sistema inmune y el sistema nervioso. Algo sorprendente es que, las células del sistema inmune por sí solas expresan componentes del sistema de neurotransmisores. El papel que desempeñan los neurotransmisores, los canales de iones, receptores y transportadores sobre la función inmune y de regulación es un campo emergente de estudio. Estudios recientes han demostrado que el sistema inmune es capaz de sintetizar y liberar neurotransmisores clásicos como el GABA. El GABA ejerce varios efectos sobre las células del sistema inmune, tales como activación o supresión de la secreción de citocinas, modificación de la proliferación celular, así como también puede afectar la migración celular. Parece ser que el GABA tiene un papel importante en las enfermedades inmunológicas como la esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, la AR y



también puede modular las respuestas a infecciones (Bhat, *et al.*, 2010; Mendu, *et al.*, 2011; Wheeler *et al.*, 2011). En un modelo de artritis reumatoide en ratón, el tratamiento oral con GABA disminuye la respuesta inflamatoria (Tian, *et al.*, 2011). Kelley, *et al.*, propuso que el GABA puede regular corriente abajo la actividad de la vía de las MAPK's p38 para reducir la producción periférica de las citocinas pro-inflamatorias en las articulaciones afectadas por la AR.

En modelos experimentales, la administración de GABA es capaz de proteger al estómago de lesiones inducidas por agentes químicos nocivos y del estrés. Los mecanismos postulados para explicar este efecto son la estimulación de la síntesis de prostaglandinas y el incremento del flujo sanguíneo en la mucosa. Se ha observado que la gastroprotección del GABA contra la agresión del etanol y el estrés está mediada por la secreción de prostaglandinas y la activación de neuronas aferentes gástricas, que secretan el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y promueven la liberación de óxido nítrico (NO) (Harty, *et al.*, 2004).

En años recientes se ha observado que las neuronas participan en forma importante en la defensa de la mucosa gástrica. La estimulación central del vago protege contra el daño gástrico mediante la participación de receptores muscarínicos y la resultante liberación de prostaglandinas. Las prostaglandinas, particularmente la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), son importantes para el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica cuando los mecanismos de defensa neuronales están alterados. La estimulación de neuronas espinales aferentes, por otra parte, ejercen su efecto protector mediante el CGRP y la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS), (Peskar, 2001). El daño gástrico se acompaña de niveles gástricos bajos del CGRP así como del TGF- $\alpha$  (Vongthavaravat, 2003).

Por otro lado, se sabe que el ácido 4-amino-3-hidroxibutanoico (GABOB) es un ligando endógeno que se encuentra en el sistema nervioso de mamíferos (Kelley, *et al.*, 2008). Éste es un producto metabólico del GABA. El GABOB tiene propiedades anticonvulsivas, otros estudios han sugerido que éste puede mejorar el aprendizaje y la función de la memoria, probablemente a través de un mecanismo colinérgico, así como impulsar la liberación de la hormona de crecimiento. Recientemente, Liu *et al.*, demostró que el GABOB, presumiblemente por la vía de activación del receptor GABA<sub>B</sub>, significativamente atenúa la conducta y las respuestas visceromotoras de la distensión mecánica gástrica (Liu, *et al.*, 2011). Se ha observado que la administración de GABOB aumenta la proliferación en tejido de la región escapular de rata macho, exhibe una actividad antiulcerogénica (Nagai, *et al.*, 1971) y estimula los receptores de GABA<sub>A</sub> en tejido vascular de rata (Enero, *et al.*, 1988). Los autores consideran que la vía de señalización GABAérgica es un blanco potencial para el tratamiento de la dispepsia funcional y condiciones relacionadas (Rotondo, *et al.*, 2010).

El efecto del GABA sobre la protección de la mucosa gástrica está ampliamente estudiado. Sin embargo, el efecto benéfico de la administración del GABOB sobre el daño gastroduodenal inducido por *H. pylori* en combinación con AINEs carece de estudios que documenten su uso.

### 3. Justificación

Los AINEs son utilizados para tratar enfermedades inflamatorias crónicas autoinmunes como la AR. La AR es un problema de salud pública, puesto que es una enfermedad incapacitante que afecta la calidad de vida, productividad y economía de quien la padece. En forma concomitante, se observó que aproximadamente el 40% de personas con AR estaba infectado por *H. pylori*. En México, la seroprevalencia estimada de esta infección es de 80%-90%. La infección por *H. pylori*, asociada al uso crónico de AINEs, incrementa el riesgo de desarrollar daño gastroduodenal y sus complicaciones (hemorragia, perforación) en pacientes con AR.

En las últimas décadas, la investigación se enfocó al desarrollo de medidas farmacológicas nuevas para la prevención y tratamiento del daño gastroduodenal inducido por la infección por *H. pylori* y el uso de AINEs. Resultado de estas investigaciones fueron los inhibidores de la bomba de protones (H<sup>+</sup>) y los inhibidores selectivos de las ciclooxigenasas 1 (COX-1) y 2 (COX-2). Actualmente, estos inhibidores son de los más utilizados en pacientes con AR. Sin embargo, al inhibir la bomba de protones, la síntesis de prostaglandinas y otras moléculas conducen, con frecuencia, al desarrollo de efectos indeseables como la sobrepoblación bacteriana intestinal, pólipos gástricos, hipertensión y hemorragia.

Recientemente, se observó que las neuronas participan en forma importante en la defensa de la mucosa gástrica. La estimulación central del vago protege contra el daño gástrico mediante la participación de receptores muscarínicos y la resultante liberación de prostaglandinas. En modelos experimentales, la administración de GABA protege el estómago de lesiones inducidas por agentes químicos nocivos y el

estrés. El GABOB es una molécula similar al GABA y con efectos también semejantes. Está indicado para el tratamiento de problemas relacionados con la ansiedad. Su utilidad como profiláctico en el tratamiento del daño gastroduodenal secundario a agentes químicos sólo se ha explorado en animales de experimentación, en los cuales se observó una reducción del daño. El presente estudio, propone el uso del Gamibetal (GABOB) sobre el daño inducido por agentes infecciosos y químicos, como una posible terapia alternativa para la prevención y el tratamiento del daño en la mucosa de pacientes con AR. De probarse el efecto benéfico del GABOB, se dispondría de una alternativa eficaz y económica, a los inhibidores de bomba actualmente utilizados para prevenir y tratar el daño gastroduodenal inducido por AINEs y *H. pylori*. Además de tener implicaciones terapéuticas, este estudio proporciona evidencia sobre los procesos involucrados en la respuesta inflamatoria crónica del estómago, derivado del daño ocasionado por la presencia de *H. pylori* y los AINEs en pacientes con AR.

## 4. Objetivos

### 4.1 General

- Evaluar el efecto del GABOB en la protección de la mucosa gástrica asociada a la modificación de la respuesta inflamatoria inducida por la presencia de *Helicobacter pylori* y por el uso crónico de antiinflamatorios no esteroideos en pacientes con artritis reumatoide.

### 4.2 Particulares

- Determinar el cambio en el daño de la mucosa gástrica a nivel histológico en pacientes con AR con tratamiento de AINEs con/sin infección por *H. pylori* en biopsias gástricas.
- Evaluar la respuesta inflamatoria en pacientes con AR con ingesta de AINEs con/sin infección por *H. pylori* en biopsias gástricas a nivel de secreción así como en concentración plasmática antes-después de la administración de GABOB.
- Determinar la participación en la respuesta inflamatoria de las enzimas COX-1 y COX-2 y de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y Smad3 en pacientes con AR con tratamiento de AINEs con/sin infección por *H. pylori* en biopsias gástricas a nivel de la expresión antes-después del tratamiento con el GABOB.

## 5. Hipótesis

- La administración de GABOB modificará la respuesta inflamatoria y disminuirá el daño a la mucosa gástrica de pacientes con artritis reumatoide y daño gastroduodenal inducido por la presencia de *Helicobacter pylori* y el uso crónico de antiinflamatorios no esteroideos.

## 6. Métodos

### 6.1 Tamaño de muestra

En ausencia de antecedentes que sustenten el cálculo formal de un tamaño de muestra, se propuso estudiar 10 pacientes positivos a la presencia de *H. pylori* y gastropatía por AINEs y 16 pacientes negativos a *H. pylori* y gastropatía por AINEs (18  $\geq$  70 años de edad). Este tamaño de muestra fue suficiente para documentar un  $\geq$  80% de la mejoría en síntomas observada en pacientes con dispepsia tratados con dosis terapéuticas de inhibidores de la bomba de protones, con un nivel de significancia de 0.05 (dos colas), un poder del 90% y un porcentaje de pérdidas de 10% (Rabeneck, *et al.*, 2001 y 2005).

### 6.2 Pacientes

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de AR y presencia/ausencia de *H. pylori* sustentado clínica-, bioquímica- e histológicamente.

Debido a que se tuvieron dos grupos de estudio, todos los pacientes que cumplieron con los criterios de selección fueron asignados al tratamiento. Todo paciente candidato a participar fue debidamente informado respecto a los objetivos, desarrollo, riesgos y beneficios del estudio, firmó voluntariamente una carta de consentimiento elaborada acorde con lo indicado en la Declaración modificada de Helsinki y la Ley General de Salud en materia de investigación en salud.

#### Inclusión

Pacientes con diagnóstico temprano de AR y presencia o ausencia de *H. pylori*, edad entre 18 y 70 años, bajo tratamiento con AINEs (uso diario durante  $\geq$  2 semanas o uso irregular por síntomas gastrointestinales), con malestar o dolor

abdominal superior a una semana de duración que ameritó la realización de estudio endoscópico y en quienes se demostró daño gastroduodenal superficial. Las pacientes en edad reproductiva estuvieron bajo régimen anticonceptivo y sin estar lactando. Los pacientes incluidos en el estudio debieron cumplir en por lo menos 80% de las indicaciones dietéticas durante la fase de estandarización y firmaron el consentimiento informado respectivo.

#### Exclusión

Pacientes fumadores, con consumo excesivo de alcohol, hipotensos, con trastornos de la coagulación, con pirosis como síntoma único, ictericia, cirugía gástrica previa, pérdida de peso no intencional (>5 Kg en los 6 meses previos), con historia de melena o hematemesis en los 3 meses previos, con hemorragia activa de tubo digestivo alto, con úlcera gástrica y/o duodenal demostrada por endoscopia, con enfermedad terminal, con inmunocompromiso severo (SIDA), o quienes estuvieran recibiendo tratamiento con antibióticos, bloqueadores H<sub>2</sub> o inhibidores de bomba de protones.

#### Eliminación

Pacientes quienes, una vez incluidos en el estudio no cumplieron con por lo menos dos semanas de tratamiento.

### 6.3 Variables a medir

Clínicas. Se evaluaron los síntomas asociados al daño gastroduodenal por AINEs mediante el cuestionario SODA por sus siglas en inglés (severity of dyspepsia assessment) (Rabeneck, *et al.*, 2001). La ocurrencia de efectos adversos se determinó con mediciones de presión arterial en tres posiciones, interrogatorio orientado hacia hemorragia de tubo digestivo (hematemesis, melena), anorexia y



mareo. El apego se evaluó por interrogatorio y conteo de tabletas, y fue calificado como adecuado cuando hubo por lo menos un 80% de cumplimiento con las indicaciones dietéticas y la toma del GABOB.

Bioquímicas. Para la vigilancia de hemorragia de tubo digestivo alto, se buscó sangre oculta en heces y se hicieron determinaciones periódicas de hemoglobina. La actividad de AR se determinó mediante la velocidad de sedimentación globular (VSG) y proteína C reactiva (PCR).

Endoscópicas. Se evaluó la presencia de úlcera (pérdida de la superficie epitelial que penetra hasta la *muscularis mucosae* de >5mm de diámetro), erosiones (lesiones mucosas superficiales y pequeñas de <5mm de diámetro) y hemorragia en la mucosa gastroduodenal. Se tomaron 18 biopsias de antro y 18 de la región proximal del duodeno por paciente antes y después del tratamiento con el GABOB.

El estudio endoscópico se realizó en dos ocasiones, una con fines diagnósticos y otra con fines de seguimiento. La realización de ambas endoscopias fue indispensable para valorar el estado inicial y final de la mucosa gastroduodenal y la toma de biopsias cuyo análisis permitió estudiar los mecanismos fisiopatogénicos involucrados en el daño gastroduodenal por AINEs y *H. pylori*.

Histológicas. Las biopsias de antro tomadas al inicio del tratamiento se tiñeron con Hematoxilina&Eosina y se examinaron por microscopía de luz. Se evaluó la presencia de infiltrado inflamatorio, inflamación activa y/o crónica, e infección por *H. pylori*.

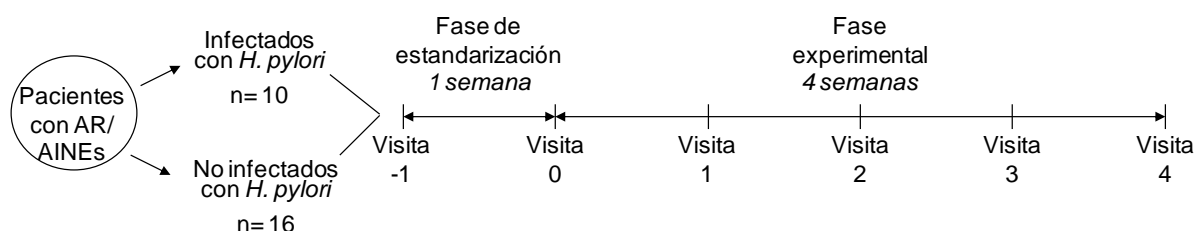
Estudios especiales. Los niveles de interleucina 8 (IL-8) interleucina 10 (IL-10), factor de necrosis tumoral tipo  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), factor transformante de crecimiento tipo  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), factor transformante de crecimiento tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), óxido nítrico (NO) fueron

determinados mediante ELISA en plasma y en biopsias de antro y duodeno, las anteriores y óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), COX-1, COX-2, determinados por RT-PCR en tiempo real en biopsias de antro y duodeno. El factor nuclear  $\kappa$ B y Smad3 en sobrenadantes de homogeneizados de mucosa gastroduodenal fueron determinados por western-blot. COX-1, COX-2 y Caspasa 3 determinados por inmunohistoquímica. Todas las determinaciones se realizaron antes y después del tratamiento con el GABOB acorde a las instrucciones de los ensayos específicos.

Frecuencia de las mediciones. La sintomatología, el apego a las instrucciones dietéticas y los efectos adversos se evaluaron en cada visita (Visitas -1 a 4). La búsqueda de sangre oculta en heces, la biometría hemática, la VSG y PCR se realizaron en todas las visitas de la fase experimental (Visitas 0 a 4). Los estudios endoscópicos y la determinación de IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , NO, iNOS, CGRP, COX-1, COX-2, NF- $\kappa$ B y Smad3 en mucosa gástrica y duodenal se realizaron al inicio y final de la fase experimental (Visitas 0 y 4).

#### 6.4 Diseño Experimental

Ensayo clínico fase II, tipo antes-después, estratificado por presencia/ausencia de *H. pylori* y con 4 semanas de seguimiento.



Puesto que no hay antecedente clínico sobre el uso de gamibetal (GABOB) en pacientes con daño gastroduodenal por AINEs e infección por *H. pylori*, se propuso

un ensayo clínico exploratorio fase II, donde cada participante fungió como su propio control. Con este diseño se desea evaluar si el efecto hipotético realmente ocurre y, de ser así, justificar la realización de un ensayo clínico aleatorio fase III. Una vez cumplidos los criterios de selección y mientras se programó y realizó el estudio endoscópico de inicio, los candidatos fueron sometidos a una fase de estandarización dietética de una semana de duración (Visita -1 a Visita 0), cuyo propósito fue eliminar todo alimento condimentado o irritante, así como bebidas que contengan cafeína o alcohol. Estas indicaciones dietéticas fueron seguidas durante todo el estudio. La documentación endoscópica de erosiones, así como un apego adecuado a las indicaciones dietéticas durante el período de estandarización, permitieron la incorporación del paciente al estudio, iniciándose entonces la fase experimental de cuatro semanas de duración (Visita 0 a Visita 4). Durante esta fase, los pacientes siguieron una dieta libre de irritantes, cafeína y alcohol, así como la administración de una tableta de 250 mg de GABOB (Gamibetal®) una vez al día durante cuatro semanas y fueron evaluados clínica- y bioquímicamente cada semana. Al finalizar el estudio (Visita 4), se repitió el estudio endoscópico con toma de biopsias gastroduodenales.

## 6.5 Metodologías

### 6.5.1 Determinación de secreción de citocinas y otras moléculas

La secreción de mediadores de inflamación IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y NO en el sobrenadante de los homogeneizados de biopsias de antro y duodeno y en el plasma se determinó por medio de ELISA (Biolegend, San Diego, CA; R&D systems, Mineapolis, MN; BD Bioscience, New Jersey, EU). Las microplacas de poliestireno

(NUNC y CORNING, New York, EU) se sensibilizaron con un anticuerpo monoclonal específico contra cada una de estas citocinas y otras moléculas. Se agregó el sobrenadante o plasma, o bien las diluciones del estándar de la citocina correspondiente y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. Se adicionó un segundo anticuerpo policlonal específico marcado con biotina y un agente enzimático conjugado de avidina-peroxidasa para llevar a cabo la reacción enzimática. Se agregó una solución substrato formada por tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno produciendo un compuesto colorido. La reacción se detuvo por una solución de paro de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 2N. Entre cada paso se realizaron lavados con una solución amortiguadora de fosfatos y 0.05% de Tween-20. Todo el proceso se realizó en condiciones de agitación constante a 200 rpm (Thermomixer R, Eppendorf, North Ryde, NSW). Las concentraciones de cada reactivo o solución se consideraron acorde a las instrucciones del proveedor). La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de placa (Multiskan Ascent, Labsystems, Argentina) y las concentraciones de citocinas (pg/mg y pg/ml) se obtuvieron con base a la curva estándar.

6.5.2 Determinación de la expresión de RNAm de IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , iNOS, CGRP, COX-1 y COX-2 por PCR en tiempo real.

Se aisló el RNA total de biopsias de antro y duodeno almacenadas en RNA later (Ambion, Austin, Texas) utilizando un ensayo comercial (High Pure RNA isolation kit, Roche®, Indianapolis, EU). 40  $\mu$ L (0.5-1.0  $\mu$ g) de cada RNA total fueron transcritos a cDNA utilizando un ensayo comercial (Transcriptor first strand cDNA síntesis kit, Roche®, Indianapolis, EU). Para realizar la PCR tiempo real, se diseñaron iniciadores específicos (Tabla 1), con la ayuda del Universal Probe Library Assay

Design Center (Roche®, Indianapolis, EU) y se ocuparon además sondas Universal Probe Library (UPL®) marcadas con el fluorocromo FAM para cuantificar los niveles de expresión de IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , iNOS, CGRP, COX-1 y COX-2, los cuales se normalizaron utilizando como gen endógeno gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La reacción de PCR se realizó adicionando 2  $\mu$ L (3 $\mu$ g) de cDNA y mezcla de reacción comercial (Probes Master Light Cycler 480, Roche®, Indianapolis, EU) en un volumen total de reacción de 10  $\mu$ l y se corrió a 50°C por 2 min y 95°C durante diez min seguido por 45 ciclos a 95°C 15 s, 60°C 1h en el LightCycler® 480 (Roche®, Indianapolis, Estados Unidos).

**Tabla 1.** Secuencias de iniciadores específicos utilizadas para amplificación en PCR tiempo real

Mediador	Secuencia de Iniciador <sup>a</sup> (5' - 3')	Sonda
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	F: GCCAGAGGGCTGATTAGAGA R: CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT	29
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	F: TTGCTGCCACTCAGAAACAG R: ATCTGCCACAGTCCACCTG	63
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	F: CAGCCGGTTGCTGAGGTA R: GCAGCACGTGGAGCTGTA	72
<b>IL-10</b>	F: ACAGGGAAGAAATCGATGACA R: TGGGGGAGAACCTGAAGAC	30
<b>IL-8</b>	F: ATGGTTCCTTCCGGTGGT R: AGACAGCAGAGCACACAAGC	72
<b>iNOS</b>	F: TTCTTCACTGTGGGGCTTG R: CACAGGTCTCTTCCTGGTTTG	16
<b>COX-1</b>	F: CACCCATGGGAACCAAAG R: TGGGGGTCAGGTATGAACTT	4
<b>COX-2</b>	F: TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC R: CTTACAGCATCAGTTTTTCAAG	23

<b>CGRP</b>	F: GTGATTTTCATGTCCCCCTGA R: CCGTCAGCCACCCTATTG	21
<b>GAPDH</b>	F: GCCCAATACGACCAAATCC L: AGCCACATCGCTCAGACAC	60

<sup>a</sup> F: Forward, R: Reverse Primers

### 6.5.3 Determinación de COX-1, COX-2, NF- $\kappa$ B y Smad3 mediante inmunoblot.

La proteína total fue aislada de biopsias de antro y duodeno con una solución amortiguadora de lisis que contenía un reactivo de extracción T-PER (Pierce, Rockford, IL, EU), 1 tableta de complete (Roche®, Indianapolis, EU), 1 tableta de PhosphoStop (Roche®, Indianapolis, EU), 0.1mM de DL-Ditiotreitol (Sigma, St. Louis MO, EU) de acuerdo con los protocolos del fabricante. La cuantificación de proteína total se determinó por un estuche comercial de BCA (Pierce, Rockford, IL, EU). La separación de las proteínas se realizó en geles de poliacrilamida Tris-Glicina (Lonza, Switzerland) y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilidina (GE healthcare, Fairfield, CT EU). Las proteínas fueron determinadas mediante anticuerpos contra anti-ciclooxigenase-1/PTGS1/COX1, anti-ciclooxigenase-2/PTGS2/COX2 (Imgenex, San Diego, CA), anti-phospho-NF- $\kappa$ B p65 y phospho-Smad3 (Cell Signaling Technology, Boston, EU), respectivamente. Posteriormente las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios anti-cabra o anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano, dependiendo del origen del anticuerpo primario. Las bandas inmunoreactivas fueron identificadas con un substrato de detección quimioluminiscente (Millipore, Billerica MA, EU). Finalmente en las mismas membranas, la cantidad de proteína se normalizó con un anticuerpo de anti- $\beta$ -actina (BD Transdustions Laboratories, New Jersey, EU).

#### 6.5.4 Determinación de COX-1, COX-2 y Caspasa 3 mediante Inmunohistoquímica

La detección de las COX-1, 2 y Caspasa 3 *in situ* en tejido gástrico se realizó por inmunohistoquímica por el método de la peroxidasa y avidina-biotina con anticuerpos específicos para las enzimas COX-1, COX-2 y caspasa 3. Se eliminó la parafina de las muestras de tejido gástrico en una olla de presión a 90°C durante 15 min y se hidrataron en xilol, alcohol-xilol, etanol absoluto, alcohol al 96% y agua destilada durante tres min y en agitación. Posteriormente las laminillas se incubaron con una solución de peroxidasa (mouse/rabbit immunodetector peroxidase blocker, Bio SB, Sta. Barbara CA EU) durante 5 min para bloquear la actividad de peroxidasa endógena. Las laminillas se incubaron durante 45 minutos a 37°C con el anticuerpo primario de COX-1(Ciclooxigenasa/Cox 1 (Abcam; EU), COX-2 Ciclooxigenasa-2/PTGS1/Cox-2 (Imgenex, San Diego, CA, EU) o Caspasa 3 (Santa Cruz, CA, EU) a una dilución 1:100 en diluyente green (DaVinci Green Diluent, Biocare Medical, Concord, CA, EU).

Los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (Hercep Test for Dako Autostainer, Dako, CA, EU) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó diaminobencidina como substrato (Mosue/Rabbit immuodetector HRP/DAB detection system, Bio SB, Sta. Barbara, CA, EU), esta reacción produjo un color café en las células inmunoreactivas. Las muestras se contra-tiñeron con hematoxilina de Harris y se deshidrató el tejido con alcohol al 96%, alcohol absoluto, solución de alcohol absoluto/xilol, xilol y se montaron con merkoglass (Merck, Darmstadt, Alemania).

#### 6.5.4.1 Evaluación de grado de Tinción

La evaluación de las COX-1 y COX-2 se realizó de acuerdo con el siguiente sistema de escala: la intensidad de la tinción fue graduada como ausente (0), débil (1), moderada (2), o fuerte (3), el área de tinción positiva como <10% (0) de todas las células teñidas en el citoplasma, 10-40% (1), 40-70% (2) ó  $\geq 70\%$  (3) y la tinción de glándulas positivas como ausente (0), superficial (1), intermedio (2) y profunda (3). El total de escalas por grado y área de tres o más fue definida como expresión positiva y menos de tres como negativa de acuerdo con Xiong *et al.* 2005. La caspasa 3 fue evaluada por un patólogo experto en diez campos con alto poder de resolución.

#### 6.5.5 Evaluación Histológica

Las laminillas teñidas con H&E fueron examinadas y evaluadas por el sistema de evaluación de Sydney (Dixon, *et. al.*, 1996).

### 6.6 Análisis Estadístico

Las variables cuantitativas (bioquímicas, estudios especiales) se resumieron en términos de medianas e intervalos (valores mínimo y máximo). El análisis del cambio se hizo mediante la prueba de los rangos señalados de Wilcoxon. Para analizar las diferencias entre grupos se empleó la U de Mann-Withney y. El análisis entre diferentes grupos se hizo mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Un valor  $P < 0.05$  fue considerado como estadísticamente significativo y un valor  $P < 0.1$  fue considerado como tendencia estadística.



## 7. Resultados

### 7.1 Datos demográficos de los pacientes

En el estudio se incluyeron un total de 26 pacientes, de los cuales 10 (género femenino) fueron *H. pylori* positivo con una mediana de edad de 37 años (mínimo de 23 y máximo de 64) y 16 pacientes (15 femenino/1 masculino) *H. pylori* negativo con una mediana de edad de 52 años (mínimo de 36 y máximo de 69 años). Todos los pacientes tomaron AINEs, 31% de ellos tomaron indometacina, 31% diclofenaco y el resto de los pacientes tomaron algún otro tipo de AINEs (ibuprofeno, sulindaco, naproxeno, piroxicam, paracetamol). Los pacientes tomaron diferentes dosis de AINEs durante diferentes periodos de tiempo, desde 2 meses hasta 10 años. Los sujetos del estudio presentaron diferentes gastropatías evaluadas mediante endoscopia: gastropatía nodular y erosiva, gastritis crónica leve superficial en antro y cuerpo, gastropatía eritematosa y erosiva antral, gastropatía crónica con cambios por reflujo alcalino en cuerpo y antro, gastritis crónica folicular inactiva. No se encontró relación entre el tiempo de ingesta de los AINEs, el tipo de gastropatía y la presencia o ausencia de la bacteria *H. pylori*. El cuestionario SODA, que es un instrumento válido para usar como medida de tolerabilidad de síntomas dispépticos, fue aplicado en todos los pacientes en la visita 1 y al final del tratamiento con el GABOB. Los resultados mostraron que el 60 % de pacientes *H. pylori* positivo y el 69 % de pacientes *H. pylori* negativo mejoraron la tolerabilidad a los síntomas dispépticos como resultado del tratamiento con el GABOB.

## 7.2 Elementos inflamatorios y muerte celular en mucosa gástrica

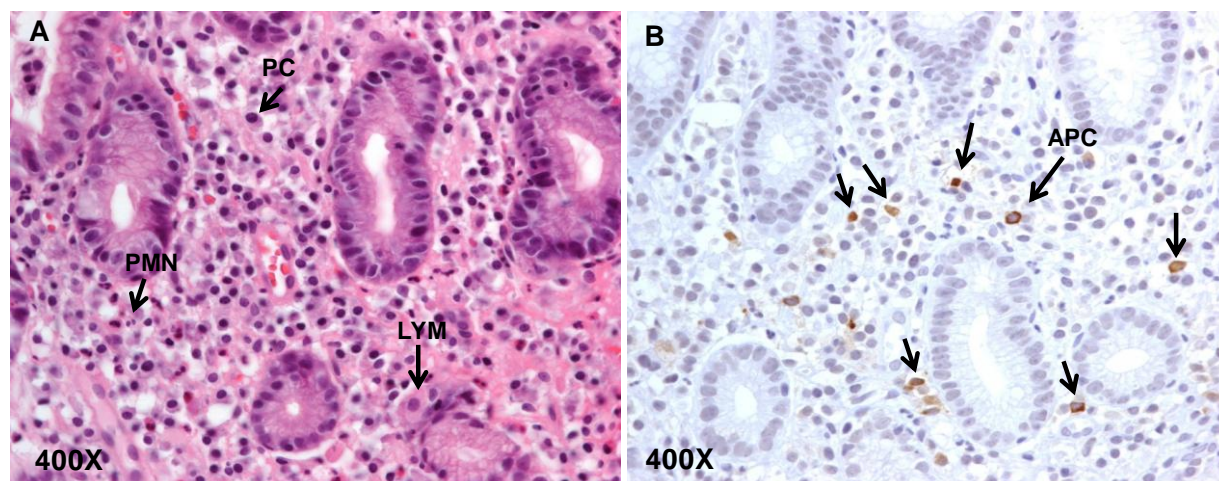
### 7.2.1 Evaluación de Sydney

Se evaluaron las biopsias de antro en la visita 0, después de la estandarización dietética y antes del tratamiento con el GABOB de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio. Las biopsias se tiñeron con hematoxilina-eosina y se realizó la evaluación histológica. Se observó infiltrado mononuclear en pacientes *H. pylori* positivo (30% medio y 70% moderado), mientras que en las biopsias de pacientes *H. pylori* negativo se observó un 50% (43.75% medio y 6.25% moderado). El infiltrado polimorfonuclear en los casos de *H. pylori* positivo fue de 80% (70% medio y 10% moderado). En *H. pylori* negativo se presentó 12% de infiltrado neutrofílico (6.25% medio y el mismo porcentaje de moderado). Los neutrófilos se encontraron en la lámina propia, particularmente en el epitelio glandular, cuello y lumen foveolar. Las células mononucleares se presentaron en la lámina propia de la mucosa gástrica e infiltrado linfoplasmocitario en el citoplasma.

Se evaluó la muerte celular mediante la caspasa 3 activa y el daño inflamatorio en biopsias de antro en la visita 0, después de la estandarización dietética y antes del tratamiento con el GABOB (Figura 1).

El estado inflamatorio de pacientes *H. pylori* positivo y negativo se corroboró con el infiltrado linfoplasmocitario que se observó en las biopsias de mucosa antral, se encontró principalmente neutrófilos (PMN), linfocitos (LYM) y células plasmáticas (PC) en la lámina propia de la mucosa gástrica (Figura 2a). También se observaron células apoptóticas determinadas en 10 campos de alta resolución en cada biopsia.

No se encontró diferencia entre pacientes *H. pylori* positivo y negativo, se encontró una media de 23 células apoptóticas por 10 campos de alta resolución (Figura 1b).



**Figura 1.** Elementos inflamatorios y de muerte celular en mucosa gástrica de pacientes con AR bajo tratamiento de AINEs. A) biopsia de mucosa antral teñida con Hematoxilina-Eosina antes del tratamiento con el GABOB, se observa el infiltrado linfoplasmocitario principalmente en la lámina propia de la mucosa gástrica (neutrófilos (PMN), linfocitos (LYM) y células plasmáticas (PC)). B) Inmunohistoquímica de caspasa 3 en biopsia de antro antes del tratamiento con el GABOB, se observan células apoptóticas (APC) en un campo de alta resolución.

### 7.3. Secreción *in situ* de TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-8 y NO

La mediana de secreción de contenido de los mediadores IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y NO de biopsias de antro y duodeno antes y después del tratamiento con el GABOB, expresada como pg/mg de proteína, se muestra en las tablas 2 y 3.

**Tabla 2.** Mediana de secreción del contenido de mediadores de daño gástrico en biopsias de antro.

ANTRO			
MEDIADOR	ANTES DEL GABOB	DESPUES DEL GABOB	P
IL-8	121.25(77.81-169.17)	105.41(87.37-150.75)	P<0.90
IL-10	22.55(3.26-129.07)	11.71(0-71.87)	P<0.70
TNF- $\alpha$	39.73(14.82-64.12)	27.48(1.42-71.5)	P<0.34
TGF- $\alpha$	20.08(115.17-326.30)	19.80(132.80-263.78)	P<0.26

TGF- $\beta$	0(0-1)	1(0-1)	P<0.73
NO	77.05(27.95-104.84)	51.01(30.39-86.43)	P<0.30

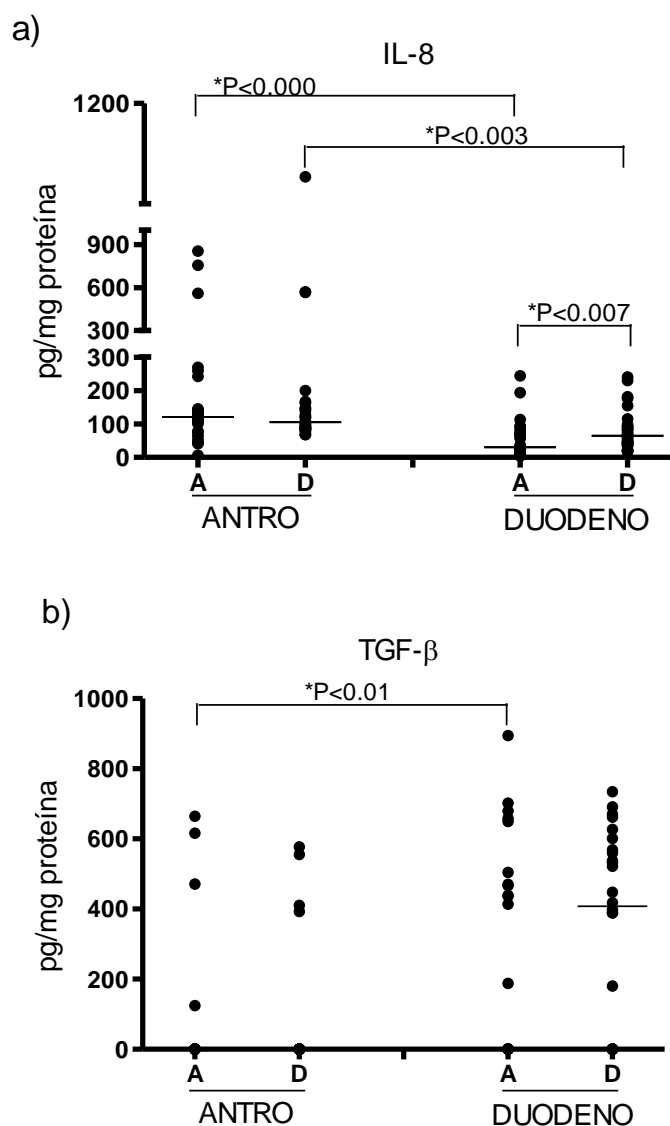
Mediana (percentil 25 y 75) expresada en pg/mg de proteína en biopsias de antro y duodeno.\*P<0.05 significancia estadística, \*\*P<0.1 tendencia estadística obtenida por medio de la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. (GABOB= ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico).

**Tabla 3.** Mediana de secreción del contenido de mediadores de daño gástrico en biopsias de duodeno.

DUODENO			
MEDIADOR	ANTES DEL GABOB	DESPUES DEL GABOB	P
IL-8	30.01(16.28-74.08)	65.04(38.51-102.2)	P<0.007
IL-10	17.34(0-49.33)	19.98(0-35.41)	P<0.37
TNF- $\alpha$	32.66(2.08-72.5)	44.24(1.4-71.5)	P<0.20
TGF- $\alpha$	21.08(131.6-353.1)	20.37(131.7-341.4)	P<0.92
TGF- $\beta$	0(0-479.2)	408.15(1-576.8)	P<0.24
NO	47.07(27.37-108.4)	71.77(24.27-106.3)	P<0.38

Mediana (percentil 25 y 75) expresada en pg/mg de proteína en biopsias de antro y duodeno.\*P<0.05 significancia estadística, \*\*P<0.1 tendencia estadística obtenida por medio de la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. (GABOB= ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico).

La mediana de secreción de IL-8 en duodeno presentó significancia estadística ( $p<0.007$ ) entre el antes-después de la administración del GABOB con una mediana de 30.01 pg/mg (16.28-74.08) antes y una mediana de 65.04 pg/mg (38.5-102.2) de proteína después del tratamiento con el GABOB. También se encontró significancia estadística en el antes y después del tratamiento con el GABOB entre antro y duodeno ( $p<0.000$ ) (Gráfica 1a). El TGF- $\beta$  únicamente presentó significancia estadística entre el antes del GABOB en antro comparado con el duodeno ( $p<0.01$ ) (Gráfica 1b). Los mediadores de daño gástrico IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$  y NO, no mostraron diferencia estadística (Anexo 1).



**Gráfica 1.** Secreción de Citocinas en biopsias de antro y duodeno antes y después de la exposición al GABOB. a) Interleucina 8 (IL-8), b) Factor transformante de crecimiento tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). (A=antes, D=después de la administración del GABOB). Valor expresado en unidades de concentración pg/mg de proteína. La barra representa los valores de mediana.  $p < 0.05$  denota significancia estadística obtenida por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon.

La mediana de expresión de contenido de los mediadores, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y NO de las biopsias de antro y duodeno de pacientes *H. pylori* positivo y negativo antes y después del GABOB, expresada como pg/mg de proteína, se muestra en las tablas 4 y 5.

**Tabla 4.** Mediana de expresión del contenido de mediadores de daño gástrico en antro de pacientes *H. pylori* positivo y negativo.

ANTRO						
MEDIA DOR	ANTES DEL GABOB			DESPUES DEL GABOB		
	Hp+	Hp-	P	Hp+	Hp-	P
IL-8	201.85(108.8-609.1)	114.04(77-127.86)	P<0.05	165.18(117.6-566.94)	89.67(85.06-116.06)	P<0.01
IL-10	25.35(12.25-63.64)	16.66(0-164.91)	P<0.33	25.13(4.14-122.43)	2.71(0-52.33)	P<0.38
TNF- $\alpha$	22.33(5.06-64.12)	44.01(2.4-64.9)	P<0.79	11.28(0-39.04)	32.56(4.8-32.5)	P<0.76
TGF- $\alpha$	188.13(120.49-269.29)	236.73(113.84-360.07)	P<0.79	145.56(132.80-263.78)	221.53(118.98-288.78)	P<0.28
TGF- $\beta$	0.05(0-1)	0(0-1)	P<0.33	0(0-1)	0(0-294.91)	P<0.22
NO	93.89(49.29-118.35)	48.67(27.66-103.19)	P<0.20	65.94(32.94-139.47)	47.41(26.95-81.56)	P<0.24

Mediana (percentil 25 y 75) expresada en pg/mg de proteína en biopsias de antro y duodeno. \*P<0.05 significancia estadística, \*\*P<0.1 tendencia estadística obtenida por medio de la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. (Hp+, Hp- = *Helicobacter pylori* positivo y negativo, GABOB = ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico).

**Tabla 5.** Mediana de expresión de contenido de mediadores de daño gástrico en duodeno de pacientes *H. pylori* positivo y negativo.

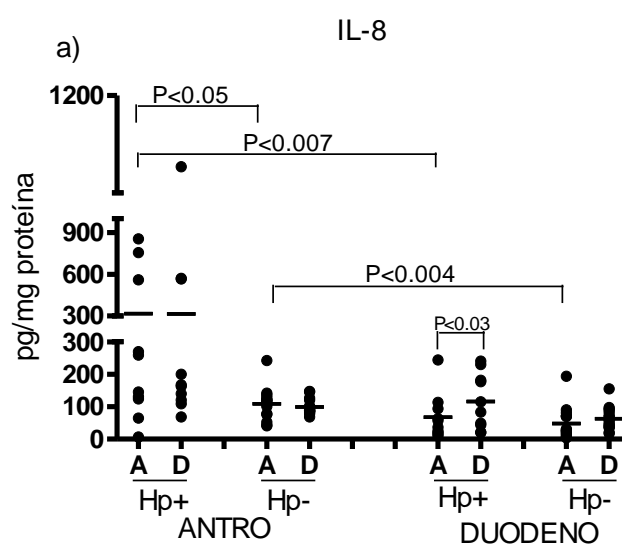
DUODENO						
MEDIA DOR	ANTES DEL GABOB			DESPUES DEL GABOB		
	Hp+	Hp-	P	Hp+	Hp-	P
IL-8	46.54(18.67-98.73)	27.36(16.27-71.38)	P<0.20	99.26(37.72-193.23)	58.19(38.87-87.58)	P<0.03
IL-10	14.86(5.35-32.47)	18.35(0-74.86)	P<0.09	25.09(14.58-36.05)	5.53 (0-35.53)	P<0.64
TNF- $\alpha$	24.15(0-58.60)	48.12(8.7-48.12)	P<0.44	41.07(12.7-62.44)	45.96(1.49-459.6)	P<0.50
TGF- $\alpha$	213.80(1.33.62-370.32)	210.82(124.77-352.40)	P<0.44	230.79(155.45-445.42)	198.51(79.91-312.05)	P<0.04
TGF- $\beta$	10(0.07-669.72)	93.89(0-469.84)	P<0.67	209.03(1-569.92)	423.04 (45.1-612.5)	P<0.20
NO	63.42(41.01-111.39)	46.59 (21.66-103.65)	P<0.50	89.81(44.95-143.9)	50.92(21.95-100.28)	P<0.33

Mediana (percentil 25 y 75) expresada en pg/mg de proteína en biopsias de antro y duodeno. \*P<0.05 significancia estadística, \*\*P<0.1 tendencia estadística obtenida por medio de la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. (Hp+, Hp- = *Helicobacter pylori* positivo y negativo, GABOB = ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico).

La diferencia de expresión de IL-8 en antro de pacientes *H. pylori* positivo y negativo antes de la administración del GABOB fue estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ),

con una mediana de 201.85 pg/mg en *H. pylori* positivo (109-700 pg/mg) y una mediana de 114.04 pg/mg en *H. pylori* negativo (77-128 pg/mg). Después del tratamiento con el GABOB no se encontraron diferencias en las biopsias de antro. En duodeno la concentración de IL-8 aumentó como resultado del tratamiento con el GABOB en pacientes *H. pylori* positivo y *H. pylori* negativo, la mediana fue de 99.26 pg/mg en *H. pylori* positivo (38-193 pg/mg) y una mediana de 58.19 pg/mg en *H. pylori* negativo (38-88 pg/mg) de proteína. El contenido de IL-8 entre antes/después del tratamiento con GABOB en pacientes *H. pylori* positivo fue estadísticamente significativo ( $p < 0.03$ ) (Gráfica 2a).

Los demás mediadores de daño gástrico IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y NO, no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Anexo 2).



**Gráfica 2.** Secreción de Citocinas en biopsias de antro y duodeno de pacientes *H. pylori* positivo y negativo antes y después de la exposición al GABOB. a) Interleucina 8 (IL-8). Valor expresado en unidades de concentración pg/mg de proteína. La barra representa los valores de mediana.  $p < 0.05$  denota significancia estadística obtenida por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. (A= antes, D= después del GABOB, Hp+, Hp- = *Helicobacter pylori* positivo y negativo).

### 7.3.1 Producción plasmática de IL-10, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ y NO

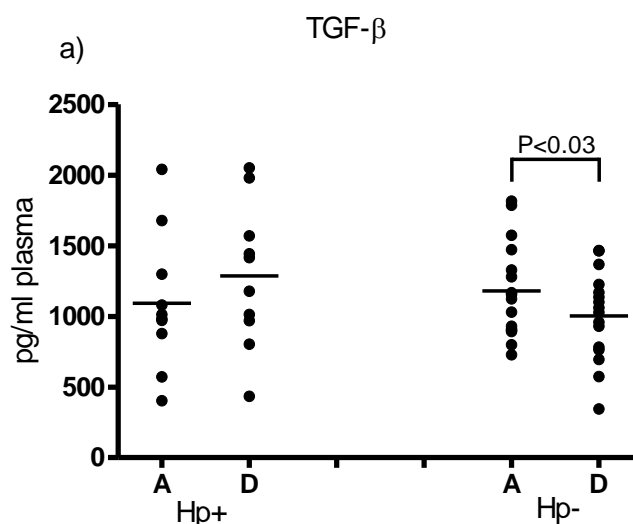
La mediana de la producción plasmática de los mediadores de daño gástrico TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y NO expresada en pg/ml, en pacientes *H. pylori* positivo y negativo se muestra en la tabla 6 y anexo 3. La diferencia de producción de TGF- $\beta$  entre antes y después de la administración del GABOB en pacientes *H. pylori* negativo disminuyó siendo estadísticamente significativa ( $p < 0.03$ ) como resultado del tratamiento con el GABOB (Gráfica 3a). IL-10, IL-8 y TNF- $\alpha$ , no se detectaron a nivel sistémico tanto en pacientes *H. pylori* positivo así como en negativos.

**Tabla 6.** Mediana de producción plasmática de mediadores de daño gástrico de pacientes *H. pylori* positivo y negativo antes y después de la administración del GABOB.

MEDIA DOR	<i>H. pylori</i> Negativo			<i>H. pylori</i> Positivo		
	ANTES DEL GABOB	DESPUES DEL GABOB	P	ANTES DEL GABOB	DESPUES DEL GABOB	P
TGF- $\alpha$	145.3 (0-24004)	155 (0-23898)	$p < 0.1$	38.0 (0-983.8)	95.6 (0-1044.2)	$p < 0.8$
TGF- $\beta$	1139.5 (729-1815)	1044.7(345-1466)	$p < 0.03^*$	998.5 (404-240)	1297.5 (434-2050)	$p < 0.09$
NO	19.3 (0-146.6)	15.7 (0-78.5)	$p < 1.0$	28.7 (0-72.5)	24.8 (0-42.4)	$p < 0.3$

Mediana (percentil 25 y 75) de producción plasmática de determinadores de inflamación expresada en pg/mL.\* $P < 0.05$  Significancia estadística. \*\* $P < 0.1$  tendencia estadística obtenida por medio de la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. (Hp-, Hp+ = *Helicobacter pylori* negativo, positivo).





**Gráfica 3.** Determinación sistémica de TGF-β en pacientes *H. pylori* positivo y negativo antes y después de la exposición al GABOB. Factor transformante de crecimiento tipo β (TGF-β). Valor expresado en unidades de concentración pg/ml de plasma. La barra representa los valores de mediana.  $p < 0.05$  denota significancia estadística obtenida por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. (A= antes, D= después del GABOB, Hp+, Hp- = *Helicobacter pylori* positivo y negativo).

#### 7.4 Expresión de RNAm de IL-10, IL-8, TNF-α, TGF-β, TGF-α, iNOS, CGRP, COX-1 y COX-2

La expresión de genes mediadores de daño gástrico de biopsias de antro y duodeno fue diferencial. El promedio de expresión de mediadores de daño gástrico IL-8, IL-10, TNF-α, TGF-α, TGF-β, iNOS, CGRP, COX-1 y COX-2 de los pacientes incluidos en el estudio antes y después del tratamiento con el GABOB se muestra en la tabla 7.

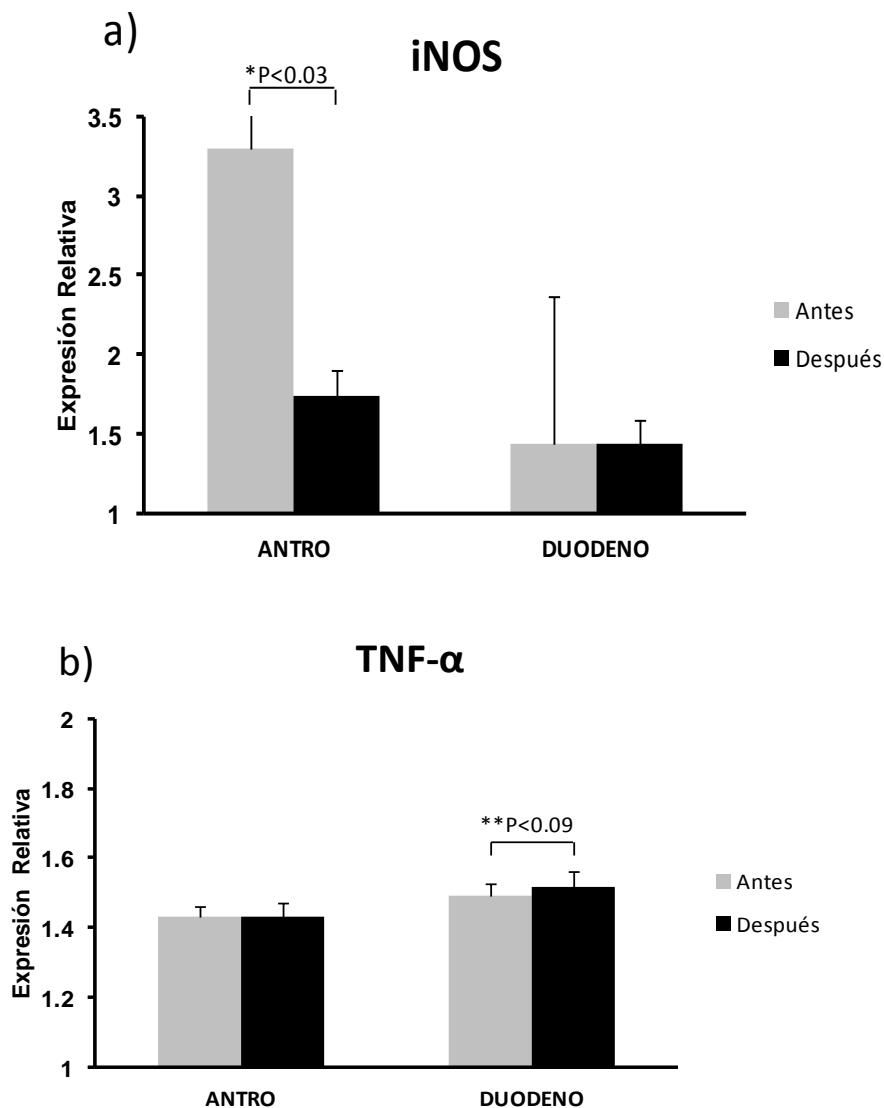
**Tabla 7.** Promedio de expresión de RNAm de mediadores de daño gástrico en antro y duodeno después de la administración del GABOB.

GEN	ANTRO			DUODENO		
	ANTES DEL GABOB	DESPUES DEL GABOB	P	ANTES DEL GABOB	DESPUES DEL GABOB	P
IL-8	1.47(1.22-1.67)	1.49(1.27-1.67)	P<0.29	1.73(1.58-2.03)	1.76(1.59-2.04)	P<0.91

IL-10	1.46(1.33-1.71)	1.46(1.35-1.45)	P<0.87	1.51(1.36-1.68)	1.53(1.35-1.89)	P<0.47
TNF- $\alpha$	1.43(1.32-1.58)	1.42(1.25-1.53)	P<0.97	1.49(1.34-1.66)	1.51(1.35-1.52)	P<0.09
TGF- $\alpha$	1.23(1.10-1.37)	1.22(1.05-1.34)	P<0.94	1.34(1.20-1.43)	1.36(1.24-1.65)	P<0.14
TGF- $\beta$	1.36(1.27-1.47)	1.36(1.21-1.45)	P<0.68	1.40(1.28-1.51)	1.42(1.29-1.72)	P<0.33
iNOS	3.30(0-28.25)	1.74(1.16-1.68)	P<0.03	1.43(1.16-1.68)	1.42(1.11-1.67)	P<0.47
CGRP	1.79(1.41-2.0)	1.78(1.36-1.93)	P<0.95	1.97(1.79-2.14)	1.97(1.77-2.56)	P<0.46
COX-1	1.18(1.10-1.24)	1.17(1.10-1.25)	P<0.85	1.23(1.18-1.26)	1.23(1.18-1.25)	P<0.71
COX-2	1.74(1.15-2.12)	1.29(0.89-1.84)	P<0.10	1.67(1.21-2.06)	1.68(1.21-2.03)	P<1.0

Promedio (mínimo-máximo) en unidades relativas de expresión. Valores de \*P<0.05 significancia estadística, \*\*P<0.1 tendencia estadística obtenida por medio de la prueba de rangos señalados de Wilcoxon.

El promedio de expresión del RNAm de iNOS en antro presentó una disminución estadísticamente significativa ( $p<0.03$ ) después del tratamiento con el GABOB (Gráfica 4a). La expresión del RNAm de TNF- $\alpha$  en duodeno después del GABOB mostró un incremento con tendencia estadística ( $p<0.09$ ) (Gráfica 4b). Los demás mediadores de daño gástrico TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-8, CGRP, COX-1 y COX-2, no mostraron significancia estadística. (Anexo 4).



**Gráfica 4.** Expresión de RNAm de mediadores de daño gástrico. a) Oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) b) Factor de necrosis tumoral tipo  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Valor expresado en unidades de expresión relativa. Las barras representan los valores del promedio. \*p<0.05 Significancia estadística, \*\*p<0.10 Tendencia a la significancia, obtenidas por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon (antes vs. después de GABOB = ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico).

El promedio de expresión de los diferentes mediadores de daño gástrico TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-8, iNOS, CGRP, COX-1 y COX-2 de las biopsias de antro y duodeno de pacientes *H pylori* positivo y negativo fue diferencial y se expresa en unidades relativas de expresión (Tablas 8 y 9).

**Tabla 8.** Promedio de expresión de RNAm en antro de diferentes mediadores de daño gástrico en pacientes *H pylori* positivo y negativo.

ANTRO						
GEN	ANTES DEL GABOB			DESPUES DEL GABOB		
	Hp+	Hp-	P	Hp+	Hp-	P
IL-8	1.42(1.33-1.56)	1.49(1.22-1.67)	P<0.12	1.45(1.41-1.51)	1.51(1.27-1.68)	P<0.39
IL-10	1.42(1.33-1.52)	1.49(1.38-1.71)	P<0.07	1.40(1.35-1.45)	1.49(1.37-1.58)	P<0.02
TNF- $\alpha$	1.41(1.32-1.51)	1.43(1.35-1.58)	P<0.49	1.41(1.33-1.52)	1.43(1.25-1.53)	P<0.49
TGF- $\alpha$	1.27(1.19-1.37)	1.20(1.10-1.31)	P<0.12	1.26(1.15-1.34)	1.21(1.05-1.30)	P<0.39
TGF- $\beta$	1.36(1.30-1.43)	1.37(1.28-1.47)	P<0.73	1.36(1.28-1.44)	1.36(1.21-1.45)	P<0.86
INOS	1.68(1.38-2.10)	1.61(1.28-1.84)	P<0.75	1.70(1.41-2.05)	1.80(1.54-1.97)	P<0.24
CGRP	1.82(1.48-2.0)	1.78(1.41-1.97)	P<0.46	1.84(1.72-1.93)	1.74(1.36-1.91)	P<0.17
COX-1	1.17(1.12-1.23)	1.18(1.10-1.24)	P<0.71	1.17(1.09-1.23)	1.17(1.07-1.25)	P<1.0
COX-2	1.94(1.94-1.94)	1.64(1.15-2.12)	P<0.3	1.84(1.84-1.84)	1.02(0.89-1.15)	P<0.18

Promedio (mínimo-máximo) expresado en unidades relativas de expresión. Valores de \*P<0.05 significancia estadística, \*\*P<0.1 tendencia estadística obtenida por medio de la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. (Hp+, Hp- = *Helicobacter pylori* positivo y negativo, GABOB = ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico).

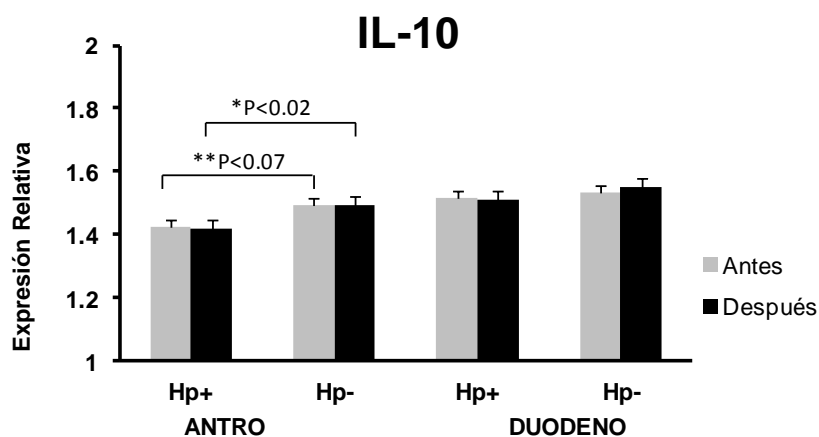
**Tabla 9.** Promedio de expresión de RNAm en duodeno de diferentes mediadores de daño gástrico en pacientes *H pylori* positivo y negativo.

DUODENO						
GEN	ANTES DEL GABOB			DESPUES DEL GABOB		
	Hp+	Hp-	P	Hp+	Hp-	P
IL-8	1.73(1.60-1.82)	1.73(1.58-2.03)	P<0.77	1.17(1.61-1.79)	1.79(1.59-2.04)	P<0.16
IL-10	1.49(1.42-1.58)	1.53(1.36-1.68)	P<0.50	1.51(1.44-1.58)	1.54(1.35-1.89)	P<0.68
TNF- $\alpha$	1.48(1.42-1.56)	1.49(1.34-1.66)	P<0.67	1.50(1.41-1.60)	1.52(1.35-1.79)	P<0.77
TGF- $\alpha$	1.33(1.23-1.38)	1.34(1.20-1.43)	P<0.67	1.35(1.24-1.40)	1.36(1.24-1.65)	P<0.67

TGF- $\beta$	1.40(1.34-1.49)	1.41(1.28-1.51)	P<1.0	1.41(1.33-1.50)	1.42(1.29-1.72)	P<0.48
INOS	1.40(1.17-1.55)	1.45(1.16-1.68)	P<0.86	1.39(1.11-1.67)	1.44(1.20-1.64)	P<0.73
CGRP	1.95(1.79-2.03)	1.98(1.81-2.14)	P<1.0	1.91(1.77-2.01)	2.01(1.82-2.56)	P<0.20
COX-1	1.22(1.18-1.26)	1.24(1.24-1.24)	P<0.65	1.21(1.18-1.24)	1.25(1.25-1.25)	P<0.18
COX-2	1.71(1.39-2.03)	1.64(1.21-2.06)	P<0.65	1.75(1.4-2.03)	1.62(1.21-2.02)	P<0.18

Promedio (mínimo-máximo) expresado en unidades relativas de expresión. Valores de \*P<0.05 significancia estadística, \*\*P<0.1 tendencia estadística obtenida por medio de la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. (Hp+, Hp- = *Helicobacter pylori* positivo y negativo, GABOB = ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico).

En antro, el promedio de expresión del RNAm de IL-10 de pacientes *H. pylori* positivo y negativo después de la administración del GABOB presentó un incremento estadísticamente significativo ( $p<0.02$ ). Antes de la administración del GABOB se observó un ligero incremento en la expresión del RNAm de IL-10 en la región de antro, sin embargo solo presento cierta tendencia estadística ( $p<0.07$ ) (Gráfica 5). Mientras que en duodeno de pacientes *H. pylori* positivo como negativo, no se presentaron cambios estadísticamente significativos. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la expresión del RNAm de los demás genes estudiados (IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , iNOS, CGRP, COX-1, COX-2). Así como no hubo diferencia entre biopsias de antro y duodeno en pacientes *H. pylori* positivo y negativo antes-después del tratamiento con el GABOB (Anexo 5).



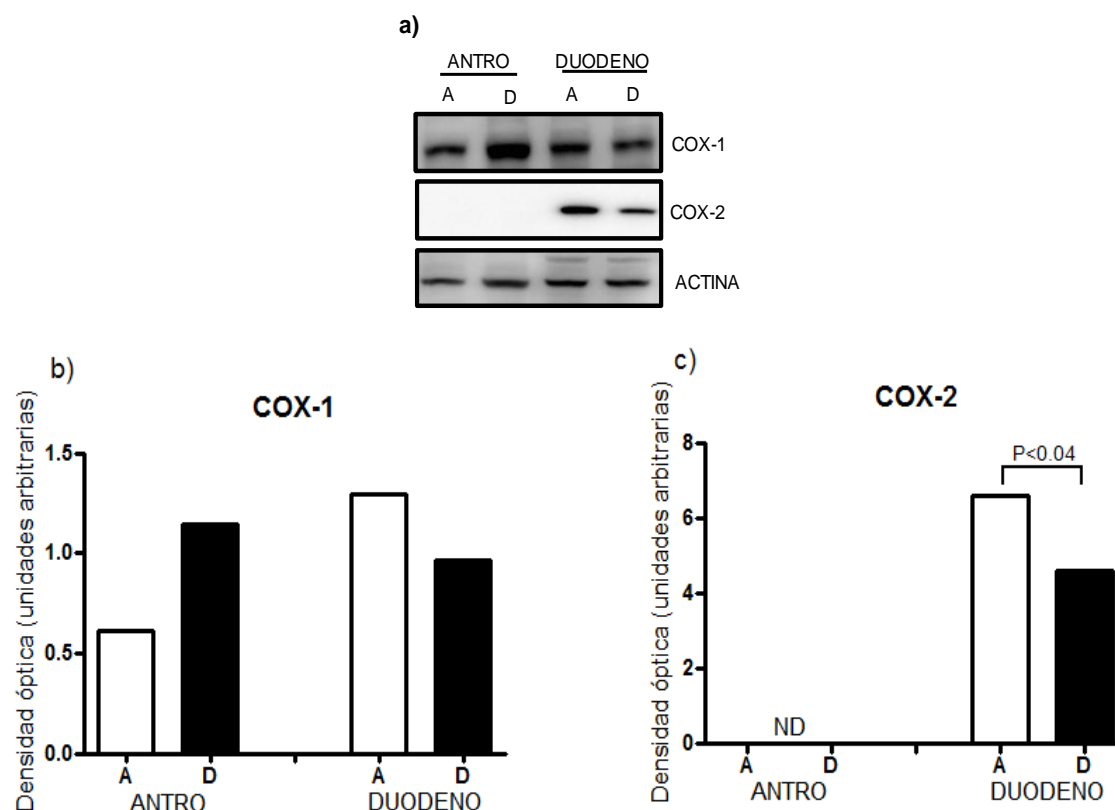
**Gráfica 5.** Expresión de RNAm de IL-10 en biopsias de antro y duodeno antes-después de la administración del GABOB en pacientes *H. pylori* positivo y negativo. Interleucina 10 (IL-10). Valor expresado en unidades de expresión relativa. Las barras representan los valores del promedio. \*p<0.05 Significancia estadística, \*\*p<0.10 Tendencia a la significancia, obtenidas por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon (antes vs. después de GABOB = ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico). (Hp+, Hp- = *Helicobacter pylori* positivo y negativo).

#### 7.5. Expresión de las enzimas COX-1, COX-2 y factores de transcripción NF- $\kappa$ B y SMAD3

La expresión de las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 y de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y Smad3 de los pacientes incluidos en el estudio fue diferencial en biopsias de antro con respecto a duodeno antes y después del tratamiento con GABOB (Gráficas 6-9), determinadas mediante western-blot.

La expresión de la proteína COX-1 se detectó en biopsias de antro y duodeno de los pacientes (Imagen 6a). En antro después del tratamiento con el GABOB se observó un aumento en la expresión de la enzima aunque no presentó significancia estadística (P<0.000) (Figura 6b). En duodeno se presentó el efecto contrario, es decir, la expresión de COX-1 disminuyó después de la administración del GABOB (Gráfica 6b). Con respecto a la expresión de COX-2 solo se detectó en duodeno

(Figura 6a), observándose una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.04$ ) después del tratamiento con el GABOB. Sin embargo, en antro no se detectó la expresión de la proteína antes ni-después de la administración del GABOB (Gráfica 6c).



**Gráfica 6.** Ciclooxygenasas 1 y 2 en biopsias de antro y duodeno antes-después del tratamiento con el GABOB. a) Imagen representativa de electroforesis de las ciclooxygenasas tipo 1 y 2, b) ciclooxygenasa tipo 1 (COX-1), c) ciclooxygenasa tipo 2 (COX-2). \* $p < 0.05$  Significancia estadística, obtenidas por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. (A= antes, D= después de GABOB = ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico). *Immunoblot* representativo de un experimento por duplicado.

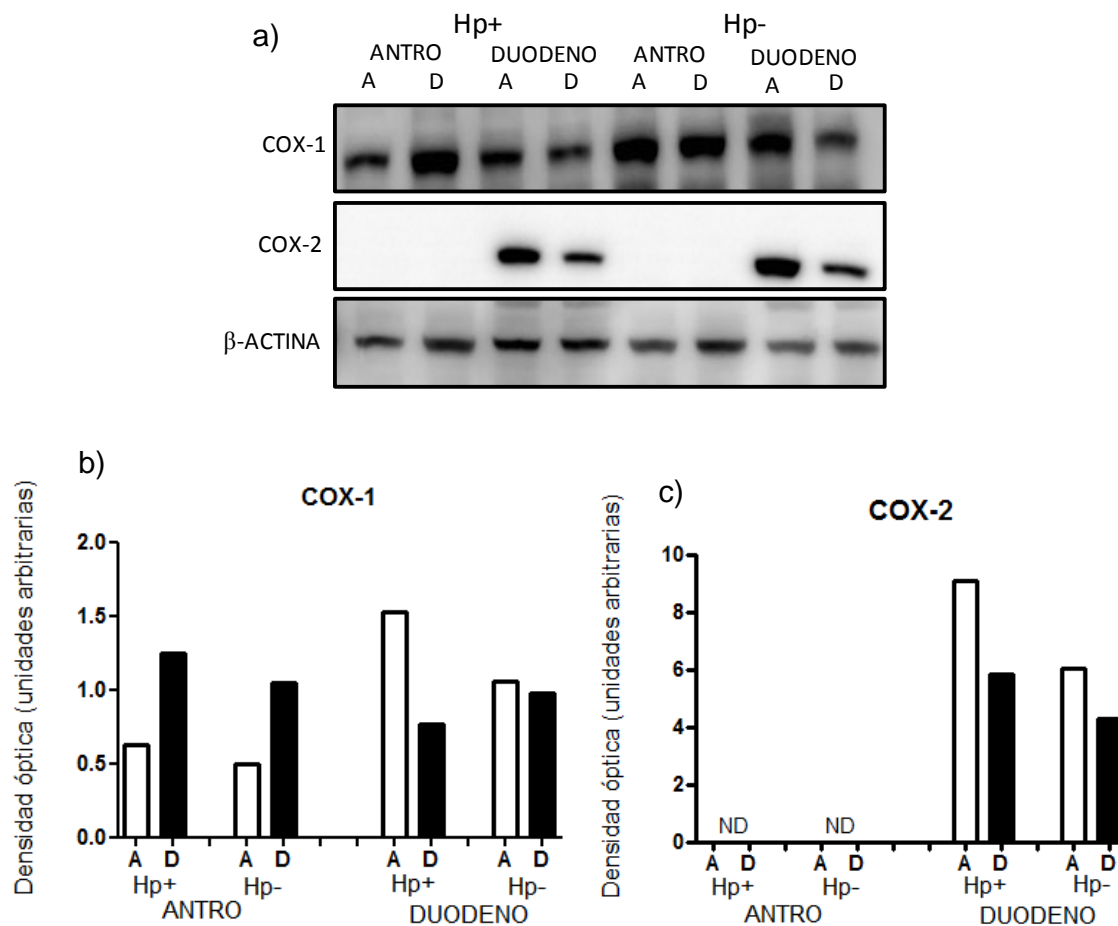
La expresión de la COX-1 se detectó en biopsias de antro y duodeno de pacientes *H. pylori* positivo y negativo (Imagen 7a). En antro de pacientes *H. pylori* positivo se observó una mediana de 0.62 (0.05-24.8) antes de la administración del GABOB. Mientras que, después de la administración del GABOB se presentó un aumento de expresión con una mediana de 1.24 (0.23-21.2) aunque este aumento no fue

---

estadísticamente significativo. En relación al duodeno, después del tratamiento con el GABOB se presentó una disminución con una mediana de 0.76 (0.20-1.37) vs 1.52 (0.37-2.23), aunque esta disminución no fue estadísticamente significativa. Es importante mencionar que no se presentaron diferencias entre la presencia o ausencia de *H. pylori* versus antro y duodeno (Gráfica 7b).

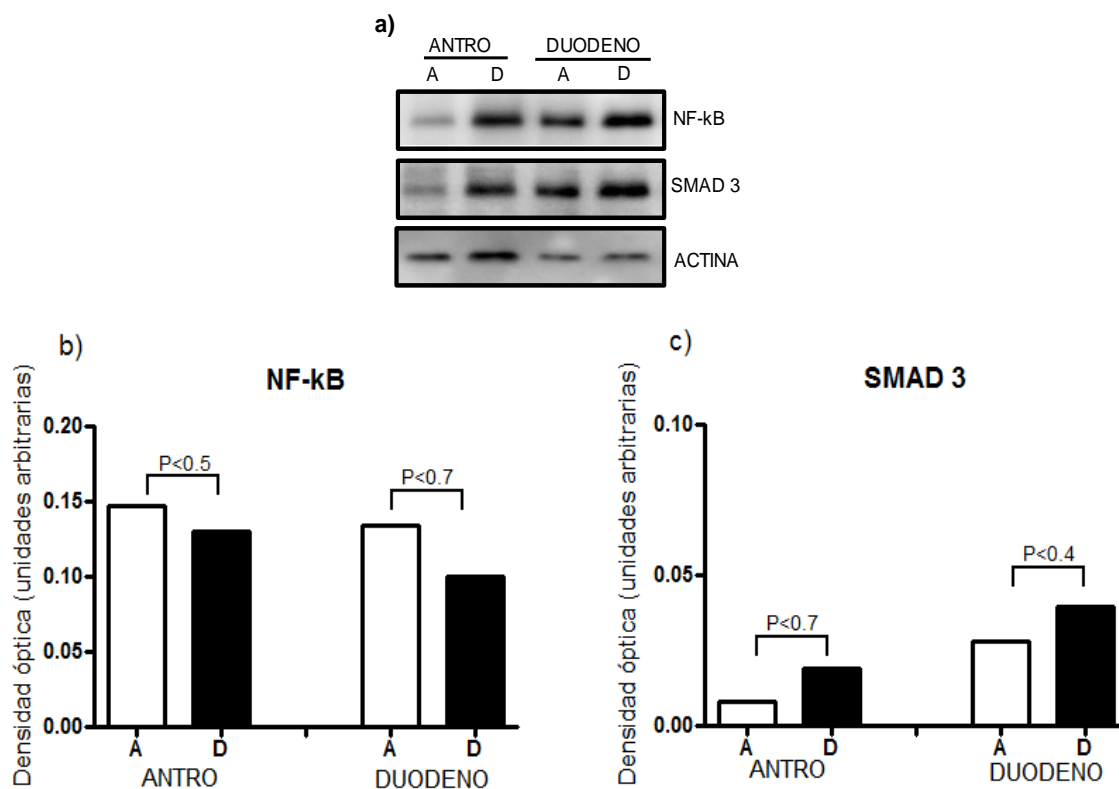
La expresión de COX-2 solo se detectó en biopsias de duodeno de pacientes *H. pylori* positivo y negativo antes y después de la administración del GABOB (Imagen 7a), en ambos grupos de pacientes se presentó una disminución de la expresión con mediana de 4.5 (2.1-12.8) después del tratamiento con el GABOB, esta disminución fue estadísticamente significativa ( $p < 0.04$ ). En antro no se detectó la expresión de COX-2 en pacientes *H. pylori* positivo y negativo antes y después del tratamiento con el GABOB (Gráfica 7c).





**Gráfica 7.** Ciclooxygenasas 1 y 2 en biopsias de antro y duodeno de pacientes *H. pylori* positivo y negativo antes-después del tratamiento con el GABOB. a) Imagen representativa de electroforesis de las ciclooxygenasas tipo 1 y 2, b) ciclooxygenasa tipo 1 (COX-1), c) ciclooxygenasa tipo 2 (COX-2). \* $p < 0.05$  Significancia estadística, obtenidas por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. (A= antes, D= después de GABOB = ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico, Hp+, Hp- = *Helicobacter pylori* positivo y negativo). Inmunotransferencia representativa de un experimento por duplicado.

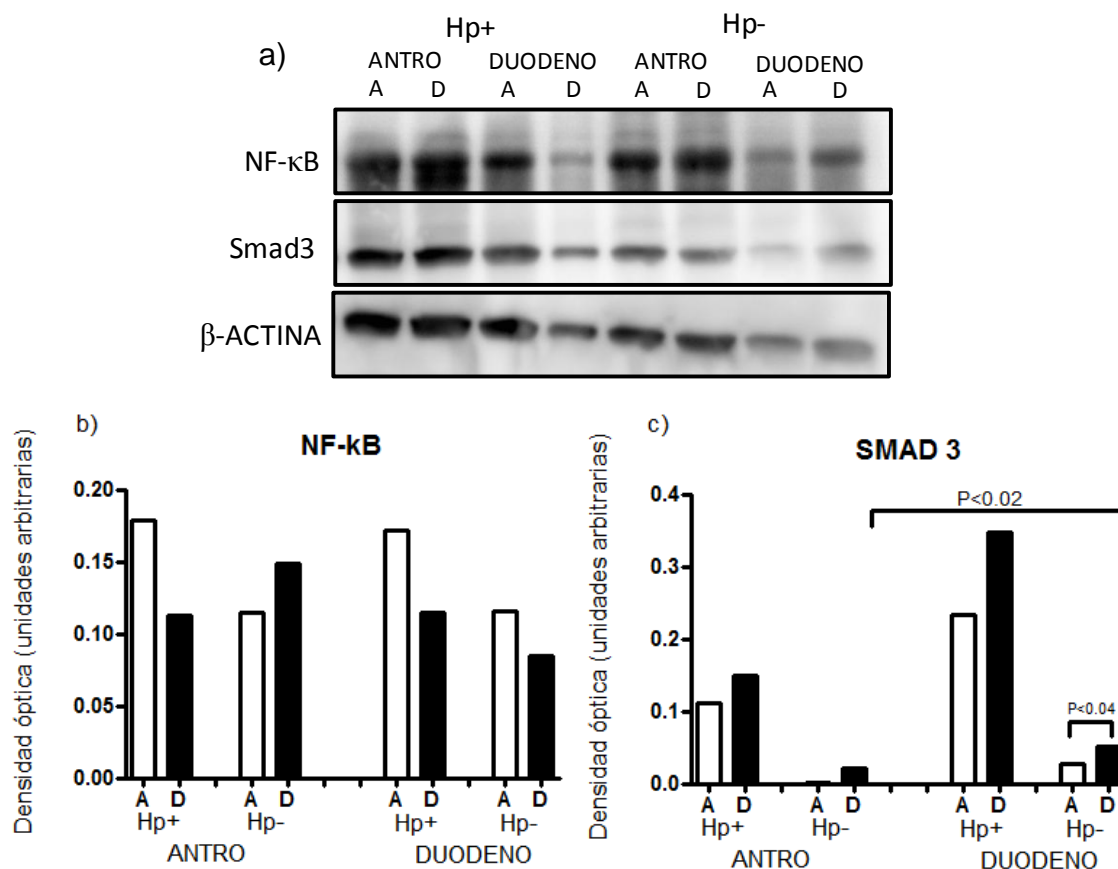
La expresión del factor nuclear  $\kappa$ B y Smad 3 se detectó en antro y duodeno de los pacientes incluidos en el estudio (Imagen 8a). En ambas regiones, NF- $\kappa$ B no presentó cambios después de la administración del GABOB (Gráfica 8b). Con respecto a Smad 3, no se observó diferencia en antro y duodeno (Gráfica 8c).



**Gráfica 8.** Expresión de NF- $\kappa$ B y Smad3 en biopsias de antro y duodeno antes-después del tratamiento con el GABOB. a) Imagen representativa de la electroforesis de NF- $\kappa$ B y Smad3, b) Factor nuclear  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B), c) *Signal mothers againts decapentaplegic homolog 3* (Smad3). \* $p < 0.05$  Significancia estadística, obtenidas por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. (A= antes, D= después de GABOB = ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico). *Inmunoblot* representativo de un experimento por duplicado.

La expresión del factor nuclear  $\kappa$ B y Smad3 se detectó en antro y duodeno de pacientes *H. pylori* positivo y negativo (Imagen 9a). En antro de pacientes *H. pylori* positivo disminuyó la expresión de NF- $\kappa$ B después del tratamiento con GABOB, mientras que en pacientes *H. pylori* negativo se observó un aumento de la proteína después de la administración del GABOB. En duodeno de pacientes *H. pylori* positivo y negativo, NF- $\kappa$ B no mostró cambios después de la administración del GABOB, (Gráfica 9b). Con respecto a Smad3 en antro de pacientes *H. pylori* positivo y negativo no se observó diferencia en la proteína después del tratamiento con el GABOB. En duodeno de pacientes *H. pylori* positivo y negativo se presentó un

aumento en la expresión de Smad3 y fue estadísticamente significativo ( $p < 0.04$ ) en pacientes *H. pylori* negativo después del tratamiento con el GABOB (Gráfica 9c).



**Gráfica 9.** Expresión de NF-κB y Smad3 en biopsias de antro y duodeno de pacientes *H. pylori* positivo y negativo antes-después del tratamiento con el GABOB. a) Imagen representativa de NF-κB y Smad3, b) Factor nuclear κB (NF-κB), c) *signal mothers againts decapentaplegic homolog 3* (Smad 3). \* $p < 0.05$  Significancia estadística, obtenidas por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. (A= antes, D= después de GABOB = ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico, Hp+, Hp- = *Helicobacter pylori* positivo y negativo). *Inmunoblot* representativo de un experimento por duplicado.

## 7.6 Expresión de COX-1 y COX-2

La expresión de COX-1 y COX-2 en las biopsias de pacientes *H. pylori* positivo y negativo no presentó una diferencia entre la presencia o ausencia de la bacteria (Figura 2).

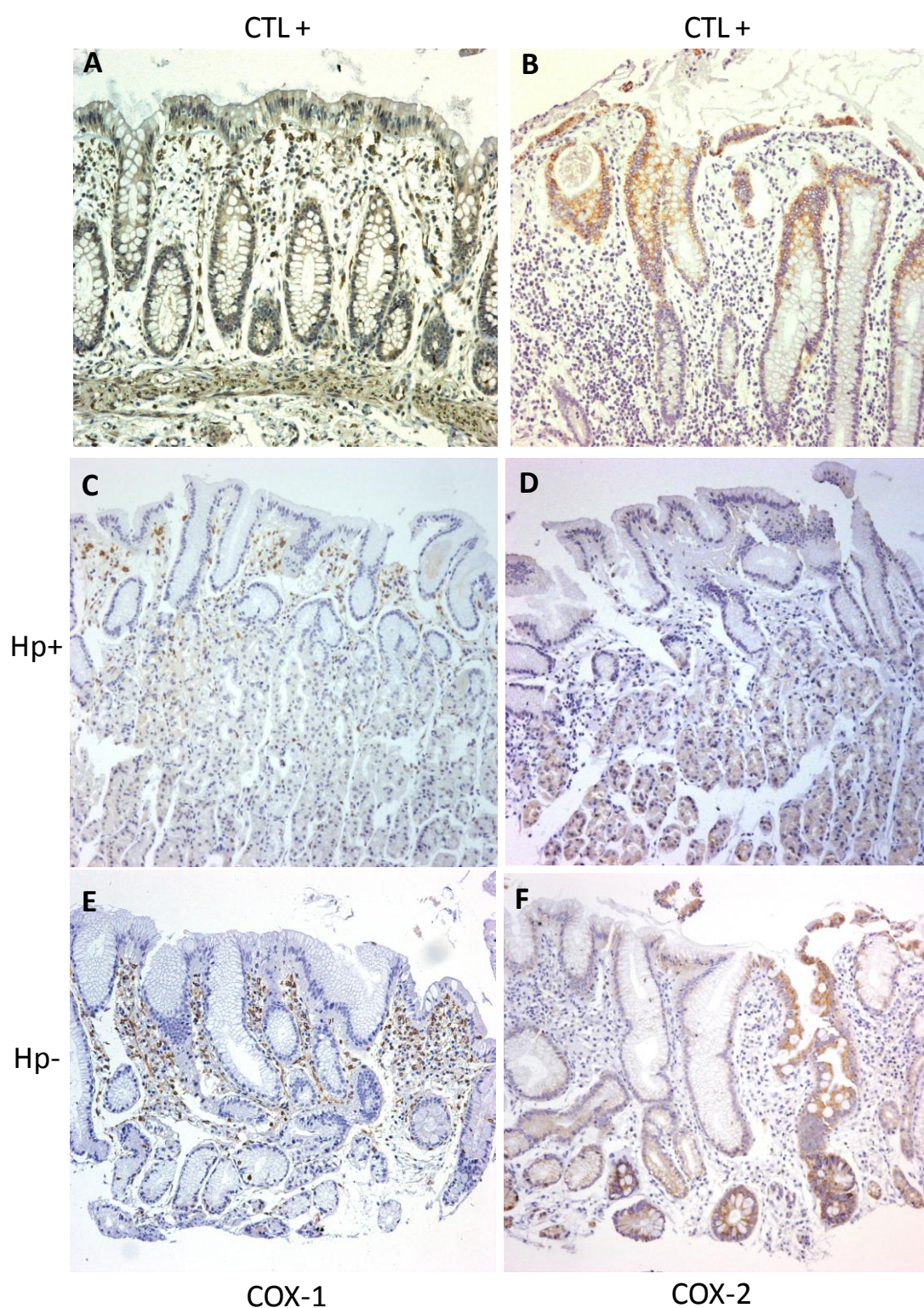
La expresión de COX-1 en pacientes *H. pylori* positivo y negativo presentó una intensidad de tinción débil, un área de tinción positiva menor al 10% y una tinción

---

profunda en las glándulas (Figura 2C y 2E). Solo se presentó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) en los pacientes *H. pylori* negativo. También se presentó una significancia estadística ( $p < 0.001$ ) y ( $p < 0.001$ ) entre la intensidad de la tinción y la de glándulas así como entre el área y la de glándulas, respectivamente. Se empleó carcinoma de colon como control positivo de COX-1 (Figura 2A).

La expresión de COX-2 en pacientes *H. pylori* positivo y negativo (Figura 2D y 2F), mostraron una intensidad de tinción moderada, un área de tinción de 10-40% y una tinción superficial y profunda en el cuello de las glándulas. Se empleó tejido de intestino (Cuci) como control positivo de COX-2 (Figura 2B).

En general, se observó que las células epiteliales no expresaron las proteínas COX-1 y COX-2 y la *muscularis propria* mostró un aumento en la expresión de estas proteínas.



**Figura 2.** Ciclooxygenasas tipo 1 y 2 en biopsias de antro de pacientes *Helicobacter pylori* positivo y negativo antes del tratamiento con el GABOB analizadas por inmunohistoquímica. A) carcinoma de colon (control positivo de ciclooxygenasa tipo 1 (COX-1), B) intestino (cuci) (control positivo de ciclooxygenasa tipo 2 (COX-2), C) COX-1 *Helicobacter pylori* positivo (Hp+), D) COX-2 de Hp+, E) COX-1 *Helicobacter pylori* negativo (Hp-), F) COX-2 Hp-. Las imágenes tienen un aumento de 150X.

## 8. Discusión

Existen resultados controversiales en la literatura acerca del papel que desempeña la bacteria *H. pylori* en la patogénesis del daño ocasionado por la ingesta de AINEs. Datos en la literatura apoyan la idea de que el uso a largo plazo de los AINEs produce daño en el tracto gastrointestinal y que los efectos ulcerogénicos de éstos está asociado con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y está es abolida por el fenómeno de “adaptación gástrica” por lo cual el efecto de los AINEs es notable (Chiba, 2005; Laine, 1991; Collier and Pain, 1985; Tominawa, *et. al.*, 2009). Se ha propuesto que hay baja prevalencia de *H. pylori* en usuarios de AINEs comparados con los que no son usuarios de estos fármacos (Mizokami, *et. al.*, 2000; Ng, *et. al.*, 2000). Se sabe también que la infección por *H. pylori* puede jugar un papel protector en usuarios de AINEs limitando la disminución local de prostaglandinas en el tejido inducidas por AINEs (Bazzoli, *et. al.*, 2001).

Por otro lado, en un estudio de corte transversal en usuarios crónicos de AINEs de la población general de pacientes de reumatología, se reportó que no hay diferencia en la prevalencia de úlceras en presencia o ausencia de infección por *H. pylori* (Bazzoli, *et al.*, 2001). Resultados similares han sido reportados en estudios endoscópicos de seguimiento de úlceras en usuarios crónicos de AINEs. Tanaka, *et al.*, 2005, observó una baja incidencia en la infección por *H. pylori* en pacientes con AR y uso crónico de AINEs y propuso que algunos AINEs tienen efecto antibacterial contra *H. pylori*. Sin embargo, concluyeron que la infección por *H. pylori* fue un factor de riesgo significativo para las úlceras gastrointestinales superiores en pacientes japoneses con AR. Kim y Graham 1994, reportaron resultados similares como en el presente estudio, los autores propusieron que *H. pylori* no confiere un aumento en el riesgo de

ulceración en pacientes artríticos que reciben AINEs crónicamente. Sin embargo, Goggin *et al.*, 1993, demostraron que la infección por *H. pylori* está asociada con un aumento en los síntomas dispépticos en pacientes con AR que tomaron AINEs, pero que la infección no predispone a gastropatías por AINEs. Vonkeman *et al.*, 2012, en un estudio clínico aleatorizado, doble ciego controlado con placebo, encontró que la erradicación de la infección por *H. pylori* no reduce la incidencia de úlceras gastroduodenales endoscópicas en pacientes seropositivos a *H. pylori* con ingesta de AINEs por enfermedades reumáticas. Estudios recientes han mostrado que los AINEs solo tienen efectos inhibitorios a nivel de la transducción de señales intracelulares proinflamatorias independientes de la ciclooxigenasa (Tegeder, *et al.*, 2001), esta podría ser una posible explicación del por qué en nuestro estudio no encontramos diferencia entre los pacientes que tenían más tiempo de ingesta con los que tenían poco tiempo de uso de AINEs. Estudios en modelos animales como el de ratas Wistar artríticas, exhibieron un aumento en la susceptibilidad al daño gástrico e intestinal comparadas con los controles sanos. Uno de los factores que puede contribuir a un aumento en las heridas es el incremento en la adherencia de leucocitos al epitelio vascular inducido por los AINEs en ratas artríticas (McCafferty, *et al.*, 1995). La adherencia de leucocitos al endotelio vascular es un evento temprano y crítico en la patogénesis inducida por AINEs y juega un papel importante en el desarrollo de heridas inducidas por AINEs en el intestino delgado (Wallace, *et al.*, 1990; Wallace, 1993; Miura, *et al.*, 1991).

También existen resultados conflictivos acerca del efecto del GABOB. Yano *et al.*, 1990, reportaron que el GABOB produce un aumento en la secreción de ácido gástrico probablemente por la vía central de activación colinérgica. Sin embargo, hay

algunos reportes que consideran que el GABA y agonistas del receptor del GABA están involucrados en la regulación del tono gástrico en ratón, a través de la modulación de las neuronas intrínsecas (Rotondo, *et al.*, 2010). Datos farmacológicos previos proponen que la estimulación del reflejo vago-vagal activa neuronas GABAérgicas en el cerebelo que inhibe el núcleo dorsal del vago (DMV) de neuronas que se proyectan en el antro pero no en el fondo (Ferreira *et al.*, 2002). Pearson *et al.*, 2011, propuso que el circuito del tronco cerebral controla la transmisión GABAérgica en el antro. El GABOB es un ligando endógeno que se encuentra en el sistema nervioso de mamíferos. Este es un producto metabólico del GABA y ejerce efectos similares. De esta manera, el GABOB no solo puede tener efectos en las células gástricas también puede tener efectos sobre las células del sistema inmune. En el presente estudio, encontramos que el tratamiento con el GABOB aumenta la secreción de IL-8 en biopsias de duodeno de pacientes *H. pylori* positivo así como un aumento en Smad3 en biopsias de duodeno de *H. pylori* negativo mientras que el TGF- $\beta$  disminuyó en el plasma de los mismos pacientes. Nuestros datos mostraron que hay valores altos de IL-8 presentes en antro de pacientes *H. pylori* positivo comparados con los *H. pylori* negativo. Este resultado puede ser correlacionado con los altos valores de infiltrado inflamatorio encontrado en antro de biopsias de *H. pylori* positivo cuantificadas mediante el sistema de Sydney. También los valores de IL-8 en duodeno fueron bajos comparados con los correspondientes para antro. Lindholm, *et al.*, 1998, demostraron la presencia de diferentes citocinas y factores de crecimiento como IL-8 y TGF- $\beta$  usando un modelo de biopsias de antro de pacientes con diferentes gastropatías encontrando la presencia de IL-8 principalmente en el cuello de las glándulas y TGF- $\beta$  en la lámina propia alrededor de la región del cuello de la glándula. En nuestro trabajo nosotros



también encontramos IL8 en el antro de los pacientes, el tratamiento con el GABOB no produjo cambios en esta citocina. Sin embargo, solo en pacientes *H. pylori* positivo aumentó significativamente menor de IL-8 en biopsias de duodeno lo cual puede tener implicación clínica por su efecto proinflamatorio quimio-atrayente de neutrófilos. Strömberg *et al.*, 2005, demostraron que los pacientes con úlcera gástrica duodenal tienen una respuesta significativamente baja de IL-8 en el duodeno, con respecto a los portadores sintomáticos y consideraron que la respuesta epitelial a citocinas disminuye en el duodeno de pacientes con úlcera duodenal, lo cual puede ser de importancia para la patogénesis de úlceras duodenales inducidas por *H. pylori*, esto puede ser explicado por factores del hospedero como por ejemplo, la disminución de la capacidad del epitelio duodenal para producir citocinas, posiblemente también por la regulación a la baja de las células T reguladoras. También se sabe que un aumento en la secreción de IL-10 puede favorecer la permanencia de *H. pylori* en la mucosa por lo cual no puede ser eliminada con facilidad.

Las concentraciones plasmáticas de TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y NO fueron similares en pacientes infectados y no infectados con *H. pylori*, también presentaron valores semejantes en biopsias tanto de antro como de duodeno. Ninguno de estos parámetros presentaron cambios después del tratamiento con el GABOB. Sin embargo, se sabe que la infección por *H. pylori* está asociada con un aumento en la expresión de TGF- $\beta$  tipo 1, con su receptor TGF- $\beta$ 1RI, con Smad 7 y con el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) en el antro de la mucosa gástrica (Li and Li, 2006). En un estudio realizado por Bontems *et al.*, 2003, reportaron que las concentraciones de IL-2, IL-4, IL-10 y TNF- $\alpha$  fueron similares en biopsias de

---

duodeno y mucosa de adultos infectados y no infectados con *H. pylori*, lo cual concuerda con nuestros resultados.

En un modelo de cultivo de biopsias de pacientes infectados con *H. pylori* y en controles, Monteleone *et. al.*, 2001, encontraron niveles similares de TGF- $\beta$  en pacientes infectados (43 pg/100  $\mu$ g de proteína total en un rango de 23-147) comparados con los controles (44 pg/100  $\mu$ g de proteína total en un rango de 15-82). Estos datos son similares a los de nuestro estudio ya que no encontramos diferencia entre pacientes *H. pylori* positivo comparados con los no infectados a nivel de mucosa antral. Sin embargo, en biopsias de duodeno encontramos concentraciones elevadas en *H. pylori* negativo 93.89 pg/mg de proteína (0-469.84), comparado con los *H. pylori* positivo con 10 pg/mg de proteína (0.07-669.72), aunque este aumento no mostró diferencia estadísticamente significativa probablemente por la gran dispersión de datos. Estudios recientes han mostrado que la actividad antiinflamatoria del TGF- $\beta$  a nivel de la mucosa está estrictamente relacionado a su capacidad para inducir la fosforilación (activación) de Smad 3 (Yang, *et. al.*, 1999; Monteleone, *et. al.*, 2001). El TGF- $\beta$  juega un papel importante en el control de la homeostasis inmune y la prevención de la inflamación de la mucosa (Letterio and Roberts, 1998; Wahl, 1994) La pérdida condicional de la actividad selectiva de TGF- $\beta$  en la mucosa gástrica de ratones, está asociada con una inflamación severa y exacerbada y una prominente proliferación después de la infección por *H. pylori* (Hahm, *et. al.*, 2002). Monteleone *et. al.*, 2004, demostraron que la colonización del estómago con *H. pylori* conduce a una reducción en la fosforilación de Smad3, un paso crucial en la transducción de señales mediada por TGF- $\beta$  a pesar de la síntesis activa de TGF- $\beta$ .

En lo que se refiere a la expresión del RNAm de IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , iNOS, CGRP, COX-1 y COX-2 no se observaron cambios en los pacientes con y sin *H. pylori*, lo cual indica que probablemente no hay regulación a nivel transcripcional. Well *et al.*, 2005, han descrito que el RNAm que codifica para citocinas y algunos factores de transcripción de respuesta temprana se inducen transitoriamente, seguidos de una rápida declinación. El RNAm de IL-8 no presentó aumento a pesar de que la secreción de IL-8 en antro de pacientes *H. pylori* positivo se encontró aumentada, lo que probablemente refleja que la secreción y la expresión son fenómenos dependientes del tiempo y al momento de su determinación no fue posible detectarlos en la misma muestra ya que posiblemente la inducción del RNAm fue en un tiempo previo a la secreción de la citocina. También a nivel de la expresión de los mediadores de inflamación estudiados, el tratamiento con el GABOB no produjo ningún cambio.

Por otro lado, se sabe que sujetos *H. pylori* negativo tratados con ibuprofeno durante tres días con lesiones gástricas y reacciones adversas tuvieron niveles bajos de prostaglandina E2 y en todos los sujetos se detectaron niveles de COX-1, COX-2, eNOS e iNOS. Las enzimas constitutivas (COX-1 y eNOS) no presentaron cambios después del tratamiento con el AINE. Los niveles de COX-2 fueron altos en antro y cuerpo y estos aumentaron después del tratamiento con el ibuprofeno. La iNOS tendió a aumentar medianamente en cuerpo en sujetos con reacciones adversas y lesiones endoscópicas (Gallego-Sandín *et al.*, 2004). También se ha demostrado que la actividad de la iNOS correlaciona positivamente con el aumento en la actividad de la caspasa 3 en la apoptosis inducida por AINEs (indometacina) en

---

mucosa gástrica de rata, proponiendo que la iNOS participa en la amplificación de la señal apoptótica (Szabó and Tarnawski, 2000).

Otros estudios han mostrado que la infección por *H. pylori* estuvo asociada con un aumento de la expresión de COX-2 en la mucosa antral gástrica para ambos usuarios y no usuarios de AINEs, pero no en sujetos con úlcera gástrica donde el efecto de inhibición por el AINE juega un papel importante. Los autores concluyeron que la erradicación de *H. pylori* no interfiere con la cicatrización de la úlcera gástrica en usuarios de AINEs (Wu, *et al.*, 2005). Controversialmente, en ratones infectados con *H. pylori*, el tratamiento con AINEs ha mostrado una disminución significativa del grado de inflamación gástrica (Kim, *et al.*, 2001). Por lo tanto, es posible que en pacientes *H. pylori* positivo, el tratamiento recurrente con AINEs puede afectar los niveles de inflamación gástrica y consecuentemente puede afectar la respuesta serológica.

Existen reportes en la literatura que indican que la infección por *H. pylori* puede activar al NF- $\kappa$ B en las células del epitelio gástrico y subsecuentemente regular corriente arriba la transcripción de IL-8 (Yang, *et al.*, 2012). van der Brink *et al.*, 2000, demostró la presencia y la actividad de NF- $\kappa$ B principalmente en células endócrinas G de biopsias de antro de pacientes infectados por *H. pylori* y tejido no inflamado. Sin embargo, nuestros datos indican que a pesar de que observamos en biopsias de antro un aumento de la citocina pro-inflamatoria IL-8 en pacientes infectados con *H. pylori* y también se observó un aumento en el infiltrado inflamatorio mediante microscopia, nosotros no encontramos un aumento en la activación de NF- $\kappa$ B, probablemente porque en nuestro modelo no determinamos si los pacientes

tenían o no la isla de patogenicidad *cagPAI*. Estudios *in vitro* han mostrado que solo las cepas de *H. pylori* con la isla *cag PAI* funcional inducen la activación de NF- $\kappa$ B, a través de la translocación y fosforilación de CagA que es requerida para la aparición del fenómeno “hummingbird”, esos eventos son prescindibles para la activación de NF- $\kappa$ B inducida por *H. pylori* en las células epiteliales, proponiendo que la presencia de factores desconocidos translocados por *H. pylori* en las células epiteliales vía el sistema de secreción tipo IV activan a NF- $\kappa$ B (Maeda, *et al.*, 2001; Fisher, *et al.*, 2001). Los resultados sugieren que las células mononucleares en la lámina propia fueron la mayor fuente de esta citocina pro-inflamatoria. Como se ha visto en diferentes estudios, existe una gran discrepancia en los resultados obtenidos. Datos recientes indican que la inflamación inducida por *H. pylori* regula corriente arriba la expresión de la proteína atonal homóloga tipo 1 (Hath1) por la fosforilación de la vía STAT3/interleucina 8, mientras que suprime el factor de transcripción de células ES (Hes1), lo cual provee una nueva conexión molecular entre la infección por *H. pylori* y la metaplasia intestinal (Zhang, *et al.*, 2012). Cowburn *et al.*, 2004, en un modelo de neutrófilos reportaron que la síntesis de IL-8 puede ser por dos vías, una dependiente de NF- $\kappa$ B y otra por PI3k-AKT. En nuestro estudio se podría sugerir que la síntesis de IL-8 fue por vía NF- $\kappa$ B debido a que determinamos la expresión de este factor a pesar de que no encontramos diferencias estadísticamente significativas. No se encontraron resultados en la literatura con respecto al efecto del GABOB en biopsias de antro y duodeno, nuestros datos sugieren que el GABOB no contribuye a modular la respuesta inflamatoria.

También se determinaron a nivel plasmático las concentraciones de IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y NO. Las concentraciones de IL-8, IL-10 y TNF- $\alpha$  no se

detectaron, esto puede deberse al efecto antiinflamatorio de los AINEs ya que reportes previos indican concentraciones elevadas de estas citocinas en pacientes con *H. pylori*. El TGF- $\alpha$  y NO no presentaron cambios después del tratamiento con el GABOB. Solo TGF- $\beta$  disminuyó en pacientes *H. pylori* negativo como resultado de la administración del GABOB (Figura 4). No obstante, existen pocos datos disponibles en niveles circulantes de citocinas durante la infección por *H. pylori*. Russo *et al.*, 2001, reportaron en personas asintomáticas con infección por *H. pylori* un aumento significativo en los niveles de TNF- $\alpha$  comparados con sujetos no infectados. En contraste, las concentraciones de IL-8 fueron significativamente elevadas en sujetos no infectados que en pacientes *H. pylori* positivo. Los autores también encontraron que los niveles circulantes de IFN- $\gamma$  e IL-10 no fueron afectados por la presencia de *H. pylori*, y no hubo diferencia significativa entre los dos grupos. Bayrataroglu *et al.*, 2004, reportaron en su investigación que no encontraron algún aumento en las citocinas a nivel circulatorio en pacientes *H. pylori* positivo, a pesar de que encontraron que la producción de citocinas en la mucosa correlaciona con la intensidad de la inflamación de la mucosa gástrica, los niveles de citocinas en suero no mostraron correlación con los parámetros de Sydney, incluyendo los grados de inflamación en el epitelio, activación e intensidad. En la literatura, algunos autores reportaron un aumento en los niveles circulantes de TNF- $\alpha$  mientras que los niveles de IL-8 en suero permanecieron normales en sujetos con *H. pylori* positivo. Algunos

otros reportaron niveles elevados de TNF- $\alpha$  en suero de pacientes infectados con *H. pylori* con la isla de patogenicidad Cag A positiva. Las concentraciones de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 fueron elevados en casos de *H. pylori* con Cag A positiva. Nosotros no determinamos el estatus de Cag A en nuestros pacientes. De este modo, nosotros no conocimos si todos o la mayoría de los pacientes fueron infectados con cepas Cag A positivas. Sin embargo, a pesar de ello, nosotros determinamos por medio del estudio endoscópico que los pacientes presentaron síntomas de enfermedad gastrointestinal. Como resultado de los reportes contradictorios, incluido el nuestro, no encontramos si el excedente continuo de citocinas en el torrente sanguíneo pudiera ser una consecuencia de la activación de citocinas en la mucosa gástrica y el aumento en su síntesis. Consideramos que son necesarios estudios adicionales con un mayor número de pacientes ya que resulta difícil observar cambios inducidos por *H. pylori* en los niveles circulantes de citocinas. Probablemente, solo bajo condiciones específicas de eventos agudos las citocinas pro-inflamatorias podrían ser aumentadas en la mucosa gástrica y podría estar reflejado a nivel plasmático.

Nuestros datos mostraron que las COX-1 y COX-2 fueron detectadas por inmunohistoquímica usando un complejo conjugado de biotina-avidina. Sin embargo, no encontramos diferencias en biopsias de antro de pacientes *H. pylori* positivo comparados con los *H. pylori* negativo al inicio del estudio. Wu *et al.*, 2006,

reportaron un aumento de IL-8 y COX-2 en la mucosa antral de sujetos *H. pylori* positivo, pero no encontraron influencia de COX-2 y citocinas a nivel local en la úlcera gástrica. Los AINEs inhibieron al COX-2 en la úlcera gástrica y retrasaron la cicatrización de la úlcera gástrica. Li *et al.*, 2006, proponen que COX-1 y COX-2 contribuyen independientemente a regular corriente abajo la inflamación de la mucosa gástrica inducida por la infección por *H. pylori*. En un modelo de ratón deficiente de COX-1 y COX-2 se aumenta la gastritis inducida por *H. pylori* probablemente vía expresión de TNF- $\alpha$ . Además la deficiencia de COX-2, pero no la de COX-1, suprime la proliferación inducida por *H. pylori*. Mizuno *et al.*, 1997, han propuesto que un aumento en la expresión de COX-2 puede ser necesaria para la cicatrización normal de las úlceras gastroduodenales.

Nuestros hallazgos demuestran que el tratamiento con el GABOB no modifican los mediadores inflamatorios en la mucosa gástrica ni a nivel plasmático, sin embargo, la respuesta inflamatoria esta modificada por el aumento de IL-8 durante la infección por *H. pylori* y la disminución del RNAm de la IL-10, lo cual puede favorecer la permanencia de la bacteria. Los pacientes de reumatología usuarios crónicos de AINEs no mostraron diferencia en los desordenes gástricos entre aquellos con presencia/ausencia de infección por *H. pylori*. Sin embargo, ambos pacientes *H. pylori* positivo y negativo presentaron una mejoría en la tolerabilidad a la dispepsia como resultado del tratamiento con el GABOB (Fig. 3).



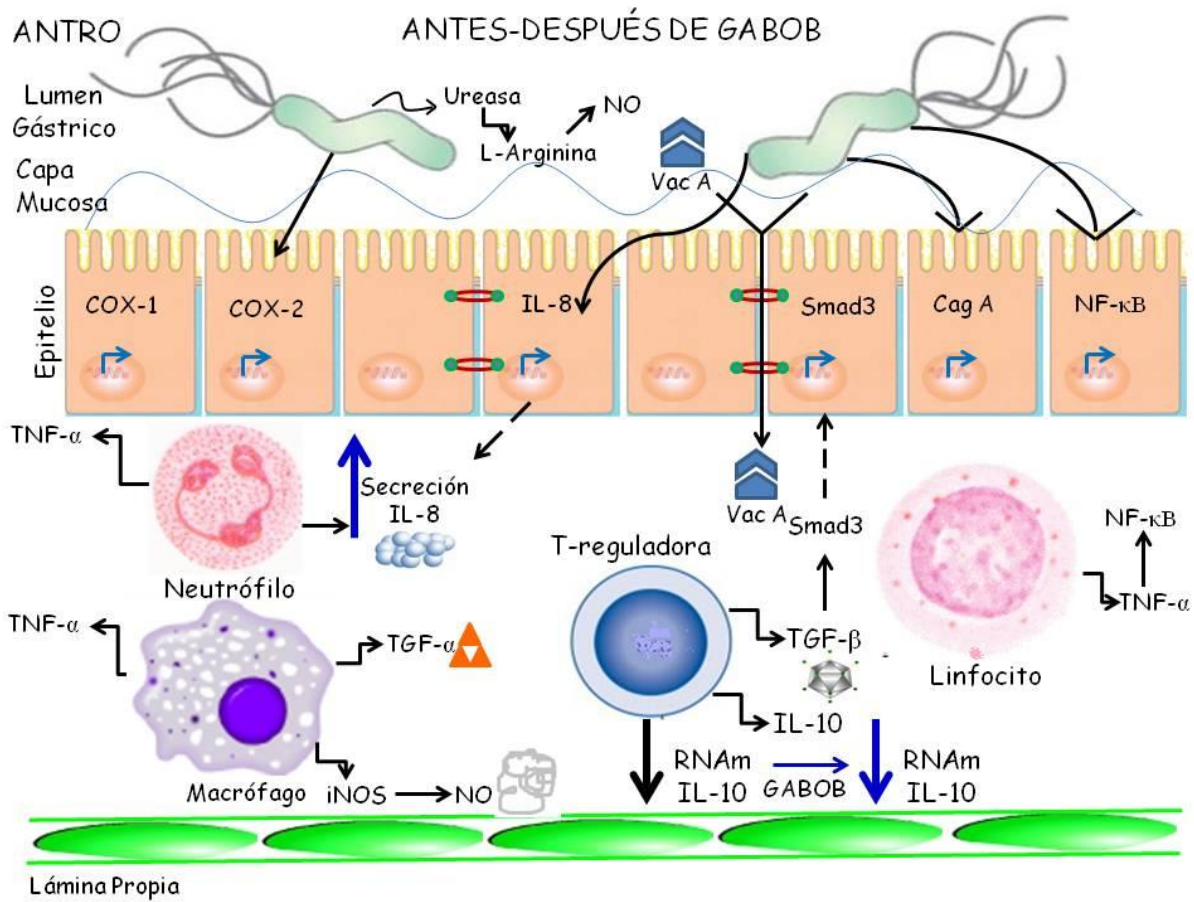


Figura 3. Secreción de mediadores de inflamación en antro de pacientes con Artritis reumatoide antes y después de la administración del GABOB.

## 9. Conclusión

### 9.1. Conclusiones Parciales

Los hallazgos de este estudio proponen que cuatro semanas de tratamiento con GABOB no modifican los mediadores inflamatorios en biopsias de antro y duodeno ni en plasma de la población estudiada.

Los pacientes *H. pylori* positivo presentaron una mejoría del 60% y los *H. pylori* negativo un 69% en la tolerabilidad de los síntomas dispépticos como resultado del tratamiento con el GABOB.

### 9.2. Conclusión general

Debido a que existe controversia acerca del papel que desempeña *H. pylori* y el uso crónico de los AINEs en el riesgo de padecer daño gástrico, los hallazgos de este trabajo sugieren que el uso crónico y el tipo de AINEs puede ser un factor independiente del riesgo de daño a la mucosa gástrica y duodenal así como la presencia de la bacteria *H. pylori* puesto que no modifica la respuesta inflamatoria en la población estudiada, a pesar de la mejoría en los síntomas dispépticos después del tratamiento con el GABOB.

## 10. Bibliografía

- Abbas WR, Goel RK, Maiti RN, Bhattacharya SK. 1996. Effect of continuous infusion of GABA and baclofen on gastric secretion in anaesthetized rat. *Indian J Exp Biol.* 34:978-981.
- Aho K, Koskenvuo M, Touminen J. 1986. One of rheumatoid arthritis on a nationwide series of twins. *J Rheumatol.* 13:899-902.
- Alarcón G. 1995. Epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 21:589-604.
- Ando T, Goto Y, Maeda O, Watanabe O, Ishiguro K, Goto H. 2006. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2:181-186.
- Akopyants, NS, Clifton SW, Lersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, Bukanov NO, Drazek ES, Roe BA, Berg DE. 1998. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 28:37-53.
- Bayraktaroğlu T, Aras AS, Aydemir S, Davutoğlu C, Ustündağ Y, Atmaca H, Borazan A. 2004. Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6 and interleukin-8 are not increased in dyspeptic patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Mediators Inflamm.* 13:25-28.
- Bazzoli F, De Luca L, Graham DY. 2001. *Helicobacter pylori* infection and the use of NSAIDs. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 15:775-785.

- Bhargava KP, Gupta GP, Gupta MB. 1985. Central GABA-ergic mechanism in stress-induced gastric ulceration. *Br J Pharmacol.* 84:619-623.
- Bhat R, Axtell R, Mitra A, Miranda M, Lock C, Tsien RW, Steiman L. 2010. Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:2580-2585.
- Bontems P, Robert F, Van Gossum A, Cadranel S, Mascart F. 2003. *Helicobacter pylori* modulation of gastric and duodenal mucosal T cell cytokine secretions in children compared with adults. *Helicobacter.* 8:216-226.
- Brzozowski T, Konturek PC, Sliwowski S, Kwieciën S, Drozdowicz D, Pawlik M, Mach K, Konturek SJ, Pawlik WW. 2006. Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) with *Helicobacter pylori* in the stomach of humans and experimental animals. *J Physiol Pharmacol.* 57(suppl. 3):67-79.
- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Coyacci A. 1996. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:14648–14653.
- Chen W, Shu D, Chadwick VS. 2001. *Helicobacter pylori* infection: mechanism of colonization and functional dyspepsia Reduced colonization of gastric mucosa by *Helicobacter pylori* in mice deficient in interleukin-10. *J Gastroenterol Hepatol.* 16:377-383.
- Chiba T, K Sato, N Kudara, H Shinozaki, K Ikeda, K Sato, M Endo, S Orii and K Suzuki. 2008. Upper gastrointestinal disorders induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Inflammopharmacol.* 16:16–20.

- Collier, D. S. T. J., Pain, J. A. 1985. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and peptic ulcer perforation. *Gut*. 26: 359–363.
- Correa P. 1996. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: state of the art. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 5:477-481.
- Covacci A, Rappuoli R. 2000. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J. Exp. Med*. 191:587–592.
- Cover TL, Dooley CP, BlaserMJ. 1990. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect. Immun*. 58:603–610.
- Cowburn Andrew S, John Deighton, Sarah R. Walmsley and Edwin R. Chilvers. 2004. The survival effect of TNF- $\alpha$  in human neutrophils is mediated via NF-kB-dependent IL-8 release. *Eur. J. Immunol*. 34: 1733–1743.
- Crabtree JE, Taylor EJ, Wyatt JL, Heatley RV, Shallcross TM, Tompkins DS, Rathbone BJ. 1991. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet* 338:332–335.
- Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. 1996. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol*. 20:1161-81.
- El-Omar EM. 2001. The importance of interleukin 1 beta in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut*. 48:743-747.

- Emery P, Breedveld FC, Dougado M. 2002. Early referral recommendation for newly diagnosed rheumatoid arthritis: evidence based development or a clinical guide. *Ann Rheum Dis.* 61:29-297.
- Enero MA, Solignac D, Apud JA. 1988. Studies on the GABAergic system in cardiovascular control in normotensive and in sinoaortic denervated rats. *Clin Exp Hypertens A.* 10(suppl. 1):331-337.
- Érdo Sándor L, Elmer Ezer, Judit Matuz, Joachim R Wolff and Francesco Amenta. 1989. GABA A receptors in the rat stomach may mediate mucoprotective effects. *European J Pharmacol.* 165:79-86.
- Farah D, Sturrock RD, Russell RI. 1988. Peptic ulcer in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 47:478-480.
- Ferreira Jr M, Sahibzada N, Shi M, Panico W, Neidringhaus M, Wasserman A, Kellar KJ, Verbalis J, Gillis RA. 2002. CNS site of action and brainstem circuitry responsible for the intravenous effects of nicotine on gastric tone. *J. Neurosci.* 22:2764-2779.
- Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. 2001. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. Essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin 8. *Mol. Microbiol.* 42: 1337–1348.
- Fuentes-Pananá Ezequiel, Margarita Camorlinga-Ponce, Carmen Maldonado-Bernal. 2009. Infección, inflamación y cáncer gástrico. *Salud pública de México.* 51:427-433.

- Gallego-Sandín S, Novalbos J, Rosado A, Gisbert JP, Gálvez-Música MA, García AG, Pajares JM, Abad-Santos F. 2004. Effect of ibuprofen on cyclooxygenase and nitric oxide synthase of gastric mucosa: correlation with endoscopic lesions and adverse reactions. *Dig Dis Sci.* 49:1538-1544.
- Gijs R. van den Brink, Fiebo J. ten Kate, Cyriel Y. Ponsioen, Maaïke M. Rive, Guido N. Tytgat, Sander J. H. van Deventer and Maikel P. Peppelenbosch. 2012. Expression and Activation of NF- $\kappa$ B in the Antrum of the Human Stomach.
- Goodwin CS., Armstrong JA., Marshall BJ. 1986. *Campylobacter pyloridis*, gastritis and peptic ulceration. *J Clin Pathol.* 39:353-365.
- Goggin PM, Collins DA, Jazrawi RP, Jackson PA, Corbishley CM, Bourke BE, Northfield TC. 1993. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and its effect on symptoms and non-steroidal anti-inflammatory drug induced gastrointestinal damage in patients with rheumatoid arthritis. *Gut.* 34:1677-1680.
- Gómez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. 2008. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 283:14581-14589.
- Hahm K-B, Lee KM, Kim YB, Hong WS, Lee WH, Han SU, Kim MW, Ahn BO, Oh TY, Lee MH, Green J, Kim SJ. 2002. Conditional loss of TGF- $\beta$  signalling

---

leads to increased susceptibility to gastrointestinal carcinogenesis in mice. *Aliment Pharmacol Ther.* 16(suppl 2):115–127.

- Hara Nobuyuki, Youichi Hara, Yasuhiro Natsume and Yoshiaki Goto.1990. Direct Evidence Indicating That a GABA-Mimetic Stimulates Acid Secretion through Central Mechanisms. *Japan J Pharmacol.* 53:271-274.
- Harty RF, Ancha HR, Xia Y, Anderson M, Jazzar A. 2004. GABAergic mechanisms of gastroprotection in the rat: role of sensory neurons, prostaglandins and nitric oxide. *Dig Dis Sci.* 49:1875-1881.
- Harris PR., Smythies LE., Smith PD., Dubois A. 2000. Inflammatory cytokine mRNA expression during early and persistent *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates. *J Infect Dis.* 181:783-786.
- Hernandez F., Moge-Najera J. 1994. Ultrastructure of the bacteria *Campylobacter* and *Helicobacter*: implication for the phylogeny of mammal gastric bacteria. *Rev Biol Trop.* 42: S85-S92.
- Kelley JM, Hughes LB, Bridges SL Jr. 2008. Does gamma-aminobutyric acid (GABA) influence the development of chronic inflammation in rheumatoid arthritis? *J. Neuroinflammation.* doi: 10.1186/1742-2094-5-1.
- Kim JG, Graham DY. 1994. *Helicobacter pylori* infection and development of gastric or duodenal ulcer in arthritic patients receiving chronic NSAID therapy. The Misoprostol Study Group. *Am J Gastroenterol.* 89:203-207.



- Kim JS, Kim JM, Jung HC, Song IS. 2001. Expression of cyclooxygenase-2 in human neutrophils activated by *Helicobacter pylori* water-soluble proteins: possible involvement of NF-kappaB and MAP kinase signaling pathway. *Dig Dis Sci.* 46:2277-2284.
- Keates S., Keates AC., Warny M., Peek RM Jr., Murray PG., Kelly CP. 1999. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by *cag*<sup>+</sup> and *cag*<sup>-</sup> *Helicobacter pylori*. *J Immunol.* 163:5552-5559.
- Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 19:449-490.
- Laine, L. 1991. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastrointestinal Endosc Clin North Am.* 6:489–504.
- Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF- $\beta$ . 1998. *Annu Rev Immunol.* 16:137–161.
- Li Guo Qing, Harry Hua-Xiang Xia, Min Hu Chen, Qing Gu, Ji De Wang, Jun Zhong Peng, Annie O. O. Chan, Chi Hin Cho, Hau Leung So, Shiu Kum Lam, Pin Jin Hu, Ying Jie Liang, Han Liang Lin, Douglas E. Berg, Zhe Hui Feng, Robert Langenbach, and Benjamin Chun-Yu Wong. 2006. Effects of Cyclooxygenase-1 and -2 Gene Disruption on *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Inflammation. *Journal of Infect Diseases.* 193:1037–1046.
- Lichtenberger LM, Wang ZM, Romero JJ: 1995. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids: Insight

---

into the mechanism and reversal of NSAID-induced gastrointestinal injury. *Nat Med* 1:154-158.

- Lindholm C, M. Quiding-Järbrink, H. Lönroth, A. Hamlet and A.-M. Svennerholm. 1998. Local Cytokine Response in *Helicobacter pylori*-Infected Subjects. *Infect. Immun.* 66(12):5964-5971.
- Li Z, Li J. 2006. Local expressions of TGF-beta1, TGF-beta1RI, CTGF, and Smad-7 in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Scand J Gastroenterol.* 41:1007-1012.
- Liu LS, Shenoy M, Pasricha PJ. 2011. The analgesic effects of the GABAB receptor agonist, baclofen, in a rodent model of functional dyspepsia. *Neurogastroenterol Motil.* 23:356-361, e160-161.
- Maeda S, Akanuma M, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M. 2001. Distinct mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NFkB activation between gastric cancer cells and monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 276: 44856–44864.
- Marcoli M, Scarrone S, Maura G, Bonanno G, Raiteri M. 2000. A subtype of the gamma-aminobutyric acid(B) receptor regulates cholinergic twitch response in the guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther.* 293:42-47.
- Marshall BJ. 1995. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer: have Koch's postulates been fulfilled? *Ann Med.* 27:565-568.
- Martin P. 1997. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 276:75-81.

- Mendu SK, Akesson L, Jin Z, Edlund A, Cilio C, Lernmark A, Bimir B. 2011. Increased GABA (A) channel subunits expression in CD8(+) but not in CD4(+) T cells in BB rats developing diabetes compared to their congenic littermates. *Mol Immunol.* 48:399-407.
- Minano Fj, Serrano JS, Pascual J, Sancibrian M. 1987. Effects of GABA on gastric acid secretion and ulcer formation in rats. *Life Sci.* 41:1651-1658.
- Miura S, Suematsu M, Tanaka S, Nagata H, Houzawa S, Suzuki M, Kurose I, Serizawa H, Tsuchiya M. 1991. Microcirculatory disturbance in indomethacin-induced intestinal ulcer. *Am J Physiol.* 261:G213–G219.
- Mizokami Y, Narushima K, Shiraishi T, Otsubo T, Narasaka T. 2000. Non-Helicobacter pylori ulcer disease in rheumatoid arthritis patients receiving long-term NSAID therapy. *J Gastroenterol.* 35(Suppl. XII):S38–S41.
- Mizuno H, Sakamoto C, Matsuda K, Wada K, Uchida T, Noguchi H, Akamatsu T, Kasuga M. 1997. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterol.* 112: 387-497.
- Moctezuma Rios JF. 2002. Manifestaciones articulares de artritis reumatoide. *Rev Mex Reumatol.* 17:211-219.
- Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. 2001. Blocking Smad7 restores TGF- $\beta$ 1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 108:601–609.

- Monteleone Giovanni, Giovanna del Vecchio Blanco, Giampiero Palmiere, Piero Vavassori, Ivan Monteleone, Alfredo Colantoni, Serena Battista, Luigi Giusto Spagnoli, Marco Romano, Melissa Borrelli, Thomas T MacDonald and Francesco Pallone. 2004. Induction and Regulation of Smad7 in the Gastric Mucosa of Patients with *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterol.*126:674–682.
- Nagai K, Sano A, Yamaguchi K, Kodaira Y. 1971. Studies on the synergistic action and anti-ulcerous activity of cortisone-GABOB. *Drug Res.* 21:96-97.
- Naumann M., Wessler S., Bartsch C. 1999. Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the cag pathogenicity island. *J Biol Chem.* 274: 31655-31662.
- Negrini R., Savio A., Appelmek BJ. 1997. Autoantibodies to gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2:S13-S16.
- Ng TM, Fock KM, Khor JL, Teo EK, Sim CS, Tan AL, Machin D. 2000. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Helicobacter pylori* and bleeding gastric ulcer. *Aliment Pharmacol Ther.*14:203–209.
- Parsonnet J. 1995. Bacterial infection as a cause of cáncer. *Environ Health Perspect.* 103 Suppl 8:263-268.
- Pearson RJ, Gatti PJ, Sahibzada N, Massari VJ, Gillis RA. 2011. Ultrastructural evidence for selective GABAergic innervation of CNS vagal projections to the antrum of the rat. *Auton Neurosci.* 160:21-26.

- Peek RM Jr, Fiske C, Wilson KT. 2010. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. *Physiol. Rev.* 90:831-858.
- Perez-Perez GI.- Dworkin BM., Chodos JE., Blaser MJ. 1998. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Ann Intern Med.* 109:11-17.
- Perez-Perez G., Rothenbacher D., Brenner, H. 2004. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 9: 1-6.
- Peskar BM. 2001. Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense. *J Physiol Pharmacol.* 52:555-568.
- Prevete N<sup>1</sup>, Rossi FW, Rivellesse F, Lamacchia D, Pelosi C, Lobasso A, Necchi V, Solcia E, Fiocca R, Ceppa P, Staibano S, Mascolo M, D Argenio G, Romano M, Ricci V, Marone G, De Paulis A. 2013. *Helicobacter pylori* HP(2-20) induces eosinophil activation and accumulation in superficial gastric mucosa and stimulates VEGF-alpha and TGF-beta release by interacting with formyl-peptide receptors. *Int J Immunophatol Pharmacol.* 26:647-662.
- Rabeneck L, Cook KF, Wristers K, Soucek J, Menke T, Wray NP. 2001. SODA (severity of dyspepsia assessment): A new effective outcome measure for dyspepsia-related health. *J Clin Epidemiol.* 54:755-765.
- Rabeneck L, Goldstein JL, Vu A, Mayne TJ, Rublee DA. 2005. Valdecoxib is associated with improved dyspepsia-related health compared with nonspecific NSAIDs in patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis. *Am J Gastroenterol.* 100:1043-1050.

- Rotondo A, Serio R, Mulè F. 2010. Functional evidence for different roles of GABAA and GABAB receptors in modulating mouse gastric tone. *Neuropharmacology*. 58:1033-1037.
- Rudi J., Kuck D., Strand S., 1998. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis. *J Clin Invest*. 102:1506-1514.
- Russo F, Jirillo E, Clemente C, Messa C, Chiloiro M, Riezzo G, Amati L, Caradonna L, Di Leo A. 2001. Circulating cytokines and gastrin levels in asymptomatic subjects infected by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 23:13-24.
- Szabó I and Tarnawski A S. 2000. Apoptosis in the gastric mucosa: molecular mechanisms, basic and clinical implications. *J Physiol Pharmacol*. 51:3-15.
- Scheiman JM. 1996. NSAIDs, gastrointestinal injury, and cytoprotection. *Gastroenterol Clin North Am*. 25:279-298.
- Smythies LE., Waites KB., Lindsley JR Harris PR., Ghiara P., Smith PD. 2000. *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. *J Immunol*. 165:1022-1029.
- Sobala GM, O'Connor HJ, Dewar EP, King RF, Axon AT, Dixon MF. 1993. Bile reflux and intestinal metaplasia in gastric mucosa. *J Clin Pathol*. 46:235-240.
- Strömberg E, Edebo A, Lundin BS, Bergin P, Brisslert M, Svennerholm AM, Lindholm C. 2005. Down-regulation of epithelial IL-8 responses in

---

*Helicobacter pylori*-infected duodenal ulcer patients depends on host factors, rather than bacterial factors. Clin Exp Immunol. 140:117-1125.

- Taha AS, Russell RI. 1993. *Helicobacter pylori* and non-steroidal anti-inflammatory drugs: uncomfortable partners in peptic ulcer disease. Gut. 34:580-583.
- Takami T, Kaposi-Novak P, Uchida K, Gomez-Quiroz LE, Conner EA, Factor VM, Thorgeirsson SS. 2007. Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. Cancer Res. 67:9844-9851.
- Tanaka E, Singh G, Saito A, Syouji A, Yamada T, Urano W, Nakajima A, Taniguchi A, Tomatsu T, Hara M, Saito T, Kamatani N, Yamanaka H. 2005. H. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and risk of upper gastrointestinal ulcer in patients with rheumatoid arthritis in Japan. Mod Rheumatol. 15:340-345.
- Tanigawa T, Pai R, Arakawa T, Higuchi K Tarnawski AS. 2005. TGF- $\beta$  signaling pathway: its role in gastrointestinal pathophysiology and modulation of ulcer healing. J Physiol Pharmacol. 56:3-13.
- Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. 2001. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. FASEB J. 15:2057–2072.
- Tetsuya Tanigawa, Toshio Watanabe, Kazuhide Higuchi, Kazunari Tominaga, Yasuhiro Fujiwara, Nobuhide Oshitani, Andrezej S Tarnawski, and Tetsuo Arakawa. 2009. Long-term use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs normalizes the kinetics of gastric epithelial cells in patients with *Helicobacter*

- 
- pylori* infection via attenuation of gastric mucosal inflammation. *J Gastroenterol.* 44[Suppl XIX]:8–17.
- Tian J, Yong J, Dang H, Kaufman DL. 2011. Oral GABA treatment downregulates inflammatory responses in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity.* 44:465-470.
  - Torres-Jasso Juan Heriberto y Josefina Yoali Sanchez-Lopez. 2011. Cáncer gástrico: alteraciones genéticas y moleculares. *Gaceta Médica de México.*147:72-73.
  - Trejo-de la O A, Torres J, Pérez-Rodríguez M, Camorlinga-Ponce M, Luna LF, Abdo-Francis JM, Lazcano E, Maldonado-Bernal C. 2008. TLR4 single-nucleotide polymorphisms alter mucosal cytokine and chemokine patterns in Mexican patients with *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases. *Clin Immunol.* 129:333-340.
  - Tsai LH, Taniyama K, Tanaka C. 1987. gamma-Aminobutyric acid stimulates acid secretion from the isolated guinea pig stomach. *Am J Physiol.* 253:G601-606.
  - Uemura N., Okamoto S., Yamamoto S., Matsumura N., Yamaguchi s., Ymakido., Taniyama K., Sasaki N., Schiemper RJ. 2001. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med.* 345:784-789.
  - van Amsterdam Karin, Arnoud H. M. van Vliet, Johannes G. Kusters & Arie van der Ende. 2006. Of microbeandman:determinantsof*Helicobacter pylori*-related Diseases. *FEMS Microbiol Rev* 30:131–156.

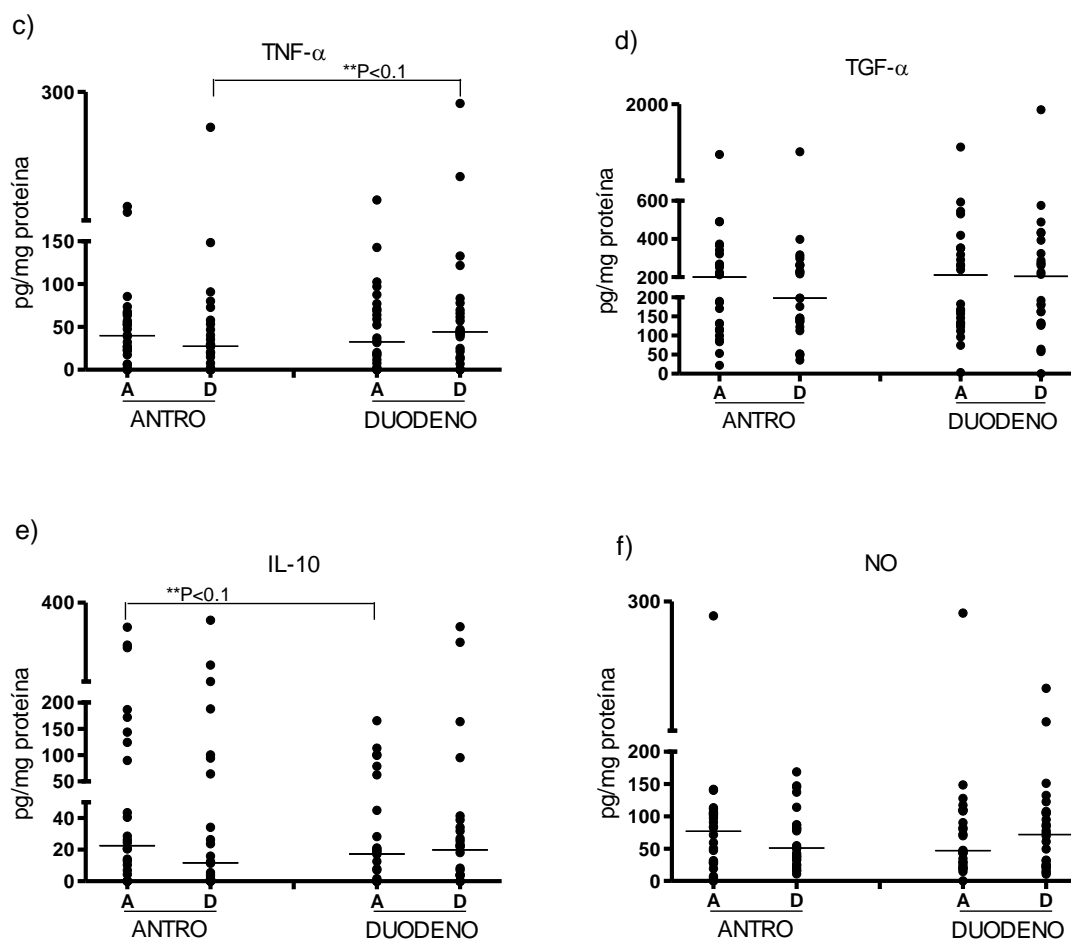


- 
- Vongthavaravat Verapan, Sikandar Mesiya, Layth Saymeh, Yang Xia and Richard F Harty . 2003. Mechanisms of Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Induced Gastroprotection Against Ethanol in the Rat. *Digest Dis and Sci.* 48:329–333.
  - Vonkeman HE, Deleest H, van Delaar M, Vanbaarlen J, Steen K, Lems W, Bijlsma J, Kuipers E, Houben H, Janssen M, Dijkmans B. 2012. Assessment of *Helicobacter pylori* eradication in patients on NSAID treatment. *BMC Gastroenterol.* Doi: 10.1186/1471-230X-12-133.
  - Wallace JL, Keenan CM, Granger DN. 1990. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *Am J Physiol* 259:G462–G467.
  - Wallace JL. 1993. Gastric ulceration: critical events at the neutrophil-endothelium interface. *Can J Physiol Pharmacol* 71:98–102.
  - Wahl SM. Transforming growth factor  $\beta$ : the good, the bad, and the ugly. 1994. *J Exp Med.* 180:1587–1590.
  - Walsh JH, Peterson WL. 1995. The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. *N Engl J Med.* 333:984-991.
  - Wang J., Brooks EH, Bamford KB., Denning TL., Pappo J., Ernst PB. 2001. Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion. *J Immunol.* 167:926-934.

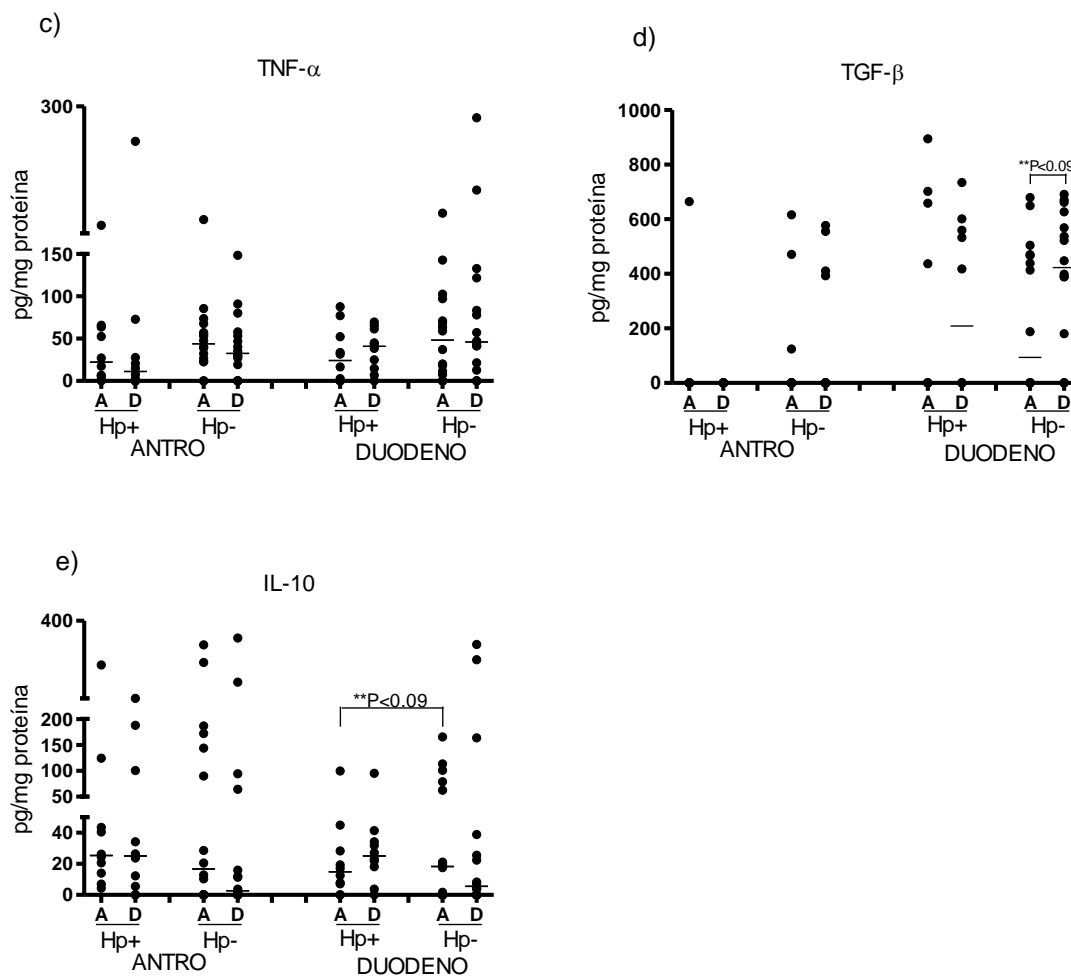
- Weigert N, Schepp W, Haller A, Schusdziarra V. 1998. Regulation of gastrin, somatostatin and bombesin release from the isolated rat stomach by exogenous and endogenous gamma-aminobutyric acid. *Digestion*. 59:16-25.
- Wells CA, Ravasi T, Hume DA. 2005. Inflammation suppressor genes: please switch out all the lights. *J Leukoc Biol*. 78:9-13.
- Wheeler DW, Thompson AJ, Corletto F, Reckless J, Loke JC, Lapaque N, Grant AJ, Mastroeni P, Grainger DJ, Padgett CL, O'Brien JA, Miller NG, Trowsdale J, Lummis SC, Menon DK, Beech JS. 2011. Anaesthetic impairment of immune function is mediated via GABA(A) receptors. *PLoS One*. 6:e17152.
- Wroblewski LE, Peek RM Jr., Wilson KT. 2010. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Revs*. 23:713–739.
- Wu CY, Wu MS, Chen CJ, Li MC, Lin JT, Chen GH. 2005. The interaction of *H. pylori* infection and NSAIDs in cyclooxygenase-2 mRNA expression in gastric antral, corpus mucosa, and gastric ulcer. *J Clin Gastroenterol*. 39:50-55.
- Wu CY, Wu MS, Chen YJ, Chen CJ, Lin JT, Chen GH. 2006. Influence of COX-2 and local cytokine expressions in gastric ulcer mucosa by *H. pylori* and NSAID. *Hepatogastroenterology*. 53:797-803.
- Xiong B, Sun TJ, Hu WD, Cheng FL, Mao M, Zhou YF. 2005. Expression of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol*. 11:1105-1108.

- Yang YJ, Chuang CC, Yang HB, Lu CC, Sheu BS. 2012. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates *H. pylori*-induced gastric inflammation by inactivating the Smad7 and NFκB pathways. *BMC Microbiol.* Doi: 10.1186/1471-2180-12-38.
- Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L, Hayman R, Gu H, Roberts AB, Deng C. 1999. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T-cell responsiveness to TGF-β. *EMBO J.* 18:1280–1291.
- Yano S, Mizuno M, Watanabe K. 1990. Stimulatory effect of some therapeutic drugs used for improving cerebral insufficiency on gastric acid secretion in rats. *Pharmacology.* 40:205-210.
- Zhang X, Yang Y, Zhu R, Bai J, Tian Y, Li X, Peng Z, He Y, Chen L, Fang D, Chen W, Zou Q, Mao X, Wang R. 2012. *H. pylori* induces the expression of *Hath1* in gastric epithelial cells via interleukin-8/STAT3 phosphorylation while suppressing *Hes1*. *J Cell Biochem.* 113:3740-3751.

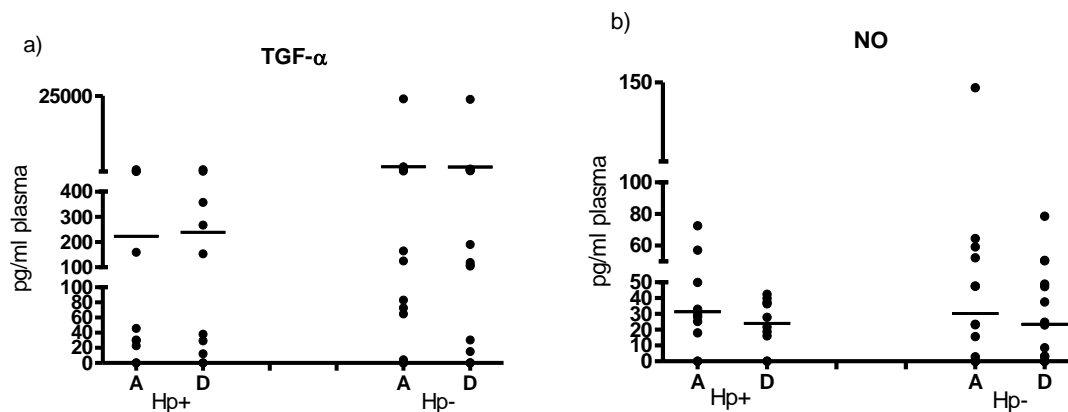
## 11. Anexos



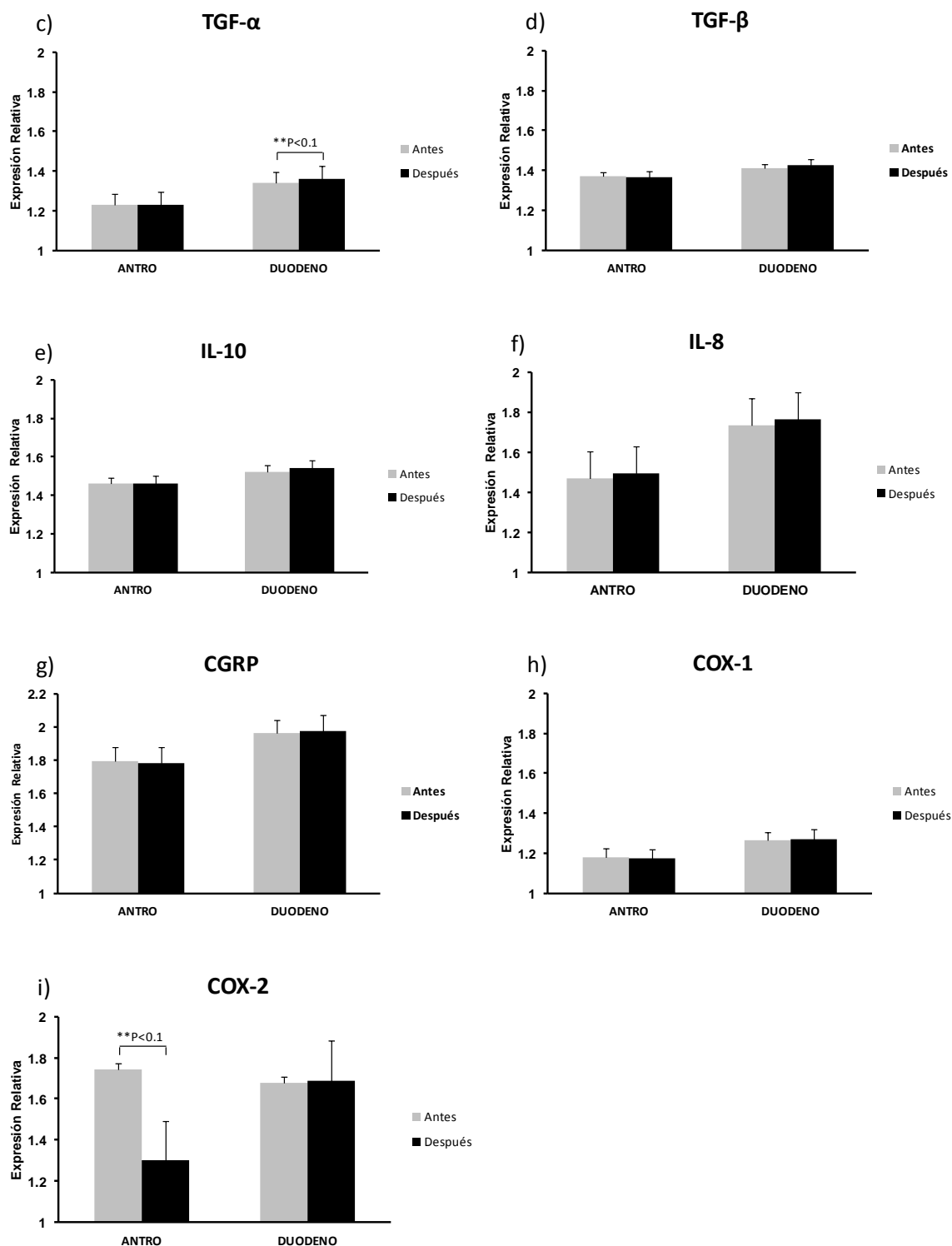
**Anexo 1.** Secreción de citocinas de biopsias de antro y duodeno antes y después de la exposición al GABOB. c) Factor de necrosis tumoral tipo  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), d) Factor transformante de crecimiento tipo  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), e) Interleucina 10 (IL-10), f) Óxido Nítrico (NO). Valor expresado en unidades de concentración pg/mg de proteína. La barra representa los valores de mediana. \* $p < 0.05$  significancia estadística \*\* $P < 0.1$  tendencia estadística obtenida por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon.



**Anexo 2.** Secreción de citocinas de biopsias de antro y duodeno de pacientes positivos y negativos a *H pylori* antes y después de la exposición al GABOB. c) Factor de crecimiento tumoral tipo  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), d) Factor transformante de crecimiento tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), e) Interleucina 10 (IL-10), f) Óxido nítrico (NO). Valor expresado en unidades de concentración pg/mg de proteína. La barra representa los valores de mediana.  $p<0.05$  denota significancia estadística,  $**P<0.1$  tendencia estadística obtenida por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon.



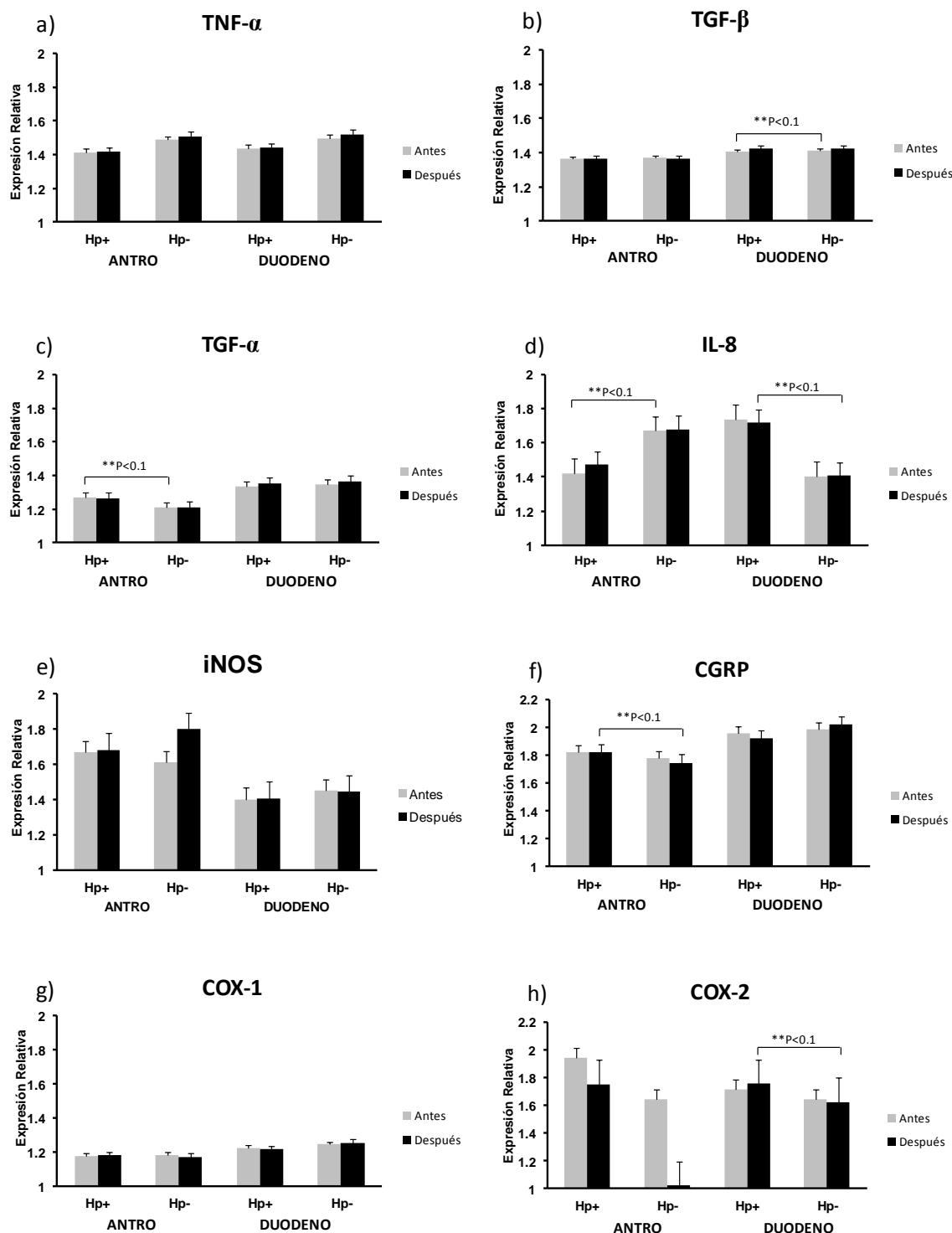
**Anexo 3.** Determinación sistémica de TGF- $\alpha$  y NO en pacientes *H pylori* positivo y negativo antes y después de la exposición al GABOB. a) Factor transformante de crecimiento tipo  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), b) Oxido Nítrico total (NO). Valor expresado en unidades de concentración pg/ml de plasma. La barra representa los valores de mediana.  $p < 0.05$  denota significancia estadística,  $**P < 0.1$  tendencia estadística obtenida por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. (A= antes, D= después del GABOB, Hp+, Hp- = *Helicobacter pylori* positivo y negativo).



**ANEXO 4.** Expresión de RNAm de mediadores de daño gástrico. c) Factor transformante de crecimiento tipo  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), d) Factor transformante de crecimiento tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), e) Interleucina 10 (IL-10), f) Interleucina 8 (IL-8), g) Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), h) Ciclooxygenasa tipo 1 (COX-1), i) Ciclooxygenasa tipo 2 (COX-2). Valor expresado en unidades de expresión relativa. Las barras representan los valores del promedio. \*p<0.05 Significancia estadística,

\*\*p<0.10 Tendencia a la significancia, obtenidas por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon (antes vs. después de GABOB).





Anexo 5. Expresión de RNAm de mediadores de daño gástrico en biopsias de antro y duodeno antes-después de la administración del GABOB en pacientes *H. pylori* positivo y negativo. A) Factor de necrosis tumoral tipo  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), b) Factor transformante de crecimiento tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), c) Factor transformante de crecimiento tipo  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), d) Interleucina 8 (IL-8), e) Sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS), f) Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), g) ciclooxigenasa tipo 1 (COX-1), h) ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2). Valor expresado en unidades de expresión relativa. Las barras representan los valores del promedio. \* $p < 0.05$  Significancia estadística, \*\* $p < 0.10$  Tendencia a

la significancia, obtenidas por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon (antes vs. después de GABOB = ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico). (Hp+, Hp- = *Helicobacter pylori* positivo y negativo).



**EFFECT OF GABOB IN THE INFLAMMATORY RESPONSE OF  
RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS WITH *H. PYLORI* AND  
NSAIDS TREATMENT**

**Hernández-Ramírez María de los Angeles<sup>1,3</sup>, Maldonado-Bernal Carmen<sup>2</sup>, Hernández-  
Calleros Jorge<sup>3</sup>, Gómez-Quiroz Luis Enrique<sup>4</sup>, Martínez-Benítez Braulio<sup>6</sup>, Alfaro-Lara  
Roberto<sup>3</sup>, Barbero-Becerra Varenka J<sup>5</sup>, Gutiérrez-Ruiz María Concepcion<sup>4,\*</sup>, Vargas-  
Vóracková Florencia<sup>3,†</sup>**

<sup>1</sup>Experimental Biology PhD Program.

<sup>2</sup>Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de  
México Federico Gómez.

<sup>3</sup>Depto de Gastroenterología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador  
Zubirán.

<sup>4</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-I.

<sup>5</sup>Obesity and Digestive Diseases Unit, Medica Sur Clinic and Foundation.

<sup>6</sup>Depto de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán,  
México, D.F. México.

Article Received on 18/03/2015

Article Revised on 10/04/2015

Article Accepted on 02/05/2015

**\*Correspondence for**

**Author**

**Gutiérrez-Ruiz María  
Concepcion**

Departamento de Ciencias  
de la Salud, DCBS,  
Universidad Autónoma  
Metropolitana-I.

**ABSTRACT**

*Helicobacter pylori* (Hp) and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) are the major causes of gastric-disorders. Oral GABA-treatment down-regulates inflammatory-responses in rheumatoid-arthritis (RA) models. We investigate the anti-inflammatory effect of oral-ingestion of GABOB in dyspeptic-patients with RA and NSAID intake to establish if Hp-colonization contributes to the association

between NSAID and peptic damage. 26 patients with RA who took NSAIDs and dyspeptic-symptoms were recruited. Patients were tested for Hp-infection. TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-8, NO expression and secretion were determined in antrum-duodenum biopsy and plasma before-after GABOB-treatment. Immunohistochemistry and Sydney evaluation were also conducted. Severity of dyspepsia assessment (SODA) test was applied. Ten patients

were Hp+ and 16 Hp-. IL-8 expression presented higher-values in antrum from patients Hp+, and it correlated with greater inflammatory-infiltration. Data didn't show significant changes in cytokine-levels as a result of GABOB, except IL-8 secretion that increased in Hp+ duodenum biopsy. Moreover, it was observed an increase of Smad3 expression in Hp-duodenum and a decrease in TGF- $\beta$  plasma-levels in the same patients. Apparently, Hp colonization doesn't contribute to increased damage, since we didn't find any correlation among dose, NSAID type, time consuming and gastropathy. These findings suggest that GABOB-treatment improves dyspepsia-tolerability at 60% and 69% of Hp+ and Hp- patients. However, 4 weeks of GABOB-treatment didn't improved inflammatory-mediators in gastric-biopsies nor in plasma-levels.

**KEYWORDS:** cytokines, antrum, duodenum, Sydney evaluation, SODA test.

## INTRODUCTION

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are highly effective agents for the control of musculoskeletal pain and inflammation, and are among the most widely used drugs worldwide. It is well recognized that marked improvements in quality of life occur among patients with rheumatoid arthritis (RA) receiving NSAIDs. Although careful patient selection and monitoring for potential adverse effects is essential, these drugs are well tolerated by most patients. NSAID-induced gastrointestinal events are reported more commonly than adverse effects from any other class of drugs.

Patients with RA are known to have an increased propensity for developing a variety of upper gastrointestinal disorders. Long-term use of NSAIDs is accepted as being the most important factor in the development of peptic ulceration, although surprisingly, few studies have concentrated on patients with RA. The prevalence of gastric ulcer and duodenal ulcer have been reported to be 13% and 11%, respectively, in NSAID-consuming patients with chronic arthritis but, only 0.3% and 1.4% in the population without regular NSAID use.<sup>[1]</sup> In a British study, peptic ulcer disease was detected in 36% RA patients, but, unexpectedly, no difference was observed in NSAID treatment between the ulcer and non-ulcer groups.<sup>[2]</sup>

*Helicobacter pylori* infection is the main cause of chronic gastritis, which is also the commonest histologic finding in patients consuming NSAIDs, and is closely associated with peptic ulcer.<sup>[3]</sup> It is present in more than 90% of patients with duodenal ulcer.<sup>[4]</sup> The role of Hp in patients receiving NSAIDs has been investigated with conflicting results, as the so-

called reactive gastritis has been suggested as a characteristic prevalent finding in patients consuming NSAIDs, but it may also be detected in association with bile reflux, high alcohol intake, or gastric surgery.<sup>[5-6]</sup> Few studies have examined the potential interaction between NSAIDs and Hp, with controversial findings.

It has been shown that gamma-aminobutyric acid (GABA), and various GABAergic agents are important regulators of gastrointestinal functions in the central nervous system.<sup>[7]</sup> There are some evidence that central administration of GABA agonists and antagonist caused significant alteration in gastric motility, gastric secretion, and intestinal electrolyte transport.<sup>[8-9]</sup> Others suggest gastric acid secretion modulation in rats and influence the formation of experimental gastric ulcers, apparently due to their inhibitory effect on mucosal defensive factors. GABA is also able to modulate gastric tone acting peripherally through neural GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors.<sup>[9]</sup> Baclofen, a GABA<sub>B</sub> receptor agonist, attenuates functional dyspepsia and appears to act by central mechanisms.<sup>[10]</sup> However, there is a general disagreement in the literature concerning the characteristics of the GABAergic effects on gastric acid secretion and ulceration. GABA by itself has been reported to increase, decrease or not influence gastric acid secretion.<sup>[11-12]</sup> In recent years, it has become clear that there is an extensive cross-talk between the nervous and the immune system. Indeed, the immune cells themselves express components of the neuronal neurotransmitters systems. The role that neurotransmitters and, their ion channels, receptors and transporters have in immune function and regulation is an emerging field of study. Several recent studies have shown that the immune system is capable of synthesizing and releasing the classical neurotransmitter GABA, which has a number of effects on immune cells such as activation or suppression of cytokine secretion, modification of cell proliferation, even affect cellular migration. The GABA also appears to have a role in autoimmune diseases like multiple sclerosis, type 1 diabetes and RA and may modulate the immune response to infections.<sup>[13-15]</sup> Oral GABA treatment down regulates inflammatory responses in a mouse model of rheumatoid arthritis.<sup>[16]</sup> Kelley et al. propose that GABA may down regulate p38 MAPK activity to reduce peripheral production of proinflammatory cytokines in joints affected by RA. 4-Amino-3-hydroxybutanoic acid (GABOB) is an endogenous ligand found in the central nervous system in mammals<sup>[17]</sup> and it is considered a metabolic product of GABA. GABOB has anticonvulsant properties. More studies have been suggested that it may improve learning and memory function, probably through a cholinergic mechanism, as well as boosting growth hormone release.<sup>[9]</sup> Recently Liu et al. demonstrated that GABOB, presumably by activation

of GABA<sub>B</sub> receptors, significantly attenuates behavior and visceromotor responses to gastric mechanical distention.<sup>[10]</sup> They consider the GABAergic pathway as a potential target for the treatment of functional dyspepsia and related conditions.<sup>[9]</sup>

The present study aimed first to estimate the effect of oral ingestion of GABOB in dyspeptic patients with RA and to establish whether or *Helicobacter pylori* colonization contributes to the association between NSAID intake and peptic damage.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Cohort

26 patients with early diagnosis of RA from the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” Hospital (INCMNSZ), Mexico City, were considered in this study. All patients presented dyspeptic symptoms and abdominal pain or discomfort for at least one week of evolution and were under NSAIDs treatment for more than two weeks. Patient selection was based on clinical examination, endoscopy, and anti-Hp IgG test. Ten of them were Hp positive and sixteen negative. After diagnosis, patients were treated with 250 mg GABOB daily for a month. All patients had a standardization diet and, free of irritants, one week prior beginning to take the GABOB. They all signed an informed consent before entry to the protocol. The study was approved by the Ethical Committee of the INCMNSZ (approval number 1524).

### SODA Scale

Severity of Dyspepsia Assessment (SODA) scales that measures the change in dyspepsia-related health, which takes into account the multidimensional nature of dyspepsia using three scales (pain, non-pain symptoms, and satisfaction with dyspepsia-related health) and demonstrates good psychometric properties with respect to validity, reliability and sensitivity to change in the measurement of dyspepsia-related health<sup>[18]</sup> were applied at visit 1 and when patients finished the study.

### Biopsy Specimens

Two biopsies samples were collected during endoscopy study from each patient by a certified gastroenterologist, one biopsy from antral of the stomach and another one from duodenum previously to GABOB treatment initiation. Procedure was repeated after 4 weeks of treatment. Biopsies from each patient were divided into three sections, the first one was stored in RNA later at -70°C, the second one for ELISA and Western blot analysis, and the

third was fixed with 10% formaldehyde for immunohistochemistry and Haematoxylin-Eosin staining. The histological variables were graded according to the Updated Sydney System visual analogue scale to generate a score (0 = absent, 1 = mild, 2 = moderate and 3 = marked).

### **Cytokine assays**

Biopsy samples were washed, homogenized and centrifuged. Supernatants were obtained from centrifugation at 12000xg for 10 min at 4°C. Plasma was also separated by centrifugation (2000xg for 15 min at 4°C). Samples were frozen at -20°C until used for IL-8, IL-10, TGF-β, TGF-α, TNF-α and NO measurements by ELISA (Biolegend, San Diego, CA; BD Biosciences, New Jersey) according to manufacturer's instructions. In each patient, every determination was run by duplicate. Total concentrations in samples were expressed as pg/mg of protein. Plasma values were expressed as pg/ml.

### **Quantitative RT-PCR assays for cytokines and others molecules**

Biopsies from 21 patients with Hp+ or Hp-, were subjected to RNA isolation and qRT-PCR of IL-8, IL-10, CGRP, inducible NO synthase, TNF-α, TGF-α, TGF-β, COX-1, COX-2, using primers and probes listed in table 1 (table 1 as shown in ESM) and following protocol reported by Trejo.<sup>[19]</sup> mRNA levels were expressed as cytokine mRNA/GAPDH mRNA. Each assay was performed in duplicate and each cytokine assay was performed testing all RNA samples in the same experiment.

### **Western blot analysis**

Total proteins were isolated from antrum and duodenum biopsies with Tissue Extraction Buffer (T-PER) (Pierce Rockford, IL, EU) containing complete protease inhibitor and PhosphoStop tablet (Roche Indianapolis, EU). 70 µg of total protein were subjected to Western blotting as previously reported Gomez-Quiroz *et al.*,<sup>[20]</sup> using anti-cyclooxygenase-1/PTGS1/COX-1 and anti-cyclooxygenase-2/PTGS2/COX-2 (Imgenex, San Diego, CA), anti-phospho-NF-κB p65 and phospho-Smad 3 (Cell Signaling Technology, Boston, EU) antibodies.

### **Apoptosis detection**

Biopsy specimens from patients were fixed in 10% formalin, and apoptotic cells were detected with immunostaining of active caspase 3 according to the instructions of the manufacturer (Biocare Medical, USA; CP 229 A,B,C.).

### Immunohistochemistry

10 gastric biopsies (5 Hp+ and 5 Hp-) previous to GABOB treatment were fixed in formaline and embedded in paraffin. Sections of 1.5 microns (Hyrax M25, EPC-1200PC, Zeiss, Germany) were prepared and subjected to immunohistochemistry,<sup>[20]</sup> using primary antibody against COX-1 or COX-2 (Abcam, USA; Imgenex).

Evaluation of COX-1 and COX-2 was performed according to the following scoring system: staining intensity was graded as absente (0), weak (1), moderate (2), or strong (3), area of staining positivity as <10% (0) of all cells stained in the cytoplasm, 10-40% (1), 40-70% (2), or  $\geq$ 70% (3), and gland of staining positivity as absente (0), surface (1) intermediate (2) and deep (3). Total scores for grade and area of three or more, were defined as positive expression and less than three as negative.<sup>[22]</sup>

### Statistical Analysis

The quantitative variables will summarize in terms of median and intervals (minimum and maximum values). In the case of RNAm determination in figure 2, data are means + SD. The analysis of the change was made by the proof of the ranks of Wilcoxon and the change between groups was made by Mann-Withney test while analysis between different groups by Kruskal-Wallis test. A p value <0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Patients

26 patients with RA were included in the study. Of these subjects 10 patients (10 F) were *Helicobacter pylori* positive (Hp+) and had a median age of 37 years old (range 23-64 years old) and 16 patients (15F/1M) were *Helicobacter pylori* negative (Hp-) and had a median age of 52 years old (range 36-69 years old). All patients were treated with NSAID's, 31% indomethacin, 31% diclofenac and the remaining patients other NSAIDs (ibuprofen, sulindac, naproxen, piroxicam, acetaminophen). NSAID's were taken from different periods and dose from 2 months to 10 years. Gastropathy was evaluated by endoscopy: nodular and erosive gastropathy, mild chronic superficial gastritis antrum and body, erythematous and erosive gastropathy antral gastropathy chronic alkaline reflux changes in antrum and body or chronic follicular gastritis inactive. No relationship was found between treatment of NSAID's, gastropathy and the presence or absence of *Helicobacter pylori*. SODA, which is a multidimensional, reliable and clinically meaningful valid instrument used as a measure of



dyspepsia tolerability, showed that 60% of patients Hp+ and 69% of patients Hp- considered an improvement in dyspepsia tolerability as result of GABOB treatment.

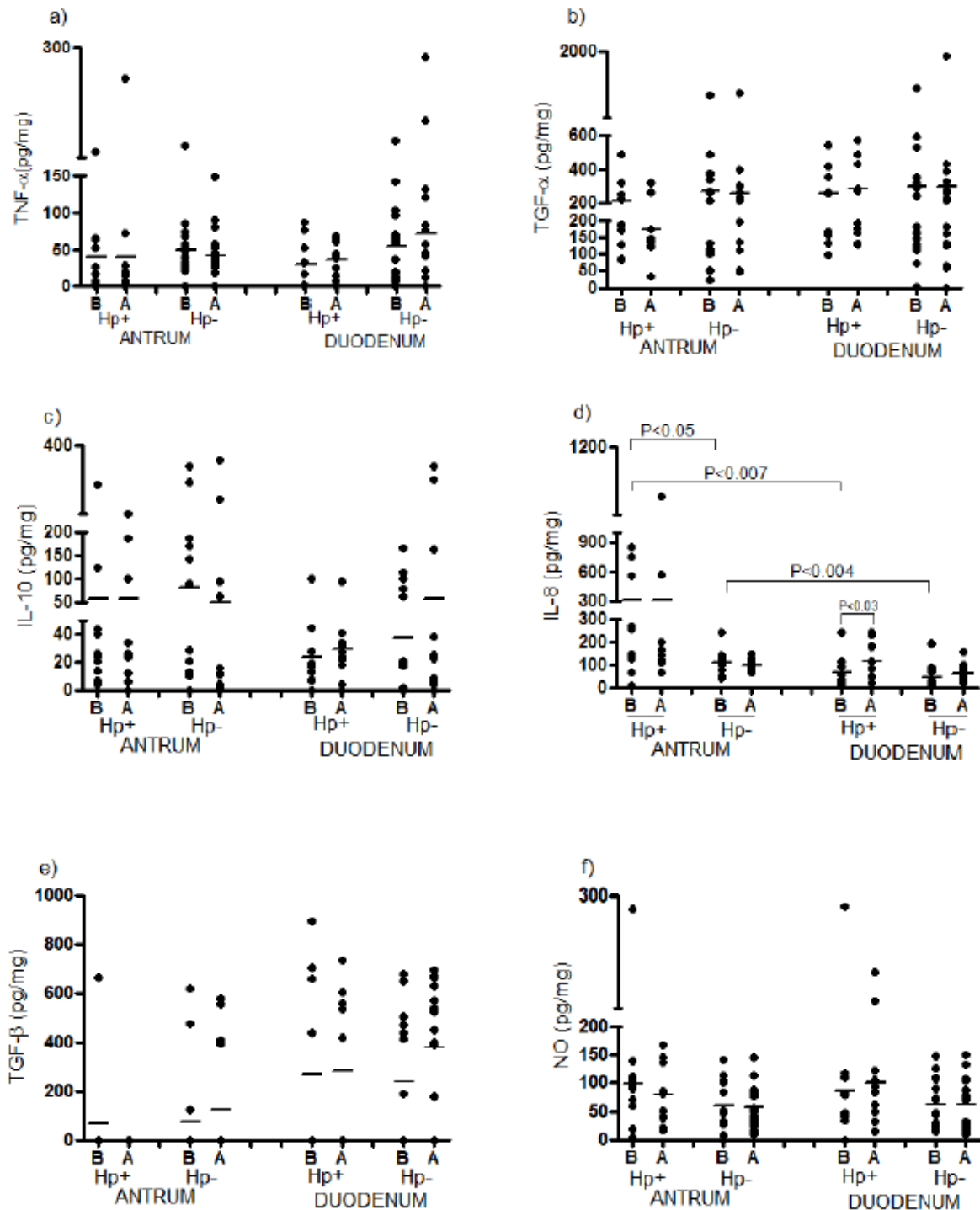
#### **Cytokine content in antrum and duodenum biopsy**

The antral and duodenal biopsies were taken at visit 1 before starting treatment with GABOB and at visit 4 at the end of treatment with the drug. TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , IL-10, IL-8, TGF- $\beta$  and NO were determined (Figure 1).

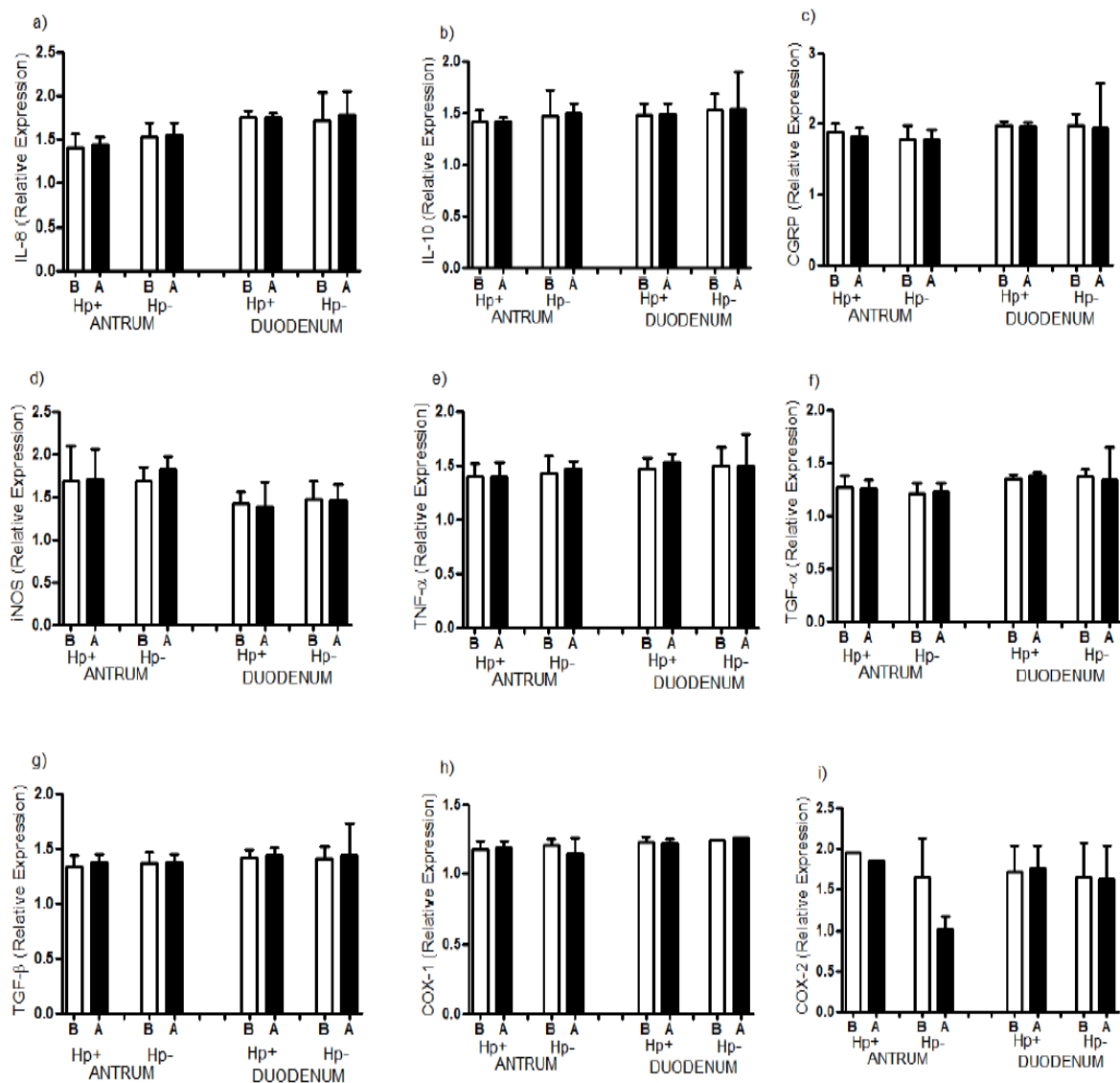
Results showed a significant difference between IL-8 protein expression values in the antrum versus duodenum (Figure 1D) being higher in the case of antral biopsies in patients Hp+ and Hp-, with a median value of 201.85 pg/mg (range 109-700) and 114.04 pg/mg (range 77-128), respectively. After GABOB treatment, IL-8 protein expression did not change in antrum biopsies. However, in duodenal biopsies, IL-8 protein expression was increased as a result of treatment in both Hp+ [median value 99.26 pg/mg (38-193)] and Hp- [median value 58.19 pg/mg (range 38-88)] patients. It is notably that IL-8 concentration was higher in Hp+ than Hp- in antrum independent of treatment of GABOB.

#### **qRT-PCR assays of gastric damage mediators in biopsies of antrum and duodenum**

IL-8, IL-10, CGRP, inducible NO synthase (iNOS), TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , COX-1, COX-2 gene expression were determined. None of the determined variables presented a statistically significant change. There is no difference between antrum and duodenum biopsies in Hp+ and Hp- samples, neither before and after GABOB treatment (Figure 2).



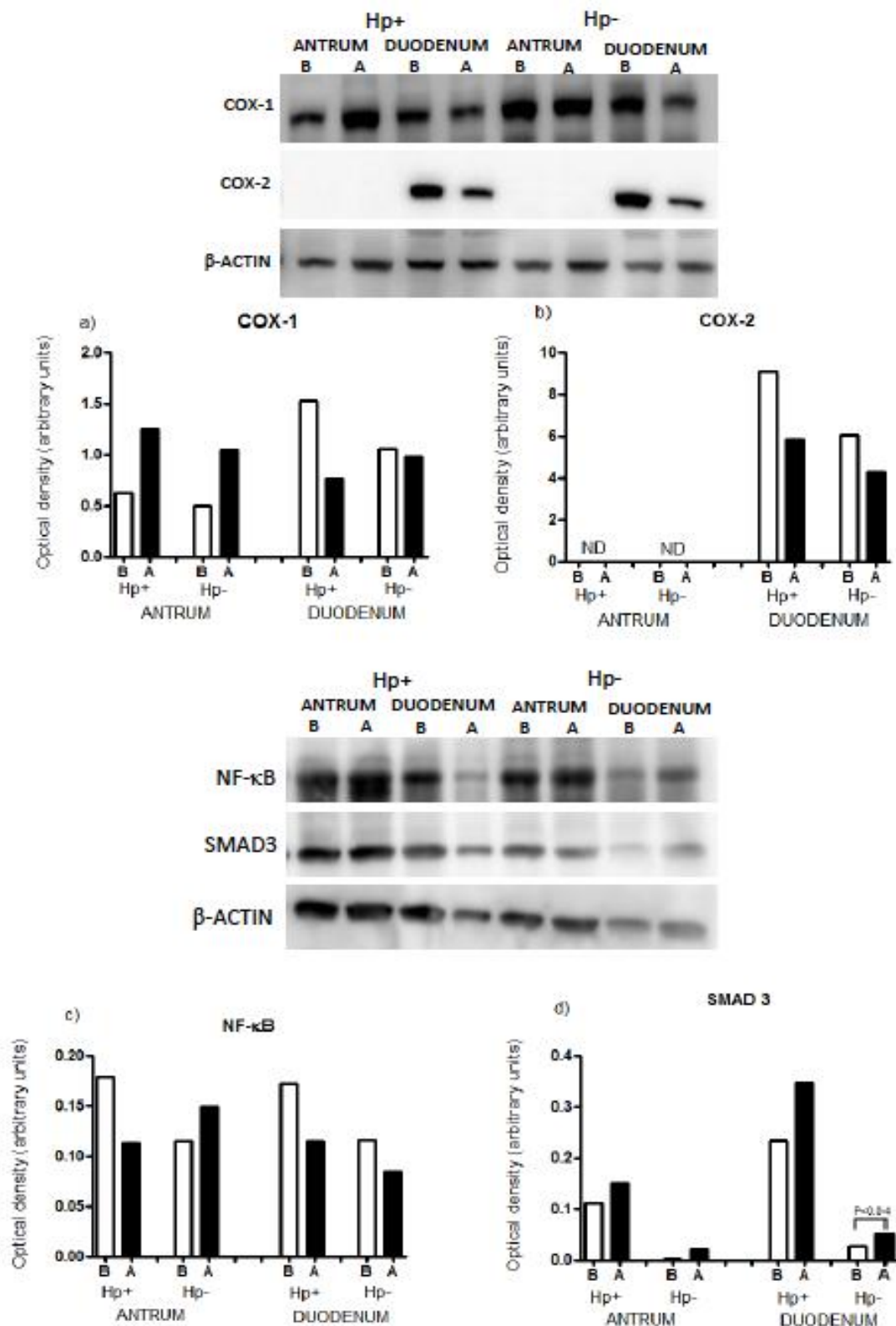
**Figure1-** Cytokines and NO concentration in antrum and duodenum biopsies of *Helicobacter pylori* positive (Hp+) and negative (Hp-) patients before (B) and after (A) GABOB treatment. a)TNF- $\alpha$ , b)TGF- $\alpha$ , c)IL-10, d)IL-8, e)TGF- $\beta$  and f)NO concentration. Data from each patient were plotted and median is shown. Inflammatory status, measured by IL-8 presented significant difference between Hp+ and Hp- antrum biopsies before treatment and between antrum versus duodenum Hp+. GABOB treatment only changes IL-8 expression in duodenum Hp+ biopsies.



**Figure 2-** a)IL-8, b)IL-10, c)CGRP, d)inducible NO synthase (iNOS), e)TNF- $\alpha$ , f)TGF- $\alpha$ , g)TGF- $\beta$ , h)COX-1, i)COX-2 gene expression in antrum and duodenum biopsies *Helicobacter pylori* positive (Hp+) and negative (Hp-) of patients before (B) and after (A) GABOB treatment. Data are expressed as mean + SD.

#### COX-1, COX-2, NF- $\kappa$ B and Smad3 Western blot analysis

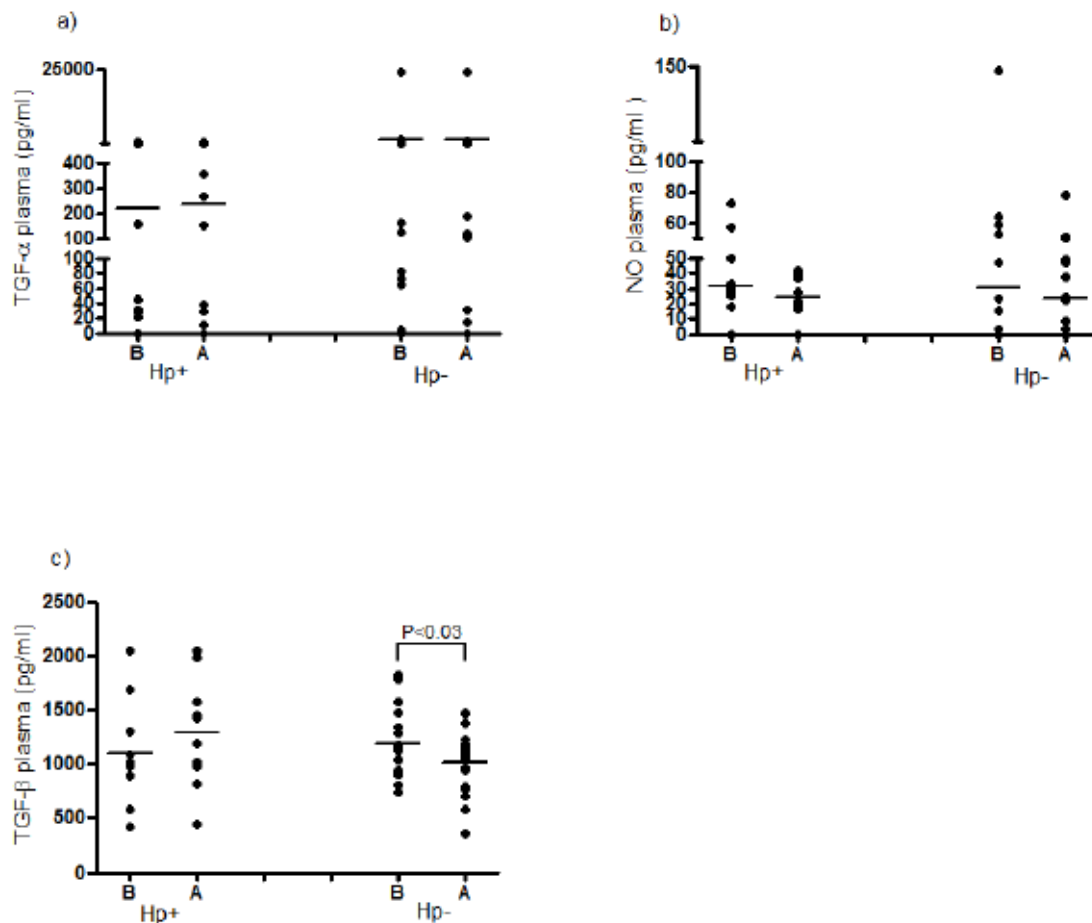
Western blot analysis for COX-1, COX-2, NF- $\kappa$ B and Smad3 expression were carried out in antrum and duodenum biopsies Hp+ and Hp- (Figure 3). COX-2 was not detectable by this technique in antrum Hp+ nor Hp- in basal condition or after GABOB treatment. The results showed no change in COX-1, COX-2, NF- $\kappa$ B and Smad3 expression between Hp+ versus Hp- in antrum and duodenum, except a statistically significant change observed in Smad 3 expression in duodenum Hp-, due to GABOB treatment.



**Figure 3-** Protein content determined by Western blot a)COX-1, b)COX-2, c)NF-κB and SMAD3 from gastric antrum and duodenum biopsies *Helicobacter pylori* positive (Hp+) and negative (Hp-) of patients before (B) and after (A) GABOB treatment. Horizontal bars represent median expression.

### Plasma cytokine concentration

IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and NO concentration were determined in plasma. TGF- $\alpha$  and NO did not change after GABOB treatment, meanwhile the remaining cytokines were not detectable. Only TGF- $\beta$  decreased in Hp- as a result of GABOB treatment (Figure 4).



**Figure 4-** a)TGF- $\alpha$ , b)NO and c)TGF- $\beta$  plasma concentration from *Helicobacter pylori* positive (Hp+) and negative (Hp-) of patients before (B) and after (A) GABOB treatment. Only TGF- $\beta$  concentration in Hp- patients presented significant reduction as a result of GABOB treatment.

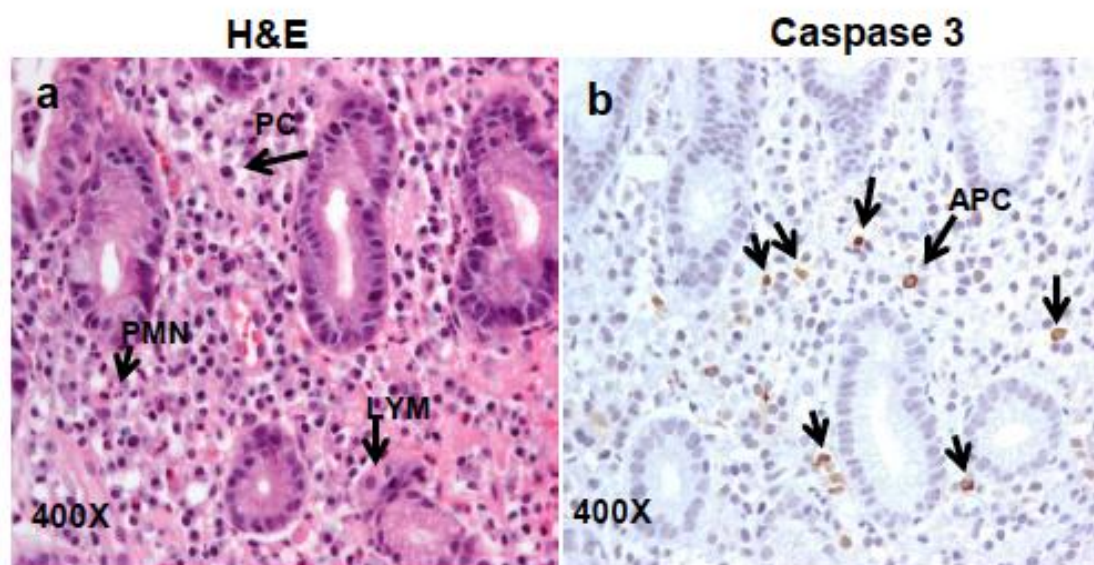
### Sydney evaluation

Antrum biopsies were analyzed after standardization diet and before GABOB treatment (visit 0). Biopsies from each patient were staining with hematoxylin-eosin and histological evaluation was performed according to the Updated Sydney System. Mononuclear infiltrates in antrum biopsies were present in all Hp+ (30% mild, 70% moderate) biopsies, while Hp- only in 50% (43.75% mild and 6.25% moderate) at lamina propria of gastric mucosa and in

the cytoplasm as lymphoplasmocytic infiltrate. On the other hand, polymorphonuclear cell infiltrate was observed in 80% of Hp+ biopsies (70% mild, 10% moderate), meanwhile neutrophil infiltrate was presented in 12% of Hp- biopsies (6.25% mild and moderate) and were found in the lamina propria, particularly in the epithelium of glandular neck and foveolar lumen.

### Cleaved caspase 3 immunohistochemistry

Apoptotic cells were quantified from antral biopsies in visit 0 by cleaved caspase-3 immunohistochemistry and determined in 10 high-power yields in each biopsy. There was no difference between Hp+ and Hp- patients finding an average of 23 apoptotic cells/10 high power yield (Figure 5).

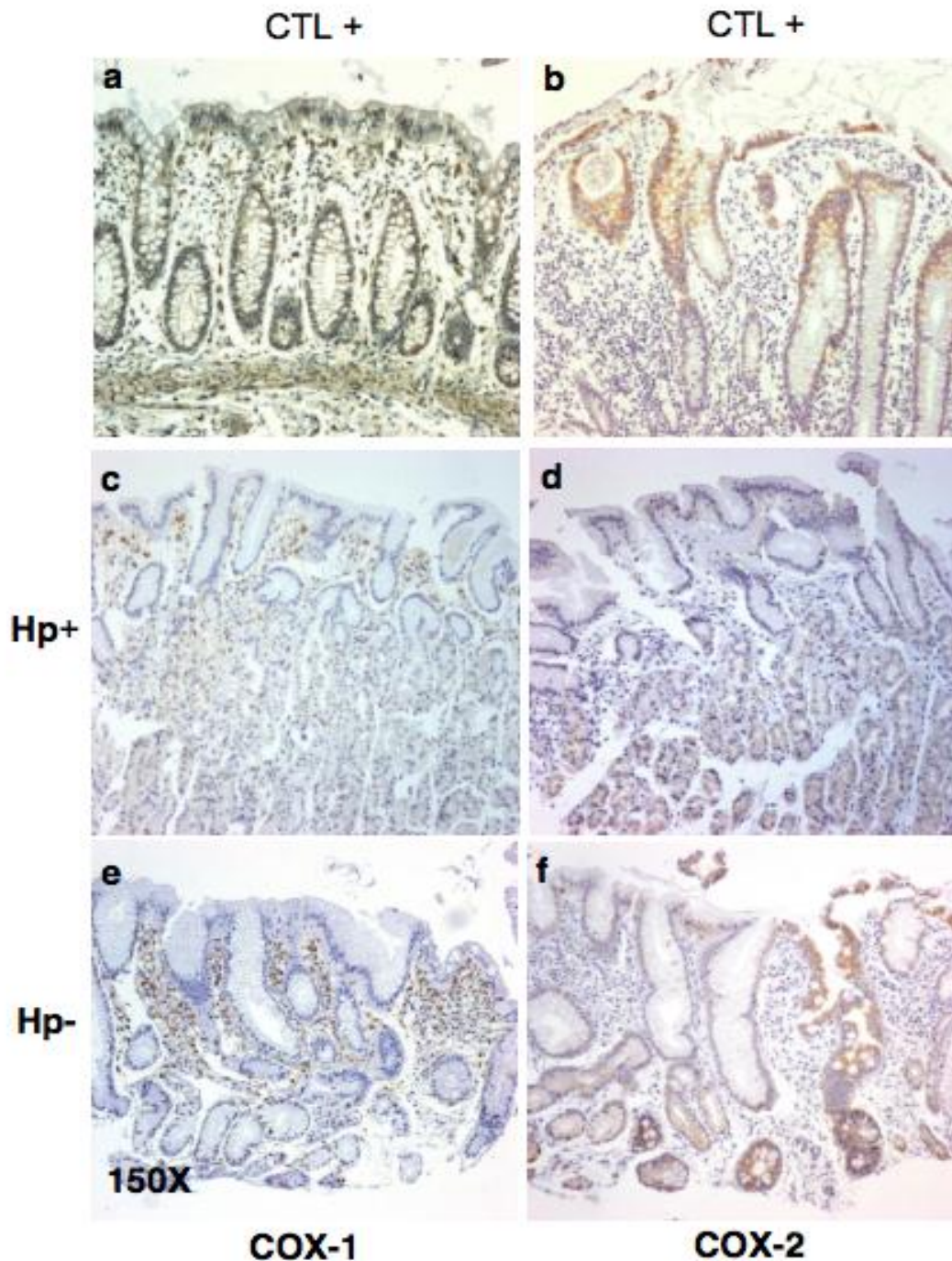


**Figure 5-** Photomicrographs of the a) haematoxylin and eosin (H&E)-stained tissue sections of antrum gastric tissues and active caspase 3 Hp+ before GABOB treatment. Biopsies from each patient were staining with hematoxilin-eosin and histological evaluation was performed according to the Updated Sydney System. Representative image of Hp+ patients that presented 100% of mononuclear infiltrate. Only 50% in Hp- presented mononuclear infiltrate (image not shown). b) Apoptotic cells were quantified from activated caspase 3 immunohistochemistry in Hp+ before GABOB treatment. There was no difference between Hp+ and Hp- patients (image not shown).

### Immunohistochemistry assay for COX-1 and COX-2 and staining evaluation

Immunohistochemistry showed the presence of COX-2 in Hp+ and Hp- antrum biopsies before GABOB treatment. However, no difference in COX-1 or 2 could be observed,

although COX-2 was not detectable by Western blot. The overall presence of COX-1 and COX-2 in antrum biopsies was not significantly affected by presence of Hp (Figure 6).



**Figure 6-** Photomicrographs of COX-1 and COX-2 in sections of antrum gastric tissues Hp+ and Hp- before GABOB treatment. a) and b) Positive controls for COX-1 and Cox-2 respectively, c) COX-1 in Hp+, d) COX-2 in Hp+, e) COX-1 in Hp- and d) COX-2 in Hp-. No difference in COX-1 and COX-2 were observed.

## DISCUSSION

Our findings suggest that GABOB treatment improves tolerability in dyspeptic symptoms in 60% of Hp+ and 69% of Hp- patients. IL-8 expression presented higher values in antrum in Hp+, patients, that correlates with greater inflammatory infiltration. IL-8 secretion was increased in Hp+ duodenum biopsies as a result of GABOB treatment. Smad3 expression increased in Hp- duodenum; while a decreased of TGF- $\beta$  plasmatic levels were observed in the same patients. Apparently, Hp colonization does not promotes damage, since we did not find any correlation among dose, NSAID type, time consuming and gastropathy. We suggest that 4 weeks of GABOB treatment is not enough to improve inflammation mediators in gastric biopsies, nor in plasma levels of patients with rheumatoid arthritis.

There are conflicting results regarding the role that *H. pylori* plays in the pathogenesis of ulcers induced by NSAIDs. Cross-sectional studies of chronic NSAID users from the general population of rheumatology patients have not shown a difference prevalence of ulcers among those with or without *H. pylori* infection.<sup>[23]</sup> Similar results have been reported in a follow-up endoscopic ulcer study of relatively highly selected chronic NSAID users. Tanaka et al observed a lower incidence of *H. pylori* infection in RA patients with chronic use of NSAIDs, and suggested that some NSAIDs have antibacterial effect against *H. pylori*. However, they concluded that *H. pylori* infection was a significant risk factor for upper gastrointestinal ulcer in Japanese patients with RA.<sup>[24]</sup> Kim and Graham reported similar results as in the present study; authors suggested that *H. pylori* does not confer increased risk of ulceration in arthritics receiving NSAIDs chronically.<sup>[25]</sup> However, Goggin et al. have shown that *H. pylori* infection is associated with increased dyspeptic symptoms in RA patients taking NSAIDs, but that infection does not predispose to NSAID gastropathy.<sup>[26]</sup> Vonkeman et al. in a recent controlled clinical trial, found that eradication of *H. pylori* infection did not reduce the incidence of endoscopic gastroduodenal ulcers in *H. pylori* seropositive patients currently taking NSAIDs for rheumatic diseases.<sup>[27]</sup>

There are some conflicting results about GABOB effect. Yano et al. reported that GABOB produced an increase in gastric acid secretion.<sup>[28]</sup> However, there are some reports that consider that GABA and GABA receptor agonists are involved in the regulation of mouse gastric tone, through modulation of intrinsic neurons<sup>[9,29]</sup> and that this stimulation impact in antrum which involves GABAergic transmission,<sup>[30]</sup> which is not surprisingly since GABOB is considered an endogenous ligand found in the central nervous system in mammals which is



a metabolic product of GABA, and exerts similar effects. In this way, GABOB also can have not only an effect on gastric cells, but also an effect on cells of the immune system. In the present study, we found that GABOB treatment increased chemokine (IL-8) secretion at duodenum level concomitantly with *Helicobacter pylori* colonization. On the other hand, without *Helicobacter pylori* colonization we observed an increased of Smad3 expression at duodenum level, which decreases TGF- $\beta$  plasma levels.

Accordingly to IL-8 levels, we observed higher concentration at antrum level in Hp+ patients compared to Hp-. This result could be correlated with greater inflammatory infiltrate found in Hp+ antrum biopsies quantified by Sidney System. Also, duodenum concentration for IL-8 were lower than the corresponding for antrum. GABOB treatment produced no change in this cytokine in antrum samples; however, only Hp+ patients significantly increased the value of IL-8 duodenal biopsies. Stromberg et al. have shown that duodenal ulcer (DU) patients have a significantly lower IL-8 response in the duodenum than asymptomatic carriers, which may be of importance for the pathogenesis of *H. pylori*-induced duodenal ulcers and most likely can be explained by host factors.<sup>[31]</sup>

TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$  and NO concentration were similar in infected and uninfected patients, also they have the same values in antrum as well as duodenum biopsies (Figure 1), but any of these parameters change after GABOB treatment. *H. pylori* infection is associated with increased expression of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1RI, Smad-7, and CTGF in the gastric antrum.<sup>[32]</sup> Bontems et al. reported that IL-2, IL-4, IL-10 and TNF- $\alpha$  concentrations were similar in Hp+ and in uninfected adults in mucosal and duodenum biopsies.<sup>[33]</sup> IL-8, IL-10 TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , iNOS, CGRP, COX-1 and COX-2 expression did not change in any case (Figure 2), which indicate that there is not a transcriptional change. These parameters showed similar values, that points out the lack of difference between the antrum and duodenal biopsies, nor due to the presence of *Helicobacter pylori* infection. Even mRNA IL-8 expression did not increase, IL-8 secretion in antrum Hp+ patients did increase, mainly based on the fact that the expression as well as secretion, were held in the same sample and possibly the induction of mRNA was at previous times. GABOB treatment did not produce any change. Subjects Hp- treated with ibuprofen during 3 days with gastric lesions or adverse reactions had lower PGE2 levels. COX-1, COX-2, eNOS, and iNOS were detectable in all subjects. The constitutive enzymes (COX-1 and eNOS) did not change after treatment. COX-2 was higher in corpus than antrum and it increased after ibuprofen treatment. iNOS tended to

increase mildly in the corpus in subjects with adverse reactions or endoscopic lesions.<sup>[34]</sup> Other studies have shown that *H. pylori* infection was associated with increased COX-2 expression in gastric antral mucosa for both NSAID users and nonusers, but not in gastric ulcer, where the effect of NSAID inhibition plays a major role. The authors concluded that *H. pylori* eradication does not interfere with gastric ulcer healing in NSAID users.<sup>[35]</sup> Conversely, in *H. pylori* infected mice, NSAID treatment significantly decreased the degree of gastric inflammation.<sup>[36]</sup> Therefore, it is possible that HP+ patients with concurrent NSAID treatment, may affect levels of gastric inflammation and consequently the serological response. There are some reports that indicate that *H. pylori* infection can activate NF- $\kappa$ B in gastric epithelium cells and subsequently up-regulate IL-8 gene transcription.<sup>[37]</sup> However, our data indicate that although we have an increase of pro-inflammatory IL-8 cytokine in *H. pylori* infected antral biopsy and an increased inflammatory infiltrate observed by microscopy, we did not find an increase in the activation of NF- $\kappa$ B. The results suggest that mononuclear cells in lamina propria were the major source of this pro-inflammatory cytokine. As seen in the different studies, there is a large discrepancy in the results obtained. Recent data indicated that *H. pylori* induced inflammation, up-regulate *Hath1* expression via interleukin-8/STAT3 (IL-8) phosphorylation while suppressing *Hes1*, which provides a novel molecular connection between a *H. pylori* infection and intestinal metaplasia.<sup>[38]</sup> No results were found in the literature regarding the effect of GABOB in antrum and duodenal biopsies, but our data have suggested that GABOB does not contribute to ameliorate inflammatory response.

We determined plasma concentration of IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and NO. IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  were not detectable. TGF- $\alpha$  and NO did not change after GABOB treatment, whereas only TGF- $\beta$  decreased in Hp- as a result of GABOB treatment (Figure 4). Notwithstanding, a few data are available on the circulating levels of cytokines in *H. pylori* infection. Russo et al. reported in asymptomatic people carrying *H. pylori* infection, a significantly higher TNF- $\alpha$  level than uninfected subjects.<sup>[39]</sup> On the contrary, IL-8 levels were significantly higher in the uninfected subjects than in *H. pylori* positive ones. Also they found that IFN-gamma and IL-10 circulating levels were not affected by *H. pylori* presence, being not significantly different in the two groups. Bayraktaroglu et al. could not be able to demonstrate any increase in circulatory cytokines in *H. pylori*- positive patients.<sup>[40]</sup> Although mucosal cytokine production was found to correlate well with the intensity of gastric mucosal inflammation, serum cytokine levels did not show any correlation with Sydney parameters,

including the gastric epithelial inflammatory scores, *H. pylori* density and activation. In the literature, some authors reported increased circulatory TNF- $\alpha$  levels while serum IL-8 levels remained normal in *H. pylori*-infected persons. Some others reported elevated serum TNF- $\alpha$  levels in patients with CagA positive *H. pylori* infection. IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 were elevated in Cag A-positive cases. We did not determine the Cag A status of our patients. Thus, we do not know whether most or all of our patients were infected with a Cag A-positive strain. However, we know that our patients had endoscopic sign of gastroduodenal disease. As a result of contradictory reports, including ours, we do not know whether the continuous spill-over of cytokines into the blood stream could be possible as a consequence of gastric mucosal cytokine activation and increased synthesis. We think that further studies are needed, but it could be difficult that *H. pylori* induced changes in the circulatory cytokine levels. Probably, only under specific conditions of acute events, gastric mucosal pro-inflammatory cytokines could be increased and be reflected in cytokine serum levels.

Our results showed, that COX-1 and COX-2 were detected by immunohistochemistry using the avidin-biotin complex. However, no difference was found in antrum biopsies Hp+ and Hp- in visit 0 (Figure 5). Wu *et al.* reported that *H. pylori* increased IL-8 and COX-2 in the antral mucosa, but did not influence COX-2 and local cytokines in gastric ulcer. NSAIDs inhibited COX-2 in gastric ulcer and delayed gastric ulcer healing.<sup>[41]</sup>

Our findings demonstrate that GABOB treatment improves dyspepsia tolerability in 60% and 69% of Hp+ and Hp- patients, respectively. Although, chronic NSAID users from rheumatology patients have not shown a difference in gastric disorders among those with or without *H. pylori* infection. We believe that 4 weeks of GABOB treatment did not improved inflammatory mediators in gastric biopsies nor in plasma levels.

#### **Conflict of interest disclosure statement**

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Salud-2009-01-111758.

The Experimental Biology PhD student was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 162320 and Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICYTDF) 19186.

## REFERENCES

1. Scheiman JM. NSAIDs, gastrointestinal injury, and cytoprotection. *Gastroenterol Clin North Am.* 1996; 25: 279-98.
2. Farah D, Sturrock RD, Russell RI. Peptic ulcer in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1988; 47: 478-80.
3. Marshall BJ. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer: have Koch's postulates been fulfilled? *Ann Med.* 1995; 27: 565-68.
4. Walsh JH, Peterson WL. The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. *N Engl J Med.* 1995; 333: 984-91.
5. Taha AS, Russell RI. *Helicobacter pylori* and non-steroidal anti-inflammatory drugs: uncomfortable partners in peptic ulcer disease. *Gut.* 1993; 34: 580-83.
6. Sobala GM, O'Connor HJ, Dewar EP, King RF, Axon AT, Dixon MF. Bile reflux and intestinal metaplasia in gastric mucosa. *J Clin Pathol.* 1993; 46: 235-40.
7. Jin Z, Mendu SK, Birnir B. GABA is an effective immunomodulatory molecule. *Amino Acids.* 2013; 45: 87-94. doi: 10.1007/s00726-011-1193-7. Epub 2011.
8. Marcoli M, Scarrone S, Maura G, Bonanno G, Raiteri M. A subtype of the gamma-aminobutyric acid(B) receptor regulates cholinergic twitch response in the guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 293: 42-47.
9. Rotondo A, Serio R, Mulè F. Functional evidence for different roles of GABAA and GABAB receptors in modulating mouse gastric tone. *Neuropharmacology.* 2010; 58: 1033-37.
10. Liu LS, Shenoy M, Pasricha PJ. The analgesic effects of the GABAB receptor agonist, baclofen, in a rodent model of functional dyspepsia. *Neurogastroenterol Motil.* 2011; 23: 356-361, e160-1.
11. Tsai LH, Taniyama K, Tanaka C. gamma-Aminobutyric acid stimulates acid secretion from the isolated guinea pig stomach. *Am J Physiol.* 1987; 253(5 pt 1): G601-G06.
12. Bhargava KP, Gupta GP, Gupta MB. Central GABA-ergic mechanism in stress-induced gastric ulceration. *Br J Pharmacol.* 1985; 84: 619-23.
13. Bhat R, Axtell R, Mitra A, Miranda M, Lock C, Tsien RW, et al. Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 2580-85.

14. Mendu SK, Akesson L, Jin Z, Edlund A, Cilio C, Lernmark A, et al. Increased GABA(A) channel subunits expression in CD8(+) but not in CD4(+) T cells in BB rats developing diabetes compared to their congenic littermates. *Mol Immunol.* 2011; 48: 399-407.
15. Wheeler DW, Thompson AJ, Corletto F, Reckless J, Loke JC, Lapaque N, et al. Anaesthetic impairment of immune function is mediated via GABA(A) receptors. *PLoS One.* 2011; 6: e17152.
16. Tian J, Yong J, Dang H, Kaufman DL. Oral GABA treatment downregulates inflammatory responses in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity.* 2011; 44: 465-70.
17. Kelley JM, Hughes LB, Bridges SL Jr. Does gamma-aminobutyric acid (GABA) influence the development of chronic inflammation in rheumatoid arthritis? *J. Neuroinflammation.* 2008; doi: 10.1186/1742-2094-5-1.
18. Rabeneck L, Cook KF, Wristers K, Soucek J, Menke T, Wray NP. SODA (severity of dyspepsia assessment): A new effective outcome measure for dyspepsia-related health. *J Clin Epidemiol.* 2001; 54: 755-65.
19. Trejo-de la O A, Torres J, Pérez-Rodríguez M, Camorlinga-Ponce M, Luna LF, Abdo-Francis JM, et al. TLR4 single-nucleotide polymorphisms alter mucosal cytokine and chemokine patterns in Mexican patients with *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases. *Clin Immunol.* 2008; 129: 333-40.
20. Gómez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2008; 283: 14581-89.
21. Takami T, Kaposi-Novak P, Uchida K, Gomez-Quiroz LE, Conner EA, Factor VM, et al. Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 2007; 67: 9844-51.
22. Xiong B, Sun TJ, Hu WD, Cheng FL, Mao M, Zhou YF. Expression of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 1105-08.
23. Bazzoli F, De Luca L, Graham DY. *Helicobacter pylori* infection and the use of NSAIDs. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2001; 15: 775-85.
24. Tanaka E, Singh G, Saito A, Syouji A, Yamada T, Urano W, et al. H. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and risk of upper gastrointestinal ulcer in patients with rheumatoid arthritis in Japan. *Mod Rheumatol.* 2005; 15: 340-45.

25. Kim JG, Graham DY. Helicobacter pylori infection and development of gastric or duodenal ulcer in arthritic patients receiving chronic NSAID therapy. The Misoprostol Study Group. *Am J Gastroenterol.* 1994; 89: 203-07.
26. Goggin PM, Collins DA, Jazrawi RP, Jackson PA, Corbishley CM, Bourke BE, et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection and its effect on symptoms and non-steroidal anti-inflammatory drug induced gastrointestinal damage in patients with rheumatoid arthritis. *Gut.* 1993; 34: 1677-80.
27. Vonkeman HE, Deleest H, van Delaar M, Vanbaarlen J, Steen K, Lems W, et al. Assessment of Helicobacter pylori eradication in patients on NSAID treatment. *BMC Gastroenterol.* 2012; doi: 10.1186/1471-230X-12-133
28. Yano S, Mizuno M, Watanabe K. Stimulatory effect of some therapeutic drugs used for improving cerebral insufficiency on gastric acid secretion in rats. *Pharmacology.* 1990; 40: 205-10.
29. Ferreira Jr M, Sahibzada N, Shi M, Panico W, Neidringhaus M, Wasserman A, et al. CNS site of action and brainstem circuitry responsible for the intravenous effects of nicotine on gastric tone. *J. Neurosci.* 2002; 22: 2764-79.
30. Pearson RJ, Gatti PJ, Sahibzada N, Massari VJ, Gillis RA. Ultrastructural evidence for selective GABAergic innervation of CNS vagal projections to the antrum of the rat. *Auton Neurosci.* 2011; 160: 21-6.
31. Strömberg E, Edebo A, Lundin BS, Bergin P, Brisslert M, Svennerholm AM, et al. Down-regulation of epithelial IL-8 responses in Helicobacter pylori-infected duodenal ulcer patients depends on host factors, rather than bacterial factors. *Clin Exp Immunol.* 2005; 140: 117-25.
32. Li Z, Li J. Local expressions of TGF-beta1, TGF-beta1RI, CTGF, and Smad-7 in Helicobacter pylori-associated gastritis. *Scand J Gastroenterol.* 2006; 41: 1007-12.
33. Bontems P, Robert F, Van Gossum A, Cadranet S, Mascart F. Helicobacter pylori modulation of gastric and duodenal mucosal T cell cytokine secretions in children compared with adults. *Helicobacter.* 2003; 8: 216-26.
34. Gallego-Sandín S, Novalbos J, Rosado A, Gisbert JP, Gálvez-Múgica MA, García AG, et al. Effect of ibuprofen on cyclooxygenase and nitric oxide synthase of gastric mucosa: correlation with endoscopic lesions and adverse reactions. *Dig Dis Sci.* 2004; 49:1538-44.
35. Wu CY, Wu MS, Chen CJ, Li MC, Lin JT, Chen GH. The interaction of H. pylori infection and NSAIDs in cyclooxygenase-2 mRNA expression in gastric antral, corpus mucosa, and gastric ulcer. *J Clin Gastroenterol.* 2005; 39: 50-5.

36. Kim JS, Kim JM, Jung HC, Song IS. Expression of cyclooxygenase-2 in human neutrophils activated by *Helicobacter pylori* water-soluble proteins: possible involvement of NF-kappaB and MAP kinase signaling pathway. *Dig Dis Sci.* 2001; 46: 2277-84.
37. Yang YJ, Chuang CC, Yang HB, Lu CC, Sheu BS. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates *H. pylori*-induced gastric inflammation by inactivating the Smad7 and NFκB pathways. *BMC Microbiol.* 2012; doi: 10.1186/1471-2180-12-38
38. Zhang X, Yang Y, Zhu R, Bai J, Tian Y, Li X, et al. *H. pylori* induces the expression of *Hath1* in gastric epithelial cells via interleukin-8/STAT3 phosphorylation while suppressing *Hes1*. *J Cell Biochem.* 2012; 113: 3740-51.
39. Russo F, Jirillo E, Clemente C, Messa C, Chiloiro M, Riezzo G, et al. Circulating cytokines and gastrin levels in asymptomatic subjects infected by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2001; 23: 13-24.
40. Bayraktaroğlu T, Aras AS, Aydemir S, Davutoğlu C, Ustündağ Y, Atmaca H, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and interleukin-8 are not increased in dyspeptic patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Mediators Inflamm.* 2004; 13: 25-8.
41. Wu CY, Wu MS, Chen YJ, Chen CJ, Lin JT, Chen GH. Influence of COX-2 and local cytokine expressions in gastric ulcer mucosa by *H. pylori* and NSAID. *Hepatogastroenterology.* 2006; 53: 797-803.