



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 OBTENCIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas utilizadas se obtuvieron del cepario de la Universidad de las Américas, Puebla. Estaban almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en medio Brucela adicionado con suero fetal bovino (SFB) y 15% de glicerol, se recuperaron 26 cepas. En la tabla 6.1 se observan las características clínicas de los pacientes con *H. pylori* de donde se obtuvieron las cepas que se resembraron en Agar Casman exitosamente.

**Tabla 6.1.** Cepas de *H. pylori* y características clínicas de los pacientes.

Cepa	Aisalada de Paciente con
5	Mucosa gástrica sin alteración
7	Gastritis crónica activa folicular
17	Mucosa gástrica sin alteración
27	Gastritis crónica levemente activa
45	Gastritis crónica superficial

### 6.2 CULTIVO DE *HELICOBACTER PYLORI*

Para la recuperación de las cepas, se mezcló un inóculo de 100  $\mu\text{L}$  de las bacterias en conservación con 100  $\mu\text{L}$  de SFB inactivado (HyClone, Cat SH30072.02) y 100  $\mu\text{L}$  de caldo Brucella (Becton Dickinson BBL, Cat 11088) en tubos eppendorf, todo en condiciones de esterilidad. Transcurrida una hora de incubación en estufa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se tomó un inóculo de 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla para sembrar en medio de Cultivo Agar Casman (Bioxon BD, Ref 224900), suplementado con sangre de caballo desfimbrinada al 10% (Apéndice A). Se adicionaron los siguientes antibióticos: 10 mg/L de Vancomicina (Sigma, B 2002) (inhibe el crecimiento de bacterias Grampositivas), 5 mg/L de Trimetoprim



(Sigma, T 7883) (inhibe de bacterias Gramnegativas) y 2 mg/L de Anfotericina B (Sigma A 4888) (evita el desarrollo de hongos) (Apéndice B).

Las placas se incubaron con 5% de O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub>, y 85% de N<sub>2</sub>, para lograr la atmósfera de microaerofilia, con sobres CampyPack Plus<sup>TM</sup> (BBL<sup>TM</sup>, Cat 271045) a 37 °C por periodos de 5 a 10 días.

La identificación se realizó a través de la morfología de colonias, tinción de Gram y pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa y ureasa positivas (Apéndice C).

### **6.3 CULTIVO DE *HELICOBACTER PYLORI* EN CALDO BRUCELA**

El cultivo de *H. pylori* en caldo, se realizó por medio de una resiembra bacteriana del medio Casman, para lo cual se utilizó el medio líquido Brucela (Becton Dickinson BBL, Cat 11088) (Apéndice A), en tubos de cultivo. Se incubó en microaerofilia a 37 °C durante 5 días. La identificación se realizó de la misma manera que en el apartado 6.2.

### **6.4 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE Y SALIVA**

Para la recolección de muestras de sangre periférica y saliva, se contó con el apoyo del Dr. Jorge Sánchez López, Jefe de los Laboratorios Clínicos de la Sociedad Española de Beneficencia de Puebla. Allí también se tipificó el grupo sanguíneo ABO. Se logró la participación de 28 personas, las cuales donaron muestras de sangre y saliva. Las personas eran aparentemente sanas y llenaron un formato para brindar información, como antecedentes de gastritis y firmaron su consentimiento para el uso de dichas muestras (Apéndice F).



Las muestras de sangre se recolectaron en tubos Vacutainer con EDTA de 10 mL (Count 02090), y la saliva se recolectó en tubos falcon de 15 mL. La tabla 6.2 presenta los datos clínicos de los donadores.

**Tabla 6.2.** Características clínicas de los donadores.

	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Fumador</b>	<b>Gastritis</b>	<b>ABO</b>
1	29	Fem	No	No	O
2	36	Fem	No	Si	O
3	44	Fem	No	Si	A
4	53	Fem	No	No	O
5	31	Fem	Si	Si	O
6	37	Mas	No	No	A
7	38	Mas	No	Si	O
8	40	Fem	No	No	O
9	33	Mas	No	No	O
10	33	Mas	No	No	O
11	32	Fem	No	No	O
12	26	Fem	No	Si	A
13	50	Fem	No	No	O
14	36	Fem	No	No	A
15	23	Fem	No	No	O
16	19	Fem	No	No	O
17	40	Fem	No	Si	O
18	30	Fem	No	Si	A
19	54	Fem	No	No	A
20	29	Fem	No	Si	O
21	38	Fem	Si	Si	A
22	45	Mas	No	No	O
23	36	Mas	No	Si	O
24	43	Fem	No	Si	A
25	48	Mas	Si	Si	O
26	45	Fem	Si	No	A
27	36	Fem	No	No	A
28	23	Fem	Si	No	A

## 6.5 IDENTIFICACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO LE

La identificación de grupo sanguíneo Lewis se realizó mediante pruebas de aglutinación de glóbulos rojos (GR) en tubo utilizando anticuerpos monoclonales anti – Le<sup>a</sup> (Tipo IgM, Lincon Labs, 3K6776) y anti – Le<sup>b</sup> (Tipo hIgM, Lincon Labs, 3G6854). La sangre se



centrifugó durante 30 minutos a alta velocidad para separar el plasma, después los GR se lavaron 3 veces con solución fisiológica de NaCl al 0.9% (SF) (Apéndice D). Una vez lavados se preparó una dilución al 5% en SF (Apéndice D). Se colocó, una gota la disolución al 5% y se agregó una gota de los anticuerpos monoclonales Le<sup>a</sup> y Le<sup>b</sup>. Los tubos se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron por 30 segundos a alta velocidad (Apéndice E). Se observó aglutinación macroscópica para identificar el grupo sanguíneo. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

## 6.6 IDENTIFICACIÓN DEL ESTADO SECRETOR Y NO – SECRETOR

La técnica utilizada para éste estudio fue la inhibición de la aglutinación. Debido a que el estado Secretor confiere la capacidad de expresar en saliva antígenos del sistema Lewis y del sistema ABO solubles (39), los reactivos utilizados para la determinación del fenotipo secretor fueron los del sistema ABO. Estos reactivos fueron: anticuerpo monoclonal anti – A (Lincon Labs, 454728ZB) y lectina anti – H (Lincon Labs, HL154 – 1) (Apéndice E). Para realizar la prueba se tituló (Apéndice E) cada reactivo con anterioridad. El título del anticuerpo fue 256 y de la lectina fue 16. El anticuerpo anti – A se usó a una dilución de 1:32 y la lectina anti – H se usó pura.

Para evitar las interacciones de los antígenos buscados con otros componentes de la saliva, ésta se congeló y descongeló de 5 a 7 veces para desnaturalizar proteínas, lisar células y romper la mucina, logrando una consistencia menos viscosa. En cada etapa de descongelación las muestras se centrifugaron a 2500 rpm a 5 °C hasta obtener un sobrenadante límpido.



Una vez titulados los anticuerpos y preparadas las muestras de saliva, se adicionó en tubos de aglutinación una gota de saliva, una gota del anticuerpo o lectina correspondiente al grupo sanguíneo ABO a la dilución estipulada y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se adicionó una gota de GR al 5%. La mezcla se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 30 segundos, para observar aglutinación macroscópica.

Para las pruebas de adhesión se prepararon *pooles* de saliva agrupados según sus fenotipos Se y No – Se, Le y ABO.

## **6.7 OBTENCIÓN DE CÉLULAS DEL EPITELIO BUCAL**

Las células de epitelio bucal se obtuvieron mediante la introducción de hisopos estériles para su recolección por roce con el epitelio. Las células obtenidas fueron frotadas en un portaobjetos para su posterior fijación.

## **6.8 FIJACIÓN CELULAR**

La fijación celular se realizó en laminillas de vidrio estériles con paraformaldehído al 3% con buffer de sales de fosfato (PBS). Las células se incubaron con la solución durante 20 minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron 4 veces con PBS (47).

Las células epiteliales bucales que se utilizaron expresaban el antígeno Le<sup>b</sup>. Todas provenían del mismo donador (grupo A) para evitar otra variable en este estudio. Se eligió ese grupo debido a que la literatura reporta que la adhesina BabA de *H. pylori* se une al antígeno Le<sup>b</sup> específicamente (35).



## 6.9 ADHESIÓN BACTERIANA

Para el estudio de la adhesión bacteriana se determinó el 100% de adhesión (100% A) enfrentando solamente las bacterias a las células fijadas. Se equiparó la dilución al enfrentarlas con las salivas con 100 mL de PBS.

Se realizó un control de saliva (CS) es decir, saliva sin antígeno, para observar el efecto de otros componentes salivares sobre la adhesión.

Por último se realizarón las pruebas de inhibición con salivas de secretores que presentaban diferentes grupos ABO y Le.

Se prepararon *pooles* de salivas tomando la misma cantidad de salivas de cada grupo para formar 5 mL de solución y se homegenizaron.

El protocolo para la medición del porcentaje de adhesión fue el siguiente, las bacterias se removieron del medio de cultivo y se lavaron 3 veces con PBS. Se preparó una suspensión bacteriana de  $100 \times 10^6$  células/mL. El 100% A se preparó a partir 100  $\mu$ L de la suspensión bacteriana con 100  $\mu$ L de PBS. La muestra homogenizada se incubó a 37 °C durante 15 minutos. Se adicionaron 100  $\mu$ L de la muestra sobre la laminilla con células fijadas y se incubó en cajas petri de plástico con un algodón humedecido a 37° C durante 15 minutos.

La muestra de CS, se preparó mezclando la misma cantidad de suspensión bacteriana y se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L del CS tratado bajo las mismas condiciones que 100% A. Las muestras de saliva con antígenos (SCA) se prepararon e incubaron en las mismas condiciones. Cada grupo se trabajó por duplicado.

Una vez incubadas las laminillas con células epiteliales fijadas y las muestras salivares de los grupos se lavaron 3 veces con PBS y se les realizó la tinción de Gram.



Se contaron 5 células por laminilla, en cada uno de los duplicados.

## 6.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo por medio del programa Excel©. Se sacaron promedios de bacterias adheridas por célula de cada uno de las 7 muestras y se realizó la prueba t de Student para muestras dependientes, con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ , es decir, 95% de confiabilidad.