



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTOS DEL ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA
EN EL EPITELIO GÁSTRICO DE JERBOS (*Meriones
unguiculatus*) DURANTE LA INFECCIÓN POR
*Helicobacter pylori***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

IBQ. MILENA SAQUI SALCES

Director de Tesis: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

MÉXICO, D. F.

OCTUBRE, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este proyecto de investigación se realizó en los Departamentos de Patología y Anatomía Patológica y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT y a la DGEP por las becas recibidas (beca No. 176706) durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Comité tutorial: Dr. Ignacio Camacho Arroyo, mentor más que tutor; Dr. Guillermo Ruiz Palacios por su apoyo y su confianza y Dr. Marco A. Cerbón por sus aportaciones siempre novedosas.

De manera muy especial al Dr. Armando Gamboa Domínguez, a quien no sólo le debo gran parte del trabajo y los conocimientos necesarios para el desarrollo de este proyecto, sino también el abrirme las puertas para conseguir mis metas. Mil gracias.

Al Dr. Arturo Ángeles Ángeles, por su apoyo y flexibilidad, sin los cuales no me hubiera sido posible lograr mis objetivos.

A Felipe, Marilú, Héctor, Gumaro, Jorge, Irma, Marisol, Brenda Marquina y David por su amistad, su tiempo, apoyo, enseñanzas y todo el trabajo que me ayudaron a sacar adelante.

A Brenda y a Tere, que adoptaron a los jerbos como suyos, no voy a poder agradecerles lo suficiente.

A todos los compañeros del laboratorio de la Facultad de Química de la UNAM y del Departamento de Patología del I.N.C.M.N.S.Z.

A Pablo. A todos los amigos que no he mencionado antes pero que siempre están, espero que sepan bien lo mucho que les agradezco.

Y como los últimos serán los primeros, a los Papas, Ale, Sari, Memo, Tere, Darío. A Milena y a Bruno, que nos enseñan lo sorprendente y frágil de la vida. Porque les debo todo y cada día me convengo que en mejor sitio no pude haber aparecido.

“...Pero nada es verdad,
y todo puede siempre serlo,
basta creerlo por un momento
y luego dejar de creerlo,
para creerlo de nuevo
y seguir creyéndolo siempre,
o no creerlo nunca más.
La verdad sólo Dios la sabe.
La de los hombres existe a condición
De que tal y como la sienten la crean.
Hoy así, mañana de otra manera...”

L. Pirandello

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1. Resumen	3
2. Abstract	5
3. Introducción	7
4. Antecedentes	
4.1. Estómago	
4.1.1. Estructura y función del estómago	7
4.1.2. Infección por <i>H. pylori</i>	10
4.1.3. Modelo de infección por <i>H. pylori</i> en jerbos	12
4.2. Hormonas esteroides	
4.2.1. Estructura y metabolismo de las hormonas esteroides	14
4.2.2. Mecanismos de acción de las hormonas esteroides	16
4.2.3. Papel de las hormonas esteroides sexuales en el estómago	20
4.3.4. Papel de las hormonas esteroides sexuales en las enfermedades infecciosas	20
4.3. Participación de las hormonas esteroides sexuales en la infección gástrica por <i>Helicobacter pylori</i>	23
5. Planteamiento del problema	25
6. Hipótesis	25
7. Objetivos	25
8. Materiales y métodos	
8.1. Animales y hormonas	27
8.2. Determinación de la colonización por <i>H. pylori</i> en heces mediante PCR	29
8.3. Obtención de los tejidos	30
8.4. Evaluación histológica	30
8.5. Determinación del índice de proliferación celular y células positivas para gastrina por inmunohistoquímica	31

8.6. Determinación de la apoptosis por la técnica de TUNEL	32
8.7. Extracción y electroforesis de proteínas totales	32
8.8. Western blot	34
8.9. Análisis estadístico	35
9. Resultados	
9.1 Confirmación de la infección	36
9.2 Actividad hormonal	36
9.3 Evaluación histológica del estómago	39
9.4 Proliferación y apoptosis	43
9.5 Células productoras de gastrina	45
9.6 Determinación del contenido de RE y RP	46
10. Discusión	49
11. Conclusiones	55
12. Perspectivas	56
13. Referencias	57
14. Artículo derivado del trabajo experimental	63

ABREVIATURAS:

ANOVA: Análisis de varianza

CTL: Control

DAB: Diaminobencidina

DNA: Ácido desoxiribonucleico

E2: 17- β -estradiol

E2H: 17- β -estradiol en dosis alta

E2L: 17- β -estradiol en dosis baja

ECL: Células enterocromafines

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético

EEM: Error estándar de la media

FSH: Hormona folículo estimulante

GABA: Ácido gamma amino-butírico

HE: Hematoxilina-Eosina

HRP: Peroxidasa de rábano

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

IHC: Inmunohistoquímica

IL: Interleucina

INF- γ : Interferón gamma

iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible

INT: Intactas

I κ B: Inhibidor de NF κ B

LH: Hormona luteinizante

LPS: Lipopolisacárido

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

NF κ B: Factor nuclear kappa B

NK: Células asesinas naturales

NO: Óxido nítrico

OVH: Ovariectomía

P4: Progesterona

P4H: Progesterona en dosis alta
P4L: Progesterona en dosis baja
PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF: Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
RE: Receptor de estrógenos
RP: Receptor de progesterona
SDS: Dodecil sulfato de sodio
SPI: Semanas post-infección
TBS: Solución amortiguadora de Tris
TDG: Tiodiglicol
Th1: Respuesta inmune tipo 1
Th2: Respuesta inmune tipo 2
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
TUNEL: Marcaje de desoxinuclétidos terminales mediante la desoxinucleotidil transferasa
VEH: Vehículo
WPI: Weeks post-infection

1. RESUMEN

H. pylori coloniza la mucosa gástrica de humanos y jerbos, induciendo gastritis y cáncer gástrico. La relación de riesgo de padecer cáncer gástrico entre hombres y mujeres pre-menopáusicas es de 2:1. Las diferencias de género en la respuesta inflamatoria en jerbos infectados con *H. pylori* también se ha observado.

Con la finalidad de investigar el papel del estradiol (E2) y la progesterona (P4) en los cambios de la mucosa gástrica inducidos durante la infección por *H. pylori*, jerbos hembra adultos fueron ovariectomizadas e infectadas con *H. pylori* cepa SS1; 7 días después de la infección, fueron tratadas por vía subcutánea con dosis bajas (L) y altas (H) de E2 (pellets de 50 y 250 µg/60 días) y P4 (pellets de 15 y 50 mg/60 días) o vehículo (VEH) y eutanizadas a 6 y 18 semanas post-infección (SPI). Jerbos hembra no ovariectomizadas e infectadas con *H. pylori* fueron empleadas como control (CTL). Se realizó la evaluación histológica, la detección inmunohistoquímica de células productoras de gastrina (células G) y el antígeno de proliferación nuclear (PCNA) para determinar proliferación y técnica de TUNEL para apoptosis. En todos los casos se contaron las células epiteliales positivas en 10 glándulas bien orientadas del antro de cada animal. Por otra parte, se determinó la presencia de los receptores de estrógenos y progesterona (RE y RP respectivamente) en el estómago de jerbos no infectados por la técnica de western blot.

Todos los jerbos en los grupos tratados con E2 mostraron gastritis aguda y/o folicular más intensa y extendida comparadas con los animales tratados con VEH mientras que los grupos tratados con P4 presentaron menos gastritis que los demás. A las 6 SPI se observó atrofia leve únicamente en los grupos tratados con P4 (20% en P4L y 50% en P4H), mientras que a las 18 SPI únicamente los grupos E2L (25%) y P4L (25%) presentaron atrofia leve y moderada respectivamente.

El índice de proliferación fue significativamente mayor en los grupos E2L y P4L comparados con VEH a 6 SPI; a 18 SPI no hubo diferencias significativas. De manera interesante, se observaron índices de proliferación significativamente menores en VEH, E2H y P4H comparados con CTL a 6 SPI.

El índice de apoptosis incrementó en los grupos tratados con hormonas comparado con VEH a 6 SPI y disminuyó significativamente en todos los grupos a 18 SPI comparado con 6 SPI, con excepción de VEH. El número de células G disminuyó en todos los animales infectados por *H. pylori* a 6 SPI. A 18 SPI, los tratamientos con E2H y P4L revirtieron este efecto.

Se determinó el contenido de las isoformas del RE y del RP en el antro gástrico del jerbo. El RE α fue regulado por el E2 y la P4. El E2 disminuyó el contenido del RP-B mientras que el tratamiento con P4 indujo un aumento en los contenidos tanto del RP-A como del RP-B.

Nuestros resultados sugieren que el E2 y la P4 modifican el perfil de inflamación de la mucosa gástrica, la proliferación y la apoptosis de las células epiteliales y el número de células G en jerbos infectados por *H. pylori*. Estos efectos podrían ocurrir a través de la interacción del E2 y la P4 con sus receptores nucleares en el estómago del jerbo.

2. ABSTRACT

H. pylori colonizes gastric mucosa in humans and Mongolian gerbils inducing gastritis and gastric cancer. The gastric cancer ratio men to premenopausal women is 2:1. Gender differences in inflammatory response in *H. pylori* infected gerbils have also been shown.

To investigate the role of estradiol (E2) and progesterone (P4) in the mucosal changes induced by *H. pylori* infection, adult female gerbils were ovariectomized and infected with *H. pylori* (SS1); 7 days after infection, they were treated with low (L) and high (H) doses of E2 (50 and 250 µg/60 days pellet) and P4 (15 and 50 mg/60 days pellet) or vehicle (VEH) and euthanized at 6 and 18 weeks post-infection (WPI). Non-ovariectomized, infected female gerbils were used as control (CTL). Histological evaluation, immunohistochemical detection of gastrin producing cells, and PCNA and TUNEL assay for determining proliferation and apoptosis were performed. Positive cells in 10 well oriented glands were counted for each animal per group. Estrogens and P4 receptors (ER and PR, respectively) presence in non-infected gerbil's stomach was studied by western blot in a separated experiment.

All gerbils in E2 treated groups showed more intense and extended acute or follicular gastritis compared to VEH, whereas P4 groups presented less gastritis than the other groups. At 6 WPI mild atrophy was only observed in P4 (20% in P4L and 50% in P4H) treated groups, while at 18 WPI, E2L (25%) and P4L (25%) groups presented low and moderate atrophy, respectively.

The proliferation index was significantly higher in E2L and P4L groups than in VEH group at 6 but not at 18 WPI. Interestingly, significant lower indexes were observed in VEH, E2H and P4H compared to CTL groups at 6 WPI.

Apoptotic index was increased by both hormones compared to VEH at 6 WPI, and significantly decreased in all groups at 18 WPI compared to 6 WPI with exception of VEH.

The number of gastrin producing cells was diminished in all groups infected by *H. pylori*, at 18 WPI, E2H and P4L treatment reverted this effect, CTL and VEH groups showed the lower numbers of gastrin producing cells.

The contents of ER and PR were evaluated in gerbil antral gastric tissue. ER α was regulated by E2 and P4 treatments. E2 treatment diminished the content of PR-B isoform whereas P4 administration increased the contents of both PR-A and PR-B isoforms.

Our results suggest that E2 and P4 modify the profile of mucosal inflammation, epithelial cell proliferation and apoptosis and gastrin producing cells number diminution in Mongolian gerbils infected with *H. pylori*. These effects could occur through E2 and P4 interaction with their nuclear receptors in the gerbil stomach.

3. INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico es la segunda causa de muerte por cáncer en México. La infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) está asociada con el desarrollo de gastritis, úlcera gastro-duodenal, adenocarcinoma y linfoma gástrico. En 1998 se informó el modelo de infección por *H. pylori* en jerbos, que ha mostrado generar con mayor frecuencia y en menor tiempo, la secuencia de cambios morfológicos observados en la mucosa vecina de carcinomas gástricos en humanos.

El riesgo de padecer cáncer gástrico es de aproximadamente el doble para hombres que para mujeres pre-menopáusicas, tendiendo a igualarse en mujeres post-menopáusicas. Se sabe que las hormonas esteroides sexuales participan en la regulación de la respuesta inmune a las infecciones bacterianas y adicionalmente, participan en la función gástrica; sin embargo, sus efectos en el desarrollo de enfermedades gástricas inducidas por *H. pylori* no se han evaluado, por lo que en este trabajo se estudió el efecto del estradiol (E2) y la progesterona (P4) sobre la respuesta de la mucosa gástrica a la infección por *H. pylori* en jerbos hembra (*Meriones unguiculatus*).

4. ANTECEDENTES

4.1. Estómago

4.1.1. Estructura y función del estómago

El estómago es un órgano que conecta al esófago con el duodeno y se divide en cardias, antro, cuerpo y fondo (Figura 1). Su principal función es la modificación de los alimentos en bolo, por las vías química y mecánica, para ser procesados en el intestino. Se compone de una capa epitelial que se origina en el endodermo y las capas de tejido muscular y conectivo, originados en el mesodermo. La pared del estómago tiene cuatro capas: mucosa, submucosa,

muscularis propia y serosa. Las capas de submucosa, muscularis propia y serosa son iguales en todas las partes del estómago (cardias, antro, cuerpo y fondo), la mucosa es la capa que las diferencia (Figura 1).

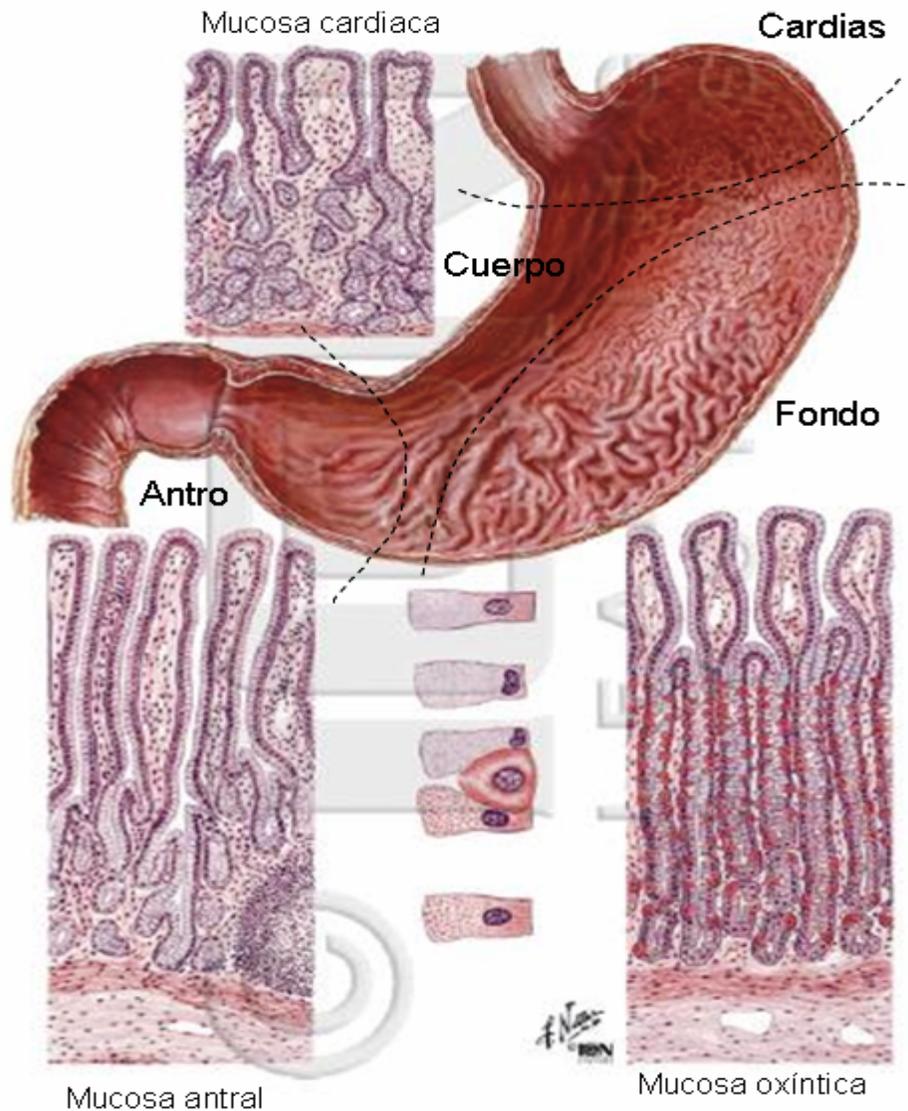


Figura 1. Las partes principales del estómago y la mucosa representativa de cada zona (Lewin et al., 1999).

La mucosa está formada por la capa epitelial y el tejido conectivo que la rodea, llamado lámina propia. La capa epitelial está formada por las foveolas y las

glándulas gástricas, la unión entre ambas es conocida como cuello (Figura 2). Las células epiteliales de la mucosa gástrica se originan en el cuello de las glándulas y se diferencian al migrar hacia la superficie de la mucosa y la base de las glándulas. Las células del cuello son multipotenciales y a partir de ellas se originan células secretoras, principales, parietales y endocrinas (Lewin y Lewin, 1999).

Histológicamente, las mucosas del fondo y del cuerpo están formadas por los mismos tipos celulares y se les denomina mucosa oxíntica. El estómago entonces tiene mucosa oxíntica (en fondo y cuerpo), cardiaca (en cardias) y antral (en antro) (Figura 1). La mucosa oxíntica es la porción secretora de ácido, las glándulas están compuestas de células principales (también llamadas zimógenas, productoras de pepsinógeno) y parietales (productoras de ácido clorhídrico y factor intrínseco), la porción endocrina consiste principalmente de células ECL (por las siglas en inglés de enterochromaffin like, productoras de histamina y otros factores) y en menor cantidad de células D (productoras de somatostatina) y células enterocromafines (productoras de serotonina) (Figura 2).

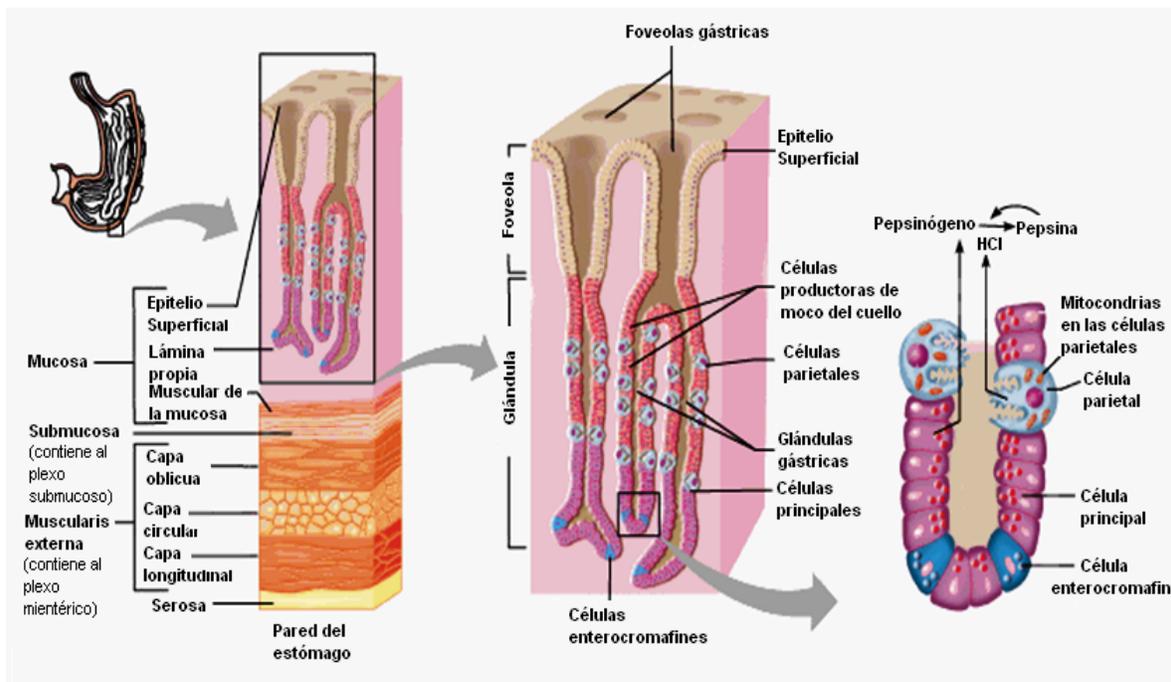


Figura 2. Estructura de la pared del estómago, glándulas y foveolas (Johnson, 2001).

La mucosa del cardias básicamente es productora de moco y la presencia de células endocrinas es casi nula. La mucosa antral tiene básicamente células G (productoras de gastrina) y algunas células D y enterocromafines, localizadas ligeramente abajo del cuello de la foveola (Hirschowitz, 1999).

En términos generales, la gastrina producida por las células G en el antro funciona como el principal regulador endocrino del estómago, induciendo la secreción de histamina por las células ECL, la cual induce la producción de ácido clorhídrico por las células parietales.

La gastrina además induce la proliferación de las células epiteliales y puede actuar directamente sobre las células parietales para estimular la producción de ácido. La liberación de gastrina es inducida por el péptido liberador de gastrina (GRP o bombesina). La somatostatina funciona como regulador de las funciones de la gastrina y es producida por las células D estimuladas por la acetilcolina liberada por las neuronas intramurales (Hirschowitz, 1999).

4.1.2. Infección por *H. pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria gramnegativa que infecta el estómago de una tercera parte de la población mundial (Tomb et al., 1997). La infección con *H. pylori* se establece inicialmente en el antro y produce inflamación (gastritis), como resultado de la producción de ureasa y toxinas, contribuyendo a la formación de las úlceras gástrica y duodenal (Blaser, 1996). *H. pylori* establece además un ambiente en el cual la proliferación celular y el daño oxidativo al DNA pueden ocurrir tanto en células epiteliales como linfoides (Naito et al., 2002).

En estudios epidemiológicos, la infección por *H. pylori* se ha asociado con el desarrollo de gastritis, úlcera gástrica y duodenal, atrofia, metaplasia, displasia, adenocarcinoma de estómago distal y linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas (MALToma) (Parsonnet et al., 1991; Wee et al., 1992; Hussell et al., 1993; Eslick et al., 1999). De hecho, *H. pylori* es catalogado como carcinógeno tipo I (I.A.R.C., 1994; Eslick et al., 1999; I.A.R.C., 2002), es decir, como suficiente para causar cáncer (Figura 3).

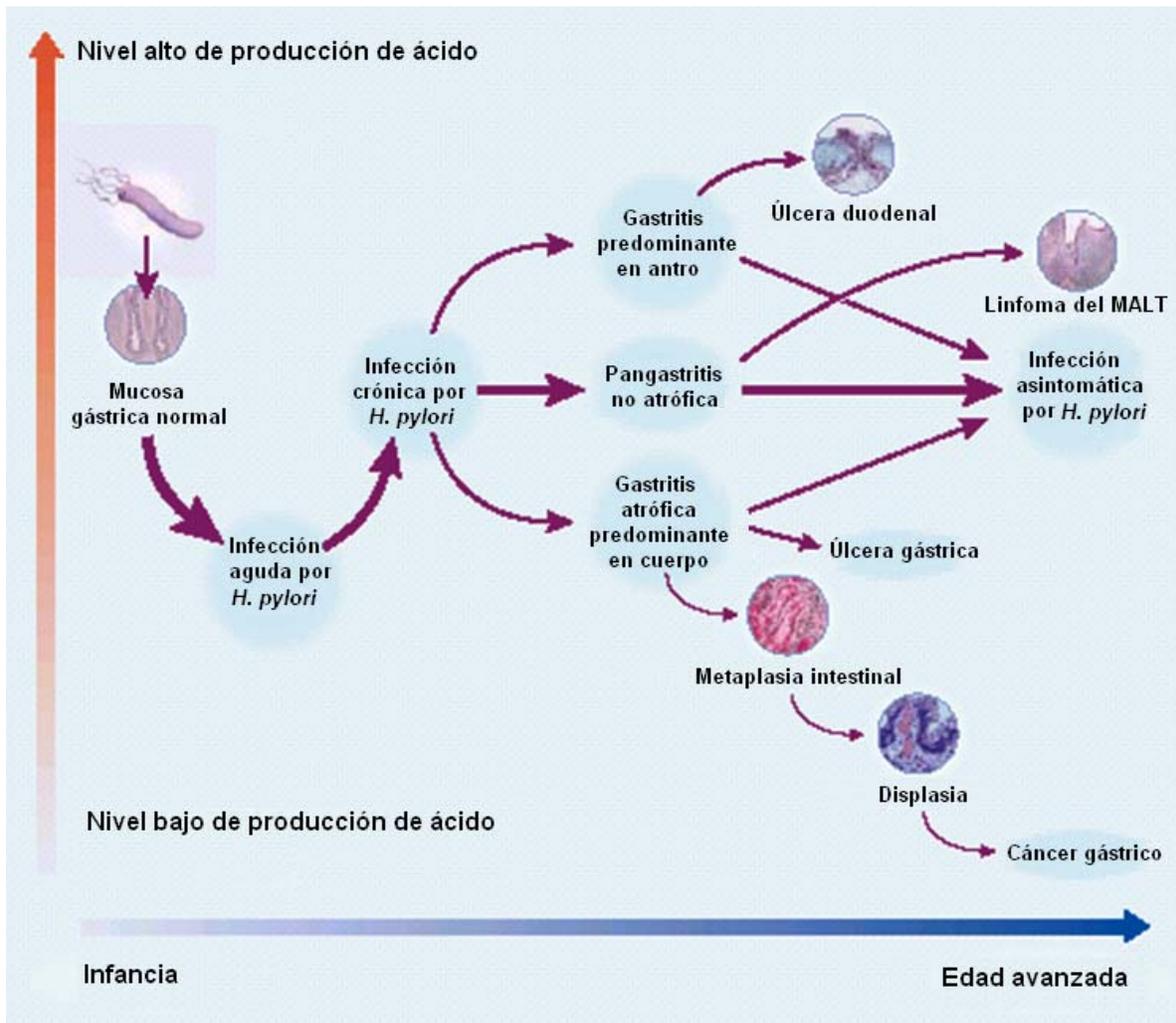


Figura 3. La infección por *H. pylori* puede permanecer asintomática o bien desencadenar diferentes enfermedades como gastritis, úlcera duodenal y gástrica, linfoma del MALT y cáncer gástrico (Blaser, 1996).

Las gastritis se clasifican de acuerdo al tipo de células presentes en el infiltrado inflamatorio en aguda y crónica; dentro de cada clasificación hay diferentes grados (leve, moderado, grave) dependiendo de qué tan internado está el infiltrado inflamatorio en la mucosa. En la escala de Sydney actualizada (Figura 4) se observan gráficamente, en el panel izquierdo, las gradificaciones para colonización por *H. pylori* y las gastritis aguda (neutrófilos) y crónica (células mononucleares); en el panel derecho se presentan las gradificaciones para atrofia

de mucosa del antro y cardias y oxíntica (cuerpo y fondo), así como la empleada para la metaplasia intestinal, lesiones todas asociadas al desarrollo de cáncer gástrico (Correa, 1992).

La gastritis aguda se refiere a la respuesta inflamatoria en etapas tempranas de infección por *H. pylori*, caracterizada por presencia de neutrófilos en la mucosa. Las gastritis se gradifican en leves (grado 1), moderadas (grado 2) o graves (grado 3) en función de la cantidad de neutrófilos infiltrantes y el nivel de internación en la mucosa, de acuerdo a la escala de Sydney actualizada (Dixon et al., 1996, 1999) (Figura 4).

La gastritis crónica se caracteriza por la presencia de neutrófilos y células mononucleares en la mucosa, y linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia, observándose la mucosa enrojecida y más gruesa de lo normal.

Se habla de gastritis crónica folicular cuando el componente inflamatorio se organiza en folículos linfoides y el grado o actividad en este caso es definido por la presencia de macrófagos en los folículos (Dixon et al., 1999).

Los cambios morfológicos de la mucosa son precedidos por alteraciones del ciclo celular epitelial caracterizadas por aumento de la tasa proliferativa y de modificaciones del estado funcional de la proteína p53 y su efector p21 (Chernova et al., 1995; Dictor et al., 1999). *H. pylori* induce apoptosis en etapas tempranas de la infección (Zhang et al., 2002) y favorece la proliferación celular en etapas tardías (Zhang et al., 2001).

4.1.3. Modelo de infección por *H. pylori* en jerbos

Con la finalidad de estudiar la carcinogénesis inducida por *H. pylori*, se han utilizado diversos modelos animales para tratar de reproducir el proceso observado en el ser humano (Marchetti et al., 1995); sin embargo, algunas especies han resultado modelos poco factibles debido a que erradican naturalmente la infección, como es el caso de la rata; o bien a que los cambios de

la mucosa gástrica son limitados, esto es, no se observan los cambios observados en humanos y rara vez tienen como resultado el desarrollo de cáncer gástrico (Marchetti et al., 1995).

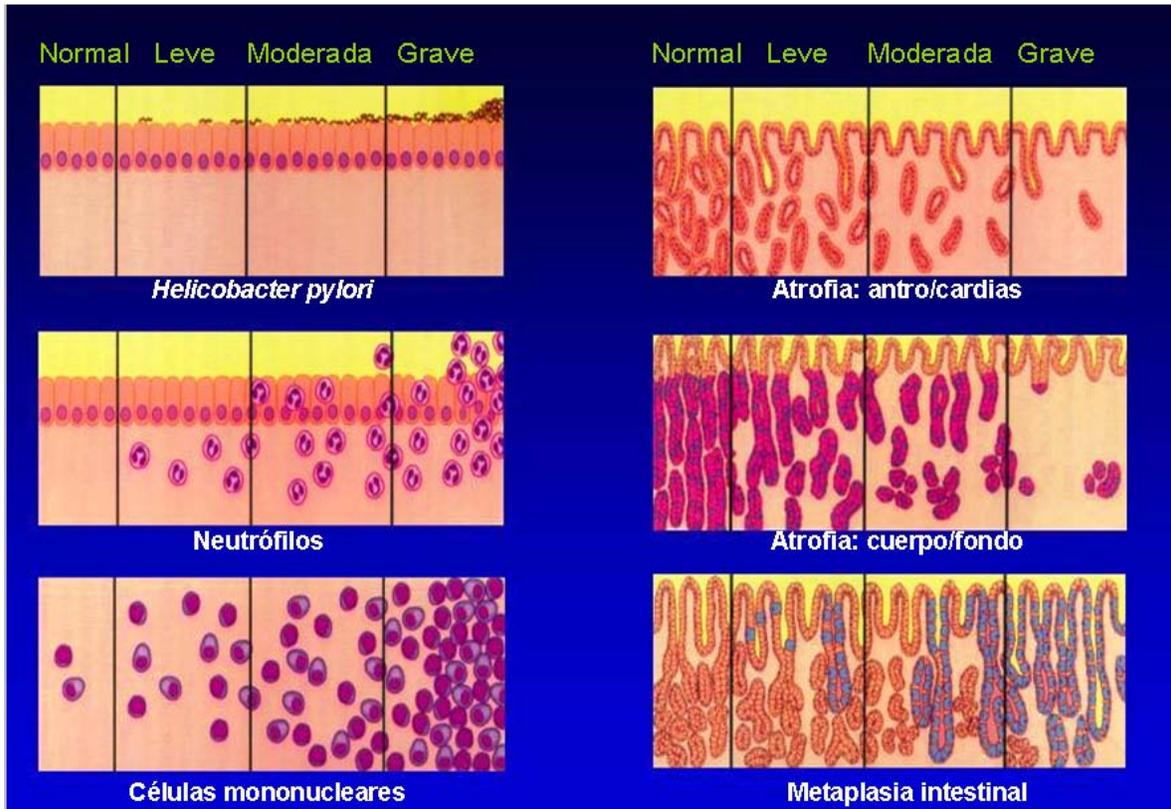


Figura 4. Escala de visual análoga de Sydney actualizada. El evaluador debe calificar la presencia de *H. pylori*, neutrófilos (gastritis aguda) y células mononucleares (gastritis crónica) como normal, leve, moderada o grave dependiendo de la cantidad observada y la localización del infiltrado con respecto al epitelio superficial. La presencia de atrofia en antro y cuerpo se caracteriza por la pérdida de las glándulas como se indica en los esquemas, mientras que la metaplasia intestinal se grafica de acuerdo a la cantidad de células productoras de moco básico (intestinalización) en la mucosa gástrica. Modificada de (Dixon et al., 1999).

En 1998 se informó el modelo de infección con *H. pylori* en jerbos, que ha mostrado generar con mayor frecuencia y en menor tiempo, la secuencia de cambios morfológicos observados, a excepción de metaplasia, en la mucosa vecina de carcinomas gástricos en humanos (Watanabe et al., 1998; Ikeno et al., 1999). En este modelo se demostró el carácter causal del *H. pylori* en el desarrollo

de adenocarcinoma gástrico (Watanabe et al., 1998; Ikeno et al., 1999; Mizoshita et al., 2005); sin embargo, recientemente se han presentado trabajos que sostienen que la clasificación de las lesiones observadas en este modelo no corresponden a carcinomas y que el número de animales que desarrollaron carcinoma es menor al reportado en los estudios previos (Elfvín et al., 2005). Esta controversia puede deberse al uso de diferentes escalas para la evaluación de las lesiones gástricas en los estudios.

En jerbos infectados con *H. pylori*, ocurre un aumento transitorio en la apoptosis en la zona del antro en la fase temprana (2-4 semanas, tiende a disminuir después de la semana 6), mientras que la proliferación de las células epiteliales presenta un aumento considerable en las semanas 16 a 20 y una disminución significativa después de las 24 semanas (Peek et al., 2000; Peek, 2002).

El modelo en jerbos ha sido ampliamente usado, originalmente en machos infectados a las 8 semanas de edad, en los que se ha identificado carcinoma gástrico después de 36 semanas de infección (Watanabe et al., 1998; Ikeno et al., 1999). En hembras infectadas a 8 semanas de edad, se identificó la presencia de adenocarcinoma gástrico después de 84 semanas de infección (Zheng et al., 2004).

4.2. Hormonas esteroides

4.2.1. Estructura y metabolismo de las hormonas esteroides

Las hormonas esteroides son moléculas lipídicas derivadas del colesterol que incluyen a las progestinas como la P4 (del latín: *pr*=a favor y *gestare*=llevar), los andrógenos, los glucocorticoides, los mineralocorticoides y los estrógenos como el E2. La P4 y el E2 de 21 y 18 átomos de carbono respectivamente, se sintetizan principalmente en el ovario (Gore-Langton et al., 1988).

La estructura química de la P4 y de sus metabolitos (derivados hidroxilados o reducidos) es la del pregnano, constituido por 21 átomos de carbono (C-21; Figura 5). La P4 se sintetiza principalmente en el retículo endoplásmico liso de las células del cuerpo lúteo del ovario, durante el ciclo menstrual (Hsueh et al., 1984; Hutchison et al., 1986); otros órganos donde también se ha demostrado su síntesis son la corteza adrenal, la placenta (Perrot-Appianat et al., 1982; Gorospe et al., 1985), el testículo (Weisz et al., 1980; Dalkin et al., 1992) y el cerebro (Ukena et al., 1999; Zwain et al., 1999). Su síntesis está regulada por numerosas hormonas como la luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), las prostaglandinas y la adrenalina (Graham et al., 1997).

La síntesis de P4 se inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona y posteriormente a P4 (Figura 5), por medio de distintas enzimas que se localizan en los tejidos u órganos anteriormente citados.

Una vez que la P4 y sus metabolitos (17-dihidroprogesterona, aldosterona, androstenediona) han llevado a cabo su función en el organismo, su catabolismo ocurre en dos etapas secuenciales:

1. La reducción en el carbono 20 lo que da lugar a la formación de 20α y 20β dihidroprogesterona (con actividad biológica, que puede ser similar o diferente a la de progesterona); posteriormente, se reduce el anillo A en los carbonos 3 y 5 dando lugar a la formación de ocho pregnandioles o pregnantrioles.
2. La reducción de los pregnandioles forma glucorónidos, lo que incrementa la polaridad de la molécula formándose así compuestos hidrofílicos que facilita su excreción por la orina.

La pregnenolona y la P4 pueden generar compuestos de 19 átomos de carbono como la androstendiona que es el precursor de la testosterona. Estos últimos, pueden ser aromatizados en el anillo A mediante la enzima P450 aromatasa formando compuestos con actividad estrogénica como la estrona y el E2. La síntesis del E2 es regulada por la FSH y LH y se lleva a cabo en el retículo endoplasmático liso en las células de la granulosa del ovario (Gore-Langton y Armstrong, 1988), en células de Sertoli y en el cerebro (Calixto Gonzalez et al., 1998).

Una vez que los estrógenos llevan a cabo sus efectos, son transformados a conjugados glucorónidos y sulfatados en el hígado y junto con otros metabolitos del colesterol son excretados en la orina (Fox, 2002).

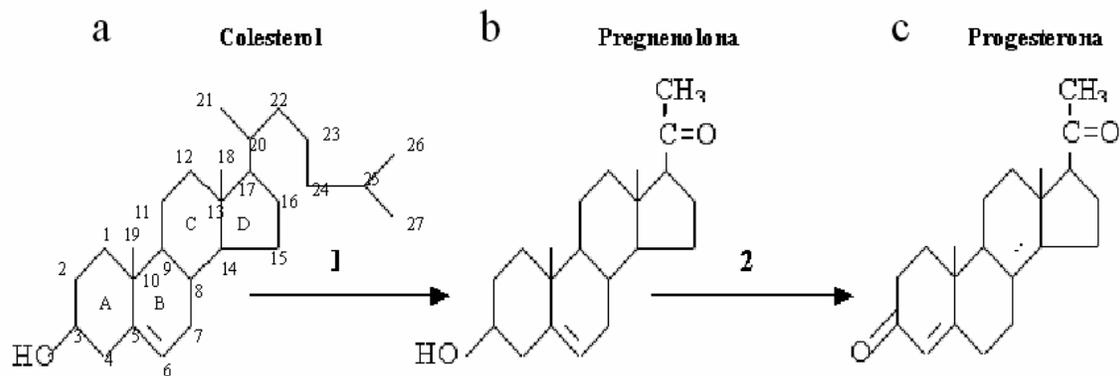


Figura 5. Biosíntesis de la P4. La biotransformación de colesterol a P4 implica tres cambios estructurales en la molécula: a) Pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17 por medio de la enzima 20,22 esteroide liasa +(1), b) la oxidación del grupo alcohol en el C-3 por medio de la enzima 3 β -OH-esteroide deshidrogenasa (2) y c) La migración del doble enlace del anillo B al anillo A) (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

4.2.2. Mecanismos de acción de las hormonas esteroides

Los mecanismos celulares mediante los cuales el E2 y la P4 puede llevar a cabo sus efectos se dividen en dos: genómico y no genómico (Bramley, 2003). El primero involucra la interacción del E2 o la P4 con sus receptores nucleares (RE y RP respectivamente) (Evans, 1988), mientras que el segundo requiere la interacción del E2 o la P4 con sitios de regulación presentes en los receptores a neurotransmisores como el GABA_A, canales iónicos, receptores de tipo tirosina cinasa y receptores de siete dominios transmembranales (Figura 6)(Camacho-Arroyo, 2003).

Los mecanismos no genómicos involucran normalmente cascadas de segundos mensajeros, algunas de las cuales incluyen a la fosfolipasa C (Civitelli et al., 1990), al calcio libre intracelular (de Boland et al., 1990) y a la proteína cinasa C (Sylvia et al., 1993). La respuesta no-genómica específica depende del tipo de esteroide, tipo celular, tejido o especie en estudio (Falkenstein et al., 2000).

En el mecanismo genómico, los receptores a hormonas esteroides actúan como factores de la transcripción para regular la expresión génica por el reconocimiento palindrómico de elementos de respuesta en el DNA después de la homo o heterodimerización del complejo ligando-receptor. La transcripción es iniciada en conjunción con el complejo de transcripción basal, diferentes coactivadores, represores y reguladores (Beato et al., 2000).

Se han caracterizado distintas isoformas para los receptores nucleares, las isoformas más conocidas del RE son α (RE α) y β (RE β), codificados por genes diferentes (Gustafsson, 1997). La proteína del RE α consta de 595 aminoácidos con un peso molecular de 66 KDa (Green et al., 1986). La proteína del RE β está constituida por 485 aminoácidos y tiene un peso molecular de 54.2 KDa. El RE β tiene homología con el RE α específicamente en el dominio de unión al DNA (95%) y el dominio de unión a proteínas de choque térmico (55%) y ambos unen con alta afinidad a los estrógenos (Kuiper et al., 1996).

Los RE α y β se han identificado en diferentes tejidos y su expresión es tejido y especie específica. Se ha sugerido que la regulación de la expresión de las isoformas del RE está basada en el uso alternativo de promotores de la expresión (Grandien et al., 1997) y condicionada por el entorno celular y la presencia de esteroides (Kraus et al., 1995).

En el útero de ratas ovariectomizadas se ha observado que la presencia de mRNA y proteína de RE α presentan una expresión basal (Gonzalez-Arenas et al., 2003; Varayoud et al., 2005). Cuando los animales son tratados con una dosis elevada de E2, se observa una disminución tanto del mensajero como de la proteína del RE α ; sin embargo, cuando se tratan con dosis bajas de E2, únicamente se observa una disminución en la proteína, más no en el mensajero del RE α , por lo que se sugiere que existe una regulación dosis dependiente de la transcripción y la traducción del RE α por E2 (Varayoud et al., 2005).

En la pituitaria de la rata, el E2 endógeno regula diferencialmente la expresión de mRNA de las isoformas de RE. El tratamiento con E2 disminuye la expresión del mRNA de RE β y de la proteína del RE α y la retroalimentación

positiva de la expresión del receptor está mediada por la presencia de gonadotropinas y prolactina (Schreihofner et al., 2000; Tena-Sempere et al., 2004).

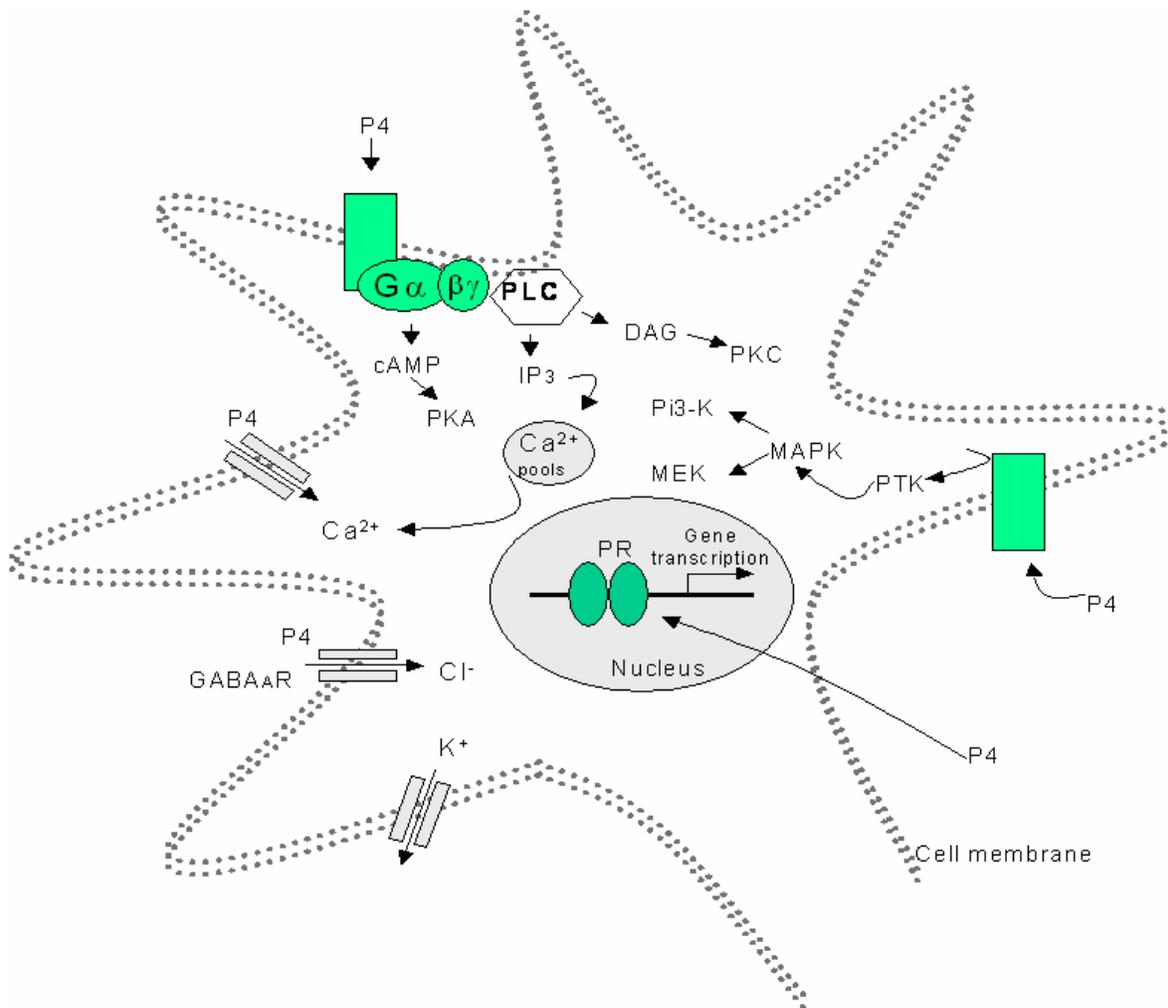


Figura 6. Mecanismos celulares de acción de la P4 y el E2. Modificado de (Camacho-Arroyo, 2003). Los efectos de la P4 y el E2 ocurren por 2 diferentes mecanismos celulares: 1) en la membrana, incluyen receptores membranales y canales, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares; 2) en el núcleo donde receptores a P4 y a E2 (RP y RE) que son moduladores directos de la expresión génica, mediante la interacción del complejo hormona-receptor con elementos de respuesta hormonal, ubicados en las regiones reguladoras de los genes blanco en el DNA. G: Proteína G, αβγ: Subunidades de la proteína G, PKA: Proteína Cinasa A, RGABA_A: Receptor a GABA tipo A, RP: Receptor a P4, PLC: Fosfolipasa C, IP3: Inositol Trifosfato, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Cinasa C, PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato, PTK: Proteína de Tirosina Cinasa, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógeno, MEK: Cinasa de MAPK, Cl⁻: Cloro, Ca²⁺: Calcio, K⁺: Potasio.

La P4 regula negativamente al RE α en el útero de rata y en tejido decidual se ha observado que, de forma concomitante, aumenta la expresión del RE β (Tessier et al., 2000; Varayoud et al., 2005).

Para el RP se han identificado dos isoformas que se han denominado A (80-94 kDa) y B (108-120 kDa). La isoforma A es la forma truncada de la isoforma B, con 164 aminoácidos menos en la región amino terminal comparado con el RP-B. Ambas isoformas se han identificado en diversas especies de roedores, primates y aves (Guerra-Araiza et al., 2000), con excepción del conejo, en el cual sólo se ha detectado la isoforma B (Loosfelt et al., 1986).

En el ser humano y en la rata, ambas isoformas del RP son codificadas por el mismo gen, pero se transcriben a partir de dos secuencias promotoras distintas, una distal (que corresponde a la secuencia promotora de RP-B) y otra proximal (que corresponde a la secuencia promotora de RP-A), que dan lugar a diferentes mRNA (Kastner et al., 1990; Kraus et al., 1993).

Las isoformas del RP pueden tener diferentes funciones dependiendo del tipo de célula, del gen blanco y del promotor (Tung et al., 1993). En muchos sistemas celulares la isoforma RP-B actúa como un activador transcripcional, mientras que el RP-A funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional mediada tanto por RP-B como por otros receptores a hormonas esteroides (Tung et al., 1993; Vegeto et al., 1993; Sartorius et al., 1994; Clemm et al., 1995).

La expresión del RP es regulada de manera positiva por estrógenos y de manera negativa por P4 en muchos tejidos blanco, como el útero y el hipotálamo (Camacho-Arroyo et al., 1994; Graham et al., 1997; Mendoza-Rodriguez et al., 1999). La regulación positiva del RP por estrógenos se debe a que en el promotor del gen de este receptor se encuentran elementos de respuesta a estrógenos (Kraus y Katzenellenbogen, 1993). En diferentes tejidos de la rata *in vivo* (Camacho-Arroyo et al., 2002; Villamar-Cruz et al., 2006) y en varios sistemas celulares *in vitro* (Lange et al., 2000; Turgeon et al., 2000; Shen et al., 2001; Lange, 2004) se ha reportado que la P4 regula negativamente a su receptor a nivel de su degradación por el proteosoma 26S.

4.2.3. Papel de las hormonas esteroides sexuales en el estómago

El estómago no se ha considerado como un órgano blanco de las hormonas sexuales; sin embargo, se ha reportado la participación de las hormonas sexuales en la función gástrica y en algunas condiciones como acidez, mareos y malestar durante el embarazo (Quinla et al., 2003).

Las células parietales del estómago (productoras de ácido) tienen actividad esteroideogénica, sintetizando P4, E2 y testosterona, así como sus metabolitos, lo que sugiere que las hormonas sexuales tienen un papel importante en la regulación del eje hepato-gástrico (Ueyama et al., 2002). Las células parietales transforman la pregnenolona en P4, testosterona y androstendiona, además pueden aromatizarlas a E2 y estrona. El E2 induce la liberación de gastrina por las células G, la producción de moco y el intercambio de células epiteliales. Se cree que el E2 producido en el estómago es procesado en el hígado (Le Goascogne et al., 1995; Ueyama et al., 2002; Ueyama et al., 2004) (Figura 7).

Los efectos de la P4 en el estómago no están bien caracterizados a la fecha, sin embargo se sabe que la P4 favorece la relajación del músculo liso de los vasos sanguíneos (Khalil, 2005) y acelera el vaciamiento del estómago (Chen et al., 1995), por lo que se le ha asociado a los malestares durante el embarazo (Quinla y Hill, 2003).

4.2.4. Papel de las hormonas esteroides sexuales en las enfermedades infecciosas

Numerosos trabajos han evaluado el efecto de las hormonas ováricas sobre el sistema inmune, especialmente en infecciones bacterianas. La mayoría de estos trabajos se enfocan principalmente a infecciones por protozoarios intracelulares y del aparato reproductivo, especialmente infecciones por *Chlamydia* y *Candida*, en los que se ha observado que la P4 incrementa la susceptibilidad a la infección vaginal, mientras que el tratamiento con E2 la reduce (Kaushic et al., 2000; Wira et al., 2000).

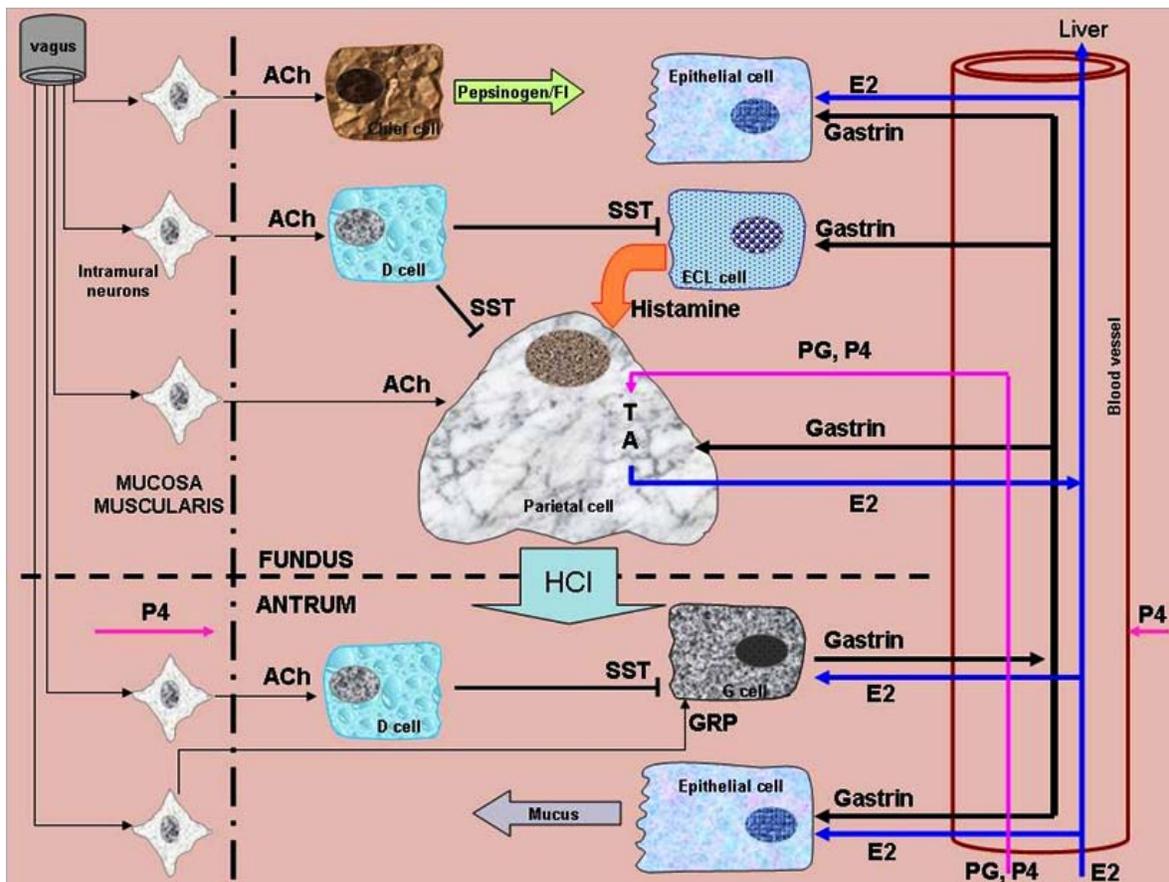


Figura 7. Papel de las hormonas esteroides sexuales en el estómago (E2: estradiol, P4: progesterona, PG: pregnenolona, T: testosterona, A: Androstendiona, ACh: acetilcolina, SST: somatostatina) (Gamboa-Domínguez, en prensa).

Un modelo en ratón para reto intraperitoneal con *Salmonella typhimurium* mostró que la P4 aumenta la respuesta inespecífica a la bacteria mediante el incremento del reclutamiento de células inflamatorias peritoneales pero sin mejorar la sobrevida, mientras que el E2 favorece la respuesta inflamatoria aguda, aumentando la sobrevida de los animales (Kita et al., 1989).

Los macrófagos expresan receptores para estrógenos y su funcionamiento está regulado por el E2, que aumenta la fagocitosis, y la producción de intermediarios de oxígeno, pero no de intermediarios de nitrógeno reactivos, los cuales se ven reducidos con E2 (Chao et al., 1994). Los macrófagos murinos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) y tratados con E2 producen menos

interleucinas (IL)-1 α , IL-6 y TNF- α , mientras que IL-10, IL-12 no se ven afectadas, y la unión de factor nuclear kappa B (NF κ B) inducida por el LPS disminuye (Deshpande et al., 1997). El E2 incrementa la actividad de linfocitos B y la producción de anticuerpos (Nilsson et al., 1994), disminuye la presencia de células T, particularmente CD8+ de varios tejidos, incluyendo las membranas mucosas genitales y el tejido linfoide del intestino (Boll et al., 1996), induciendo su apoptosis (Gold et al., 1996).

El E2 regula la respuesta inflamatoria por diferentes vías: la reducción del número de linfocitos, de la expresión de marcadores de activación como CD40, CD44, CD69, del receptor para IL-2 α (Roberts et al., 1992) y de los niveles de IL-2 e IFN- γ , así como el aumento de los niveles de IL-4 e IL-10 (Salem et al., 2000). Algunos estudios sugieren que el E2 puede, en determinadas circunstancias, promover una respuesta inmune de tipo 1 (Th1) (Fox et al., 1991).

Por otro lado, la P4 se considera antiinflamatoria, ya que reprime la respuesta inflamatoria Th1 y promueve la respuesta de Th2; el desarrollo tímico de linfocitos T se ve bloqueado por P4 (Tibbetts et al., 1999), además bloquea los canales de potasio activados por calcio, inhibiendo así la actividad de los linfocitos T (Ehring et al., 1998). También induce un factor inhibidor de células NK a partir de linfocitos T (Szekeres-Bartho et al., 1989) y aunque no afecta la expresión de los receptores a quimiocinas CCR5 y CXCR4 en linfocitos T “inmaduros”, sí disminuye su expresión en los activados (Vassiliadou et al., 1999).

La P4 disminuye los niveles de TNF- α producidos por macrófagos estimulados por LPS, elevando los niveles de I κ B, lo que sugiere que el efecto sobre TNF- α y la activación del macrófago están mediados por inhibición de NF κ B por I κ B (Miller et al., 1998). También inhibe la producción de óxido nítrico (NO) de macrófagos, probablemente mediante la reducción de expresión de iNOS cuando se estimulan con IFN- α y LPS (Miller et al., 1996).

4.3. Participación de las hormonas esteroides sexuales en la infección gástrica por *Helicobacter pylori*

El cáncer gástrico es la segunda causa de muerte por cáncer para los hombres y la cuarta para las mujeres en el mundo (I.A.R.C., 2002). Se ha observado una diferencia de género en la incidencia de cáncer gástrico: en el 2002, de acuerdo a los datos de las IARC, se reportaron alrededor de 300,500 casos en mujeres y de 603,000 en hombres, esta relación 2:1 hombre:mujer es independiente de localización geográfica o características étnicas y no se ha modificado en más de 10 años (Stemmermann et al., 2002). Sin embargo, la relación se iguala cuando se comparan hombres con mujeres posmenopáusicas (Sipponen et al., 2002; Yao et al., 2002).

La relación poblacional esperada de 2:1 hombre:mujer también se mantuvo en un estudio con pacientes inmunosuprimidos (73,076 pacientes sometidos a transplantes renal o cardíaco) con gastritis crónica causada por *H. pylori*, después de 1 a 13 años de seguimiento (Stewart et al., 1997). En una cohorte de estudio de riesgo de cáncer en Japón, se observó que las mujeres post-menopáusicas con tratamiento de reemplazo hormonal disminuyeron su riesgo de cáncer gástrico un 70% en relación a las que no lo recibieron (Kaneko et al., 2003).

El cáncer gástrico puede ser de tipo intestinal o de tipo difuso, de acuerdo a la clasificación de Padova, que es la que rige actualmente la clasificación de las lesiones y neoplasias del estómago (Rugge et al., 2000). El tipo de cáncer gástrico más frecuente entre hombres y mujeres es diferente, siendo mucho más frecuente el tipo intestinal entre hombres y el tipo difuso entre mujeres (Sipponen y Correa, 2002; Stemmermann et al., 2002).

En ratones infectados con *H. pylori*, se han observado diferencias para machos y hembras en la respuesta inflamatoria a la infección, siendo la respuesta de las hembras más intensa que en los machos (Aebischer et al., 2001), de igual manera que en la infección por *H. felis* (Court et al., 2003). Recientemente se ha observado en el modelo en jerbos infectados por *H. pylori*, que existen diferencias

de género en términos de la magnitud de la respuesta inflamatoria, siendo más intensa en hembras a las 36 semanas de infección (Crabtree et al., 2004).

En la búsqueda de los posibles mecanismos relacionados con estas diferencias, se han estudiado los efectos del E2 en la proliferación celular de líneas celulares gástricas. La presencia de receptores para E2 y P4 se ha detectado en 10-20% de los cánceres gástricos y a diferencia de otros tumores, existen evidencias de que el E2 puede suprimir el crecimiento del cáncer gástrico (Furukawa et al., 1989). Estudios *in vitro* en líneas celulares de cáncer gástrico han mostrado un efecto anti-proliferativo del E2 (Messa et al., 1999; Messa et al., 2000; Pricci et al., 2001), mientras que el efecto de la P4 no ha sido evaluado.

En ratas macho sometidas a tratamiento con el carcinógeno N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina durante 4 semanas, el tratamiento con E2 disminuyó significativamente las alteraciones inducidas por el carcinógeno en las glándulas duodenales, incrementando los niveles de mucina y gastrina en el antro (Campbell-Thompson et al., 1999).

La administración de E2 a ratas con úlcera inducida por varios métodos (fármacos, estrés, ligamiento pilórico) mostró tener un efecto anti-ulcerante, incrementando la actividad de las células parietales y manteniendo la integridad de la mucosa (Aguwa, 1984).

Crabtree y su grupo (2004) han mostrado que en jerbos hembra infectados por *H. pylori*, la expresión del RNA mensajero de INF- γ e IL-12p40 está incrementada significativamente después de 36 semanas de infección, mientras que este efecto no se observa en machos. De manera interesante TGF- β e IL-10 no muestran cambios con lo que se confirma una respuesta Th1 en las hembras.

Aunque en ratones infectados se ha observado mayor carga bacteriana de *H. pylori* en machos que en hembras (Aebischer et al., 2001), el papel del E2 y la P4 en la infección por *H. pylori* se desconoce.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La incidencia de cáncer gástrico es de aproximadamente el doble en hombres que en mujeres y el riesgo se iguala después de la menopausia. Diversos estudios han mostrado el papel clave del E2 y la P4 en la regulación de la proliferación de células epiteliales y de la respuesta inflamatoria a infecciones bacterianas; sin embargo, no se ha evaluado el papel de las mismas en la infección por *H. pylori*, considerado carcinógeno tipo I para seres humanos, por lo que en este trabajo se estudió el papel del E2 y la P4 en la respuesta de la mucosa gástrica de jerbos hembra ovariectomizadas e infectadas por *H. pylori*.

6. HIPÓTESIS

El E2 y la P4 modificarán el patrón de la respuesta inflamatoria, la proliferación y la apoptosis en las células epiteliales gástricas de jerbos hembra durante la infección por *H. pylori*.

7. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer el papel del E2 y la P4 en los cambios en la mucosa gástrica de jerbos hembra inducidos durante la infección por *H. pylori*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar el papel del E2 y la P4 en el desarrollo de gastritis en jerbos hembra ovariectomizadas e infectadas por *H. pylori*.
- b. Caracterizar los efectos del E2 y la P4 en la proliferación y apoptosis de las células epiteliales gástricas en jerbos hembra ovariectomizadas e infectadas por *H. pylori* por 6 y 18 semanas.
- c. Identificar el papel del E2 y la P4 en la presencia de células productoras de gastrina del estómago en jerbos hembra ovariectomizadas e infectadas por *H. pylori* por 6 y 18 semanas.
- d. Determinar el contenido y la regulación de las isoformas de los receptores a E2 y P4 en tejido gástrico del jerbo hembra.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Animales y hormonas

Se utilizaron hembras de la especie *Meriones unguiculatus* (jerbos), sexualmente maduras, de más de 15 semanas de vida y libres de patógenos, obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ); con agua y comida *ad libitum*; en condiciones controladas de temperatura y humedad (22°C, 85% de humedad relativa), con ciclo luz oscuridad 12 h:12 h, iniciando el periodo de luz a las 7 AM. La confirmación de ausencia de patógenos se realiza en el bioterio del INCMNSZ a solicitud del solicitante de los animales y como requisito para la realización de este estudio.

La distribución de los animales se hizo de acuerdo a la Tabla 1. Los animales de los grupos correspondientes se anestesiaron y ovariectomizaron (OVH) bajo anestesia con ketamina (8 mg/kg) y rompun (2 mg/kg) de acuerdo a los procedimientos descritos y estandarizados previamente (Cariton, 1965). Los animales permanecieron en recuperación y observación durante dos semanas posteriores a la ovariectomía antes de proceder a las manipulaciones subsecuentes.

La inoculación con *H. pylori* se realizó en ayuno de 24 horas por vía intragástrica mediante una cánula y bajo anestesia. Cada animal recibió 1 ml de suspensión de *H. pylori* (cepa SS1 estandarizada *cagA+*, *vacA+*) (Lee et al., 1997) con una concentración de 1×10^6 unidades formadoras de colonias en solución salina. Los animales en el grupo INT recibieron 1 ml de solución salina.

La confirmación de la infección gástrica se realizó mediante la identificación del gen *cag A* (gen asociado a la citotoxina) en heces, una vez por semana durante el primer mes, una vez cada cuatro semanas a partir del segundo mes y un día antes del sacrificio. Adicionalmente se realizó un análisis inmunohistoquímico (IHC) para detectar *H. pylori* en muestras de estómago como medida comprobatoria de la infección cuando la presencia de la bacteria no fue

evidente en el corte histológico. En el estudio únicamente se incluyeron aquellos animales en los que la infección pudo comprobarse por los diferentes métodos.

Tabla 1: Distribución de los jerbos en los respectivos grupos de estudio.

GRUPO	OVH	<i>H. pylori</i>	E2	P4	6 Semanas (n)	18 Semanas (n)
INT	-	-	-	-	5	5
CTL	-	+	-	-	5	3
VEH	+	+	-	-	5	2
E2L	+	+	50 µg/60 días	-	5	4
E2H	+	+	250 µg/60 días	-	4	2
P4L	+	+	-	15 mg/60 días	5	4
P4H	+	+	-	50 mg/60 días	4	*

*Este grupo no se consideró para los análisis ya que únicamente se pudo confirmar la infección en un animal. INT: Intactas, CTL: Control, VEH: Vehículo, E2L: Estradiol en dosis baja, E2H: Estradiol en dosis alta, P4L: Progesterona en dosis baja, P4H: Progesterona en dosis alta.

Los animales fueron pesados al tiempo de realizar los muestreos de heces y adicionalmente se realizaron frotis vaginales, teñidos por la técnica de Papanicolaou, en todos los jerbos, en los mismos tiempos en que se muestrearon las heces, con la finalidad de verificar los efectos de las hormonas administradas.

La aplicación de la hormona respectiva se hizo mediante el uso de los siguientes comprimidos especialmente diseñados para el experimento (Innovative Research of America, Sarasota, FL, EU):

Estradiol dosis baja (E2L): comprimido de 0.5 mg/60 días.

Estradiol dosis alta (E2H): comprimido de 2.5 mg/60 días.

Progesterona dosis baja (P4L): comprimido de 15 mg/60 días.

Progesterona dosis alta (P4H): comprimido de 50 mg/60 días.

Vehículo (VEH): comprimido con vehículo/60 días.

Los comprimidos se aplicaron de manera subcutánea mediante un trocar especialmente diseñado para este efecto. Los animales de los grupos CTL e INT fueron anestesiados y manipulados sin la aplicación del pellet.

Después de 6 y 18 semanas post-infección (SPI), todos los animales fueron eutanizados por desangrado mediante punción intracardiaca bajo anestesia con éter. Una vez eutanizados, se realizó una gastrectomía total y la remoción del útero en todos los animales. Todos los procedimientos fueron aprobados y supervisados por el Comité de Investigación en Animales del INCMNSZ.

8.2. Determinación de colonización por *H. pylori* en heces mediante PCR

Se obtuvieron heces de los animales de cada uno de los grupos en el día previo a la infección, la primera semana de infección y semanalmente durante el primer mes y cada mes durante los periodos siguientes. Las heces fueron suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y centrifugadas a 113.4 X g, se separó el sobrenadante que fue resuspendido en PBS y centrifugado nuevamente. Las muestras obtenidas del sobrenadante después de tres lavados con PBS fueron digeridas con proteinasa K durante la noche (10 µg/µl, Invitrogen, Carlsbad, CA), posteriormente fueron centrifugadas (113.4 X g, 3 min y 1260 X g, 3 min, 4°C) para obtener un paquete celular en el que se utilizó el método de extracción del DNA con fenol-cloroformo-alcohol isopropílico y el DNA purificado fue sometido a PCR utilizando iniciadores específicos para la determinación del gen *cagA*. Las secuencias iniciadoras empleadas fueron: 5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG-3' y 5'-CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA-3' (Yamaoka et al., 1999). Las condiciones del PCR fueron: 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de: 93°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto; 72°C por 5 minutos. Los productos de la amplificación se mantuvieron a 4°C hasta retirar las muestras del termociclador.

El DNA extraído de la suspensión empleada como inóculo de *H. pylori* fue empleado como control positivo; el control negativo incluyó agua estéril en

sustitución del DNA. Los productos de la reacción de PCR se separaron en geles de agarosa al 2.5% usando ϕ X174 DNA-*Hae* III o bien la escalerilla de 50 pares de bases (New England BioLabs, Beverly MA, EU) como marcador de peso molecular. El DNA amplificado fue de 352 bp.

En casos seleccionados aleatoriamente, se realizó IHC para *H. pylori* (Dako Cytomation, Denmark A/S, 1:50) en el tejido gástrico fijado como prueba confirmativa adicional.

8.3. Obtención de los tejidos

Posterior a la eutanasia de los animales, se realizó la gastrectomía utilizando material desechable en cada procedimiento para evitar contaminación. El estómago se abrió siguiendo la curvatura mayor y se realizaron cortes longitudinales que incluyeron mucosa glandular oxíntica y no oxíntica. El tejido se fijó en formol amortiguado al 4% para ser incluido en parafina y procesado para obtener preparaciones histológicas.

Se obtuvieron cortes seriados de los tejidos a los que se realizó una tinción con hematoxilina y eosina (HE) para el estudio morfológico, la técnica de TUNEL para determinar la apoptosis y la técnica de IHC para la evaluación de la proliferación celular por determinación del anticuerpo nuclear de proliferación celular (PCNA).

Los úteros fueron fijados en formol amortiguado al 4% e incluidos en parafina. Igualmente se realizaron cortes y tinción HE para la evaluación morfológica.

8.4. Evaluación histológica

Las biopsias fueron revisadas simultáneamente por dos observadores con experiencia en la evaluación de tejido gástrico de humanos y de animales, sin conocimiento de los tratamientos en el momento de la revisión.

La morfología del antro gástrico se evaluó de acuerdo a la escala visual análoga de Sydney actualizada (Dixon et al., 1996) para identificar y graduar la inflamación aguda y crónica, la atrofia y la metaplasia de tipo intestinal.

Se consideró gastritis aguda la presencia de infiltración por neutrófilos polimorfonucleares extravasculares en la mucosa antral. Se reportó como gastritis crónica la presencia de infiltrado mononuclear en la mucosa gástrica y la incidencia de gastritis crónica folicular únicamente cuando se observaron adicionalmente folículos linfoides prominentes.

8.5. Determinación del índice de proliferación celular y células positivas para gastrina por inmunohistoquímica

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica (IHC) para la detección de PCNA (clona PC10, Dako A/S, Denmark 1:150). Se utilizaron anticuerpos primarios que previamente han demostrado reactividad en tejido de jerbo estandarizado en nuestro laboratorio con las condiciones propuestas.

Brevemente, se obtuvieron cortes de 4 μm en laminillas cargadas positivamente, que se mantuvieron por 24 horas en una estufa de secado a 56°C. Los tejidos fueron desparafinados y rehidratados en baños consecutivos de xilol, alcohol y finalmente Tris. Se realizó la recuperación antigénica en solución de EDTA (10 mM) a pH 8.0 en olla de presión para microondas (1200 W) por 12 minutos. La IHC se realizó en el sistema automatizado NexES (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), empleando el sistema de detección iView DAB (Ventana Medical Systems) basado en el método de avidina-biotina-peroxidasa.

Se usaron como controles positivos la amígdala para PCNA y adenocarcinoma humano de estómago asociado a *H. pylori*. En todos los casos se tuvieron controles negativos al omitir el anticuerpo primario en el procedimiento rutinario de marcaje. También se realizó IHC en todas las muestras de estómago usando un anticuerpo policlonal anti-gastrina (Dakocytomation, Denmark A/S, 1:300) para marcar las células productoras de gastrina (células G) presentes.

Se determinó el índice de proliferación celular al contar las células epiteliales con marca nuclear para el anticuerpo PCNA en 10 glándulas bien orientadas en el antro, así como el número total de células en la glándula. El índice resulta de la relación células positivas/células totales de las glándulas contadas X 100. Los resultados se expresaron como valores promedio \pm EEM de los índices resultantes de proliferación de los animales por cada grupo.

Se determinó el número de células positivas para gastrina en 10 glándulas bien orientadas en antro de cada animal de cada grupo. Los resultados se expresaron como el promedio \pm EEM de las células positivas para gastrina de los animales por grupo.

8.6. Determinación de la apoptosis por la técnica de TUNEL

La apoptosis se determinó *in situ* utilizando la técnica de desoxinucleotidil transferasa terminal mediante marcaje de trifosfatos de desoxiuridina terminales (TUNEL) como se ha descrito previamente (Wijsman et al., 1993). Para este fin se empleó el kit Apoptag Plus Peroxidase (S7101, Chemicon Internacional, Temecula, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante, desparafinando las laminillas de la misma manera como se mencionó anteriormente y sin tratamiento de recuperación previo a la digestión proteica indicada por el fabricante.

En forma semejante al índice de proliferación, se determinó el índice de apoptosis en el antro, contando células epiteliales positivas para TUNEL. Los resultados se expresaron como valores promedio \pm EEM de los índices resultantes de apoptosis de los animales por cada grupo.

8.7. Extracción y electroforesis de proteínas totales

Para la evaluación del contenido de los receptores a E2 (RE) y P4 (RP) en el jerbo, 15 jerbos hembra sexualmente maduras (15 semanas de edad) fueron ovariectomizadas y tratadas con E2 (Sigma), E2 + P4 (Sigma) y vehículo (aceite de maíz/etanol al 10%) por vía subcutánea como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2: Tratamientos para determinar el contenido de RE y RP.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
E2	5 µg/100 µl	5 µg/100 µl	Eutanasia	
E2+P4	5 µg E2/100 µl	5 µg E2/100 µl	1 mg P4/100 µl	Eutanasia
VEH	100 µl	100 µl	Eutanasia	

n=5/grupo

Después de la eutanasia bajo anestesia con éter, se disecaron de cada animal los úteros y el antro gástrico. Los tejidos fueron congelados en nitrógeno líquido al momento de la resección y mantenidos a -82°C hasta el momento de su empleo.

Se homogenizaron los tejidos en solución amortiguadora de lisis tiodiglicol (TDG) con un cóctel de inhibidores de proteinasas (Tris-HCl 10 mM, ditiotreitól 1mM, glicerol al 30%, tritón al 1%, azida de sodio 15 mM, EDTA 1mM, leupeptina 4 µg/ml, aprotinina 22 µg/ml, PMSF 1mM, ortovanadato de sodio 1mM; para los antros se omitió el EDTA), en una relación de 1 ml de solución amortiguadora/g de tejido a 4°C.

Las muestras homogenizadas fueron centrifugadas a 15,000 rpm, durante 15 min, a 4°C y se separó el sobrenadante. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Las proteínas obtenidas de los tejidos (30 µg) se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliácridamida al 7.5% a 75 volts durante 2 horas. Cada muestra se preparó con Buffer de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercapto-etanol 5%) en un volumen 1:1 y se hirvieron durante 5 min para depositarse en los geles antes mencionados.

8.8. Western Blot.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 20 volts, durante 1 hora en una cámara semihúmeda. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5% y albúmina al 0.5% en TBS 1X.

Las membranas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos, dependiendo de la proteína que se fuera a detectar: mezcla de anticuerpo policlonal de conejo anti RP (Neo Markers, Fremont CA) y monoclonal de ratón (Santa Cruz) que reconocen a las isoformas A y B del RP a 1 $\mu\text{g/ml}$; anticuerpo policlonal de conejo anti RE- α (Santa Cruz sc-542) en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ y anticuerpo policlonal de cabra anti RE- β (Santa Cruz sc-6821) en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$.

Las membranas se lavaron con TBS-Tween (TBS (pH=7.4) +Tween 2 al 0.1%) 3 veces por 5 minutos. Para detectar al RP y al RE- α las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa en una concentración de 0.24 $\mu\text{g/ml}$ (Santa Cruz). Para detectar al RE- β , las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-cabra (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa en una concentración de 0.24 $\mu\text{g/ml}$ (Santa Cruz sc-2033). Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las proteínas estudiadas. Con este sistema, el peróxido de luminol y un potenciador con sustrato de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario reaccionan generando una señal de quimioluminiscencia que se revela al exponer las membranas a placas radiográficas.

Para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína cargada, las membranas se lavaron con glicina ácida (glicina 0.1M, SDS 0.5%, pH 2.5) toda la noche a 4 °C y 30 min a 37°C para posteriormente incubarlas con un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti- α -tubulina en una concentración de 0.5-1 $\mu\text{g/ml}$

(Sigma-Aldrich, T9026) durante 2 horas a temperatura ambiente, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 3 veces por 5 minutos; después se incubaron 1 hora con un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa en una concentración de 0.24 $\mu\text{g/ml}$ (Santa Cruz sc-2033) y posteriormente se utilizó el método de detección de alta sensibilidad descrito anteriormente.

Las placas fueron escaneadas y el análisis densitométrico se realizó empleado en programa para análisis de imagen AlphaEaseFC v.3.2.1 (Alpha Innotech Corp., San Leandro CA, USA).

8.9. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados usando ANOVA de una vía y la prueba t de Student para hacer las comparaciones entre grupos, una vez que la homogeneidad de varianzas fue probada. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó empleando el programa SPSS 12.0 para Windows.

9. RESULTADOS

9.1. Confirmación de la infección

La infección se confirmó usando la amplificación del gen *cagA* de *H. pylori* por PCR del DNA extraído de las heces recolectadas semanalmente de los animales de cada grupo durante el experimento. El producto de la amplificación se separó en geles de agarosa que mostraron una banda de aproximadamente 350 pb en todos los grupos excepto INT (Figura 8). La presencia de *H. pylori* se demostró por IHC en el tejido gástrico de aquellos animales en los cuales no se confirmó la presencia de *H. pylori* en la tinción HE. Los animales que resultaron negativos para *H. pylori* después de la revisión de la tinción HE y por IHC, pertenecientes a grupos sometidos a infección, no se consideraron para análisis posteriores (Figura 9). El grupo P4H a las 18 SPI no se presenta en el análisis debido a esta razón. No hubo diferencias significativas en peso entre los grupos durante el experimento.

9.2. Actividad hormonal

Con la finalidad de verificar la actividad hormonal, semanalmente se realizaron citologías vaginales a todos los animales. Las jebos hembra de los grupos INT y CTL (ambos no ovariectomizadas) presentaron citologías correspondientes a las diferentes etapas del ciclo estral: proestro, estro, metaestro y diestro. Los animales en el grupo E2L mostraron citologías correspondientes al estro en la mayoría de los casos, pero también correspondientes a diestro y proestro, mientras que en el grupo E2H se presentaron citologías de diestro y proestro. Los jebos hembra que recibieron tratamientos con VEH y P4 presentaron citologías correspondientes al diestro.

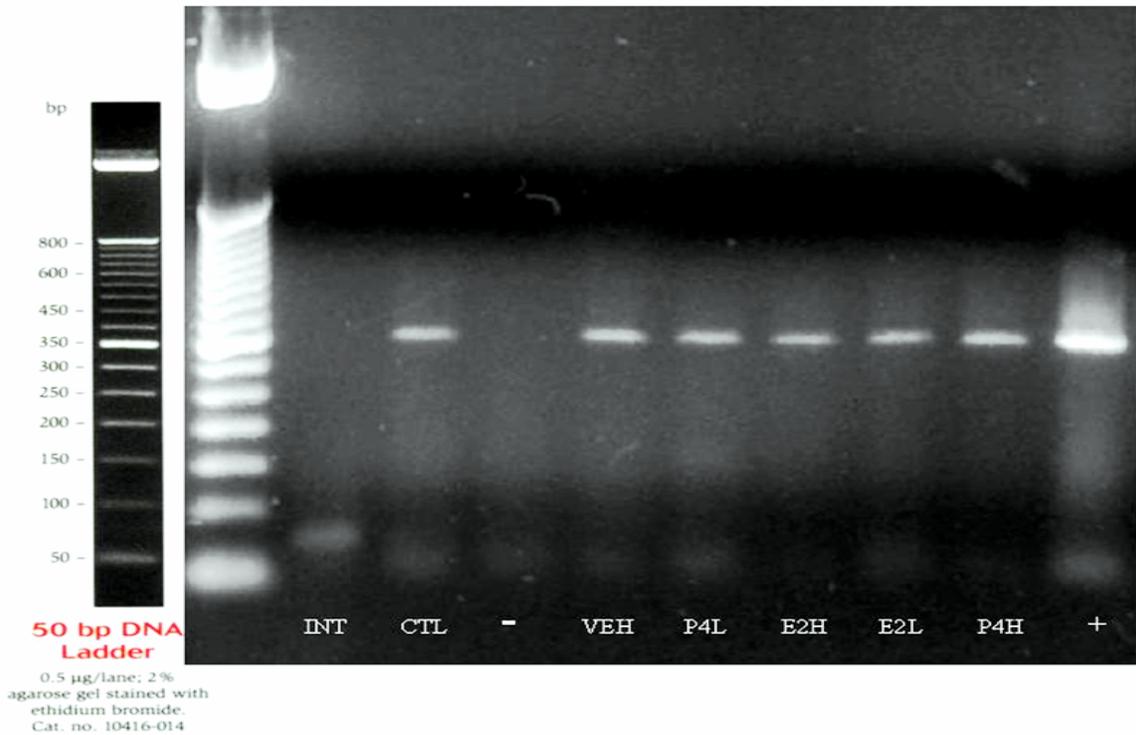


Figura 8. Confirmación de la infección por *H. pylori* por amplificación del gen de *cagA*. En la imagen se muestra un gel representativo de la determinación. Se obtuvieron a diferentes tiempos, muestras de heces de los jerbos hembra de las cuales se extrajo el DNA y se realizó PCR de acuerdo a lo indicado en los Materiales y Métodos. La imagen del gel muestra claramente la banda de 352 pb que corresponde a *cagA* para los diferentes grupos de estudio después de 5 semanas de infección por *H. pylori*. En el carril marcado “-” se adicionó agua en lugar de DNA como control negativo y en el carril marcado “+” se colocó el DNA extraído de la suspensión de inóculo empleada para infectar a los jerbos hembra.

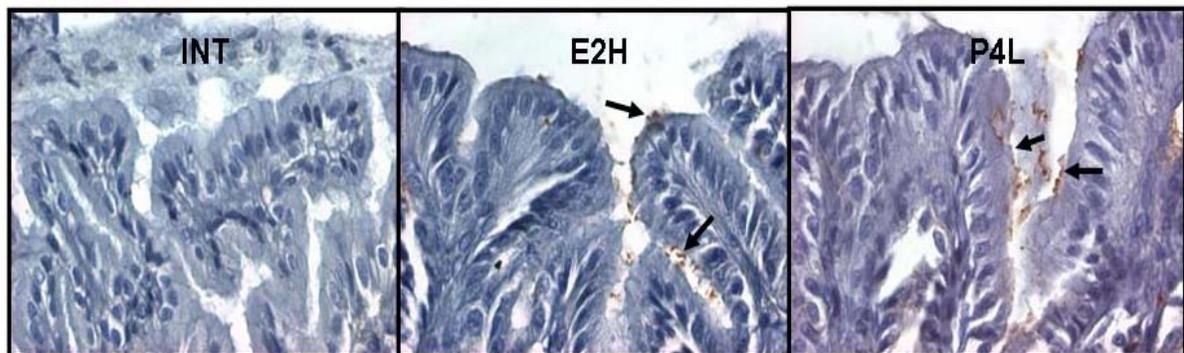


Figura 9. Imágenes representativas de determinación de la presencia de *H. pylori* por inmunohistoquímica (IHC) en la mucosa gástrica de jerbos hembra intactas (INT) e infectadas por *H. pylori* de los grupos E2H y P4L. Las flechas indican la presencia de *H. pylori* en la superficie de las células epiteliales de la mucosa gástrica. 40X.

En los grupos INT y CTL, los úteros fueron normales. Los úteros de los grupos tratados con E2 mostraron metaplasia epidermoide madura (E2L) e inmadura (E2H) con piometra (presencia de pus dentro de la cavidad del útero producida por bacterias), focal a las 6 SPI y difusa a las 18 SPI; los animales tratados con P4 y VEH mostraron atrofia intensa y úteros con engrosamientos de la capa córnea. A partir de la semana 9, no fue posible tomar frotis vaginales de los animales de estos grupos debido a la atrofia del orificio vaginal (Figura 10).

Se realizaron cultivos bacteriológicos de la piometra de los animales de los grupos tratados con E2 después de 18 SPI, encontrándose *Streptococcus intermedius* y *Pasteurella trahalosis*.

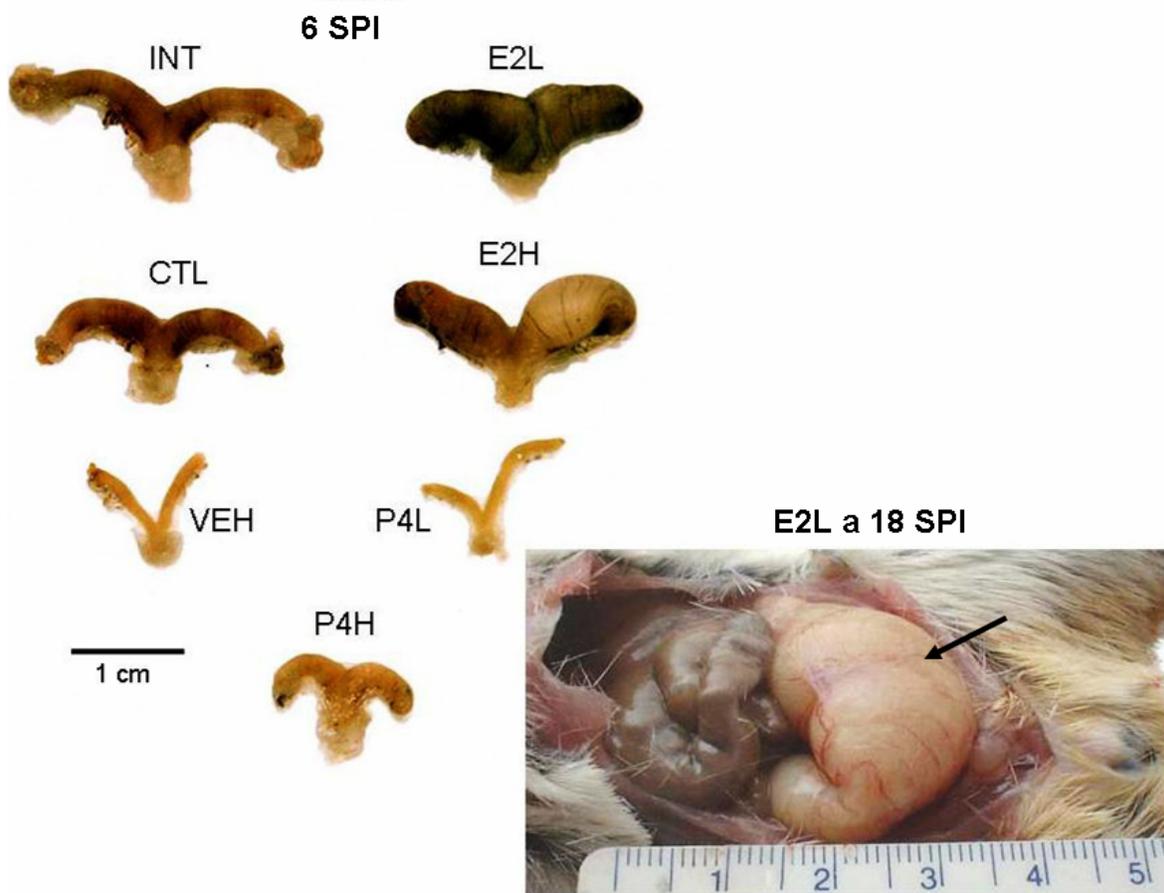


Figura 10. Úteros resecados de las jerbos hembra de los grupos de estudio a 6 SPI, en los que se observa la presencia de piometra (E2L y E2H) y atrofia (VEH, P4L y P4H). Se ilustra la hiperplasia y la piometra (flecha) observada en el grupo E2L a 18 SPI.

9.3. Evaluación histológica del estómago

Los estómagos de los jerbos fueron resecados, fijados en formol, procesados e incluidos en parafina. Se realizaron cortes seriados de 4 μ m de los estómagos, que fueron teñidos con HE y revisados por dos observadores experimentados y evaluados de acuerdo a la escala de Sydney (Dixon et al., 1996).

Los animales en el grupo INT presentaron morfología gástrica normal sin signos de respuesta inflamatoria u otro cambio notorio durante el estudio. En las figuras 11 y 12 se presentan imágenes de las lesiones observadas.

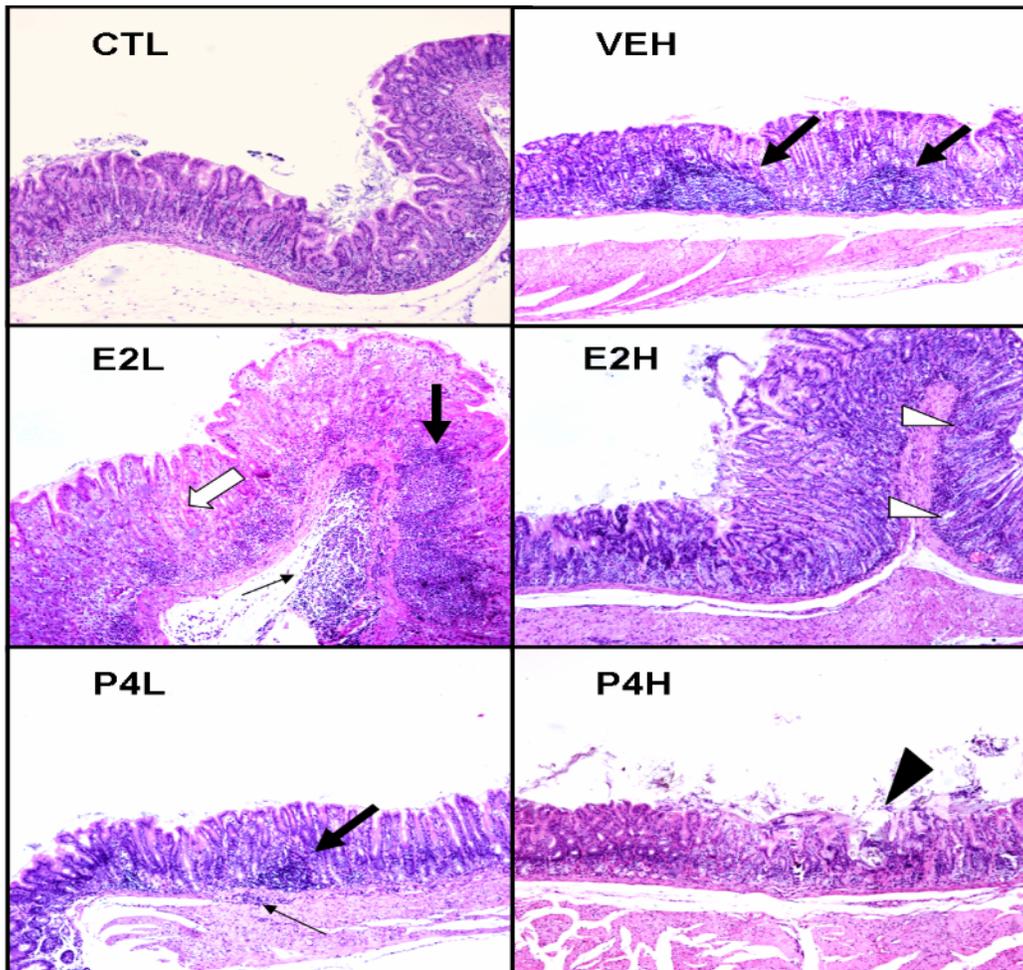


Figura 11. Imágenes representativas de algunas lesiones observadas a 6 SPI, mostrando gastritis aguda (flecha blanca), gastritis crónica (cabezas de flecha blancas), gastritis folicular (flechas negras gruesas), presencia de infiltrado inflamatorio en la submucosa (flechas negras finas) y atrofia de bajo grado (cabeza de flecha negra). Todas las imágenes a 8X.

Las gastritis observadas estuvieron limitadas al antro, sin daño en el cuerpo o fondo gástricos. Se observó gastritis aguda en todos los grupos excepto INT a 6 y a 18 SPI y P4H a 6 SPI (Figura 13). La incidencia e intensidad de la gastritis aguda incrementaron de las 6 a las 18 SPI. A 6 SPI, se observó gastritis aguda grado II (moderada) únicamente en los animales tratados con dosis bajas de las hormonas esteroides (E2L y P4L), mientras que el resto de los animales mostraron gastritis de bajo grado (grado I) (Figura 13 A).

Después de 18 SPI la intensidad de la gastritis aguda fue más alta en los grupos tratados con E2: el grupo E2L presentó gastritis aguda moderada y de alto grado (grado III); el grupo E2H mostró gastritis aguda moderada. Los grupos P4 y VEH presentaron únicamente gastritis aguda leve (grado I) y moderada (Figura 13 B).

A 6 SPI se observó gastritis crónica en todos los grupos tratados, excepto en P4H, que únicamente presentó gastritis crónica leve y E2L que mostró gastritis crónica moderada mientras que el grupo E2H presentó la incidencia más alta de gastritis crónica (Figura 14 A). En contraste, a 18 SPI, únicamente se observó gastritis crónica en los grupos CTL y P4L (Figura 14 B).

Gastritis folicular moderada (grado II) fue diagnosticada en CTL, VEH y los grupos tratados con dosis bajas de hormonas (E2L y P4L). Estos últimos también presentaron gastritis folicular de alto grado. El grupo E2L mostró la mayor incidencia de gastritis folicular a 6 SPI (Figura 14 C). A 18 SPI (Figura 14 D) todos los animales de los grupos VEH, E2L y E2H presentaron gastritis folicular, los de los grupos CTL y P4L mostraron una menor incidencia, siendo el grupo P4L el que presentó la gastritis de menor intensidad.

Los grupos tratados con E2 mostraron gastritis foliculares más extendidas en el antro que los otros grupos (Figuras 11 y 12). Se observó atrofia de bajo grado únicamente en los grupos tratados con VEH (1/5) y P4 (P4L:1/5; P4H:2/4) a 6 SPI. La atrofia observada en el grupo P4L (1/4) a 18 SPI fue moderada, mientras que el grupo E2L (1/4) presentó atrofia leve (Figura 11).

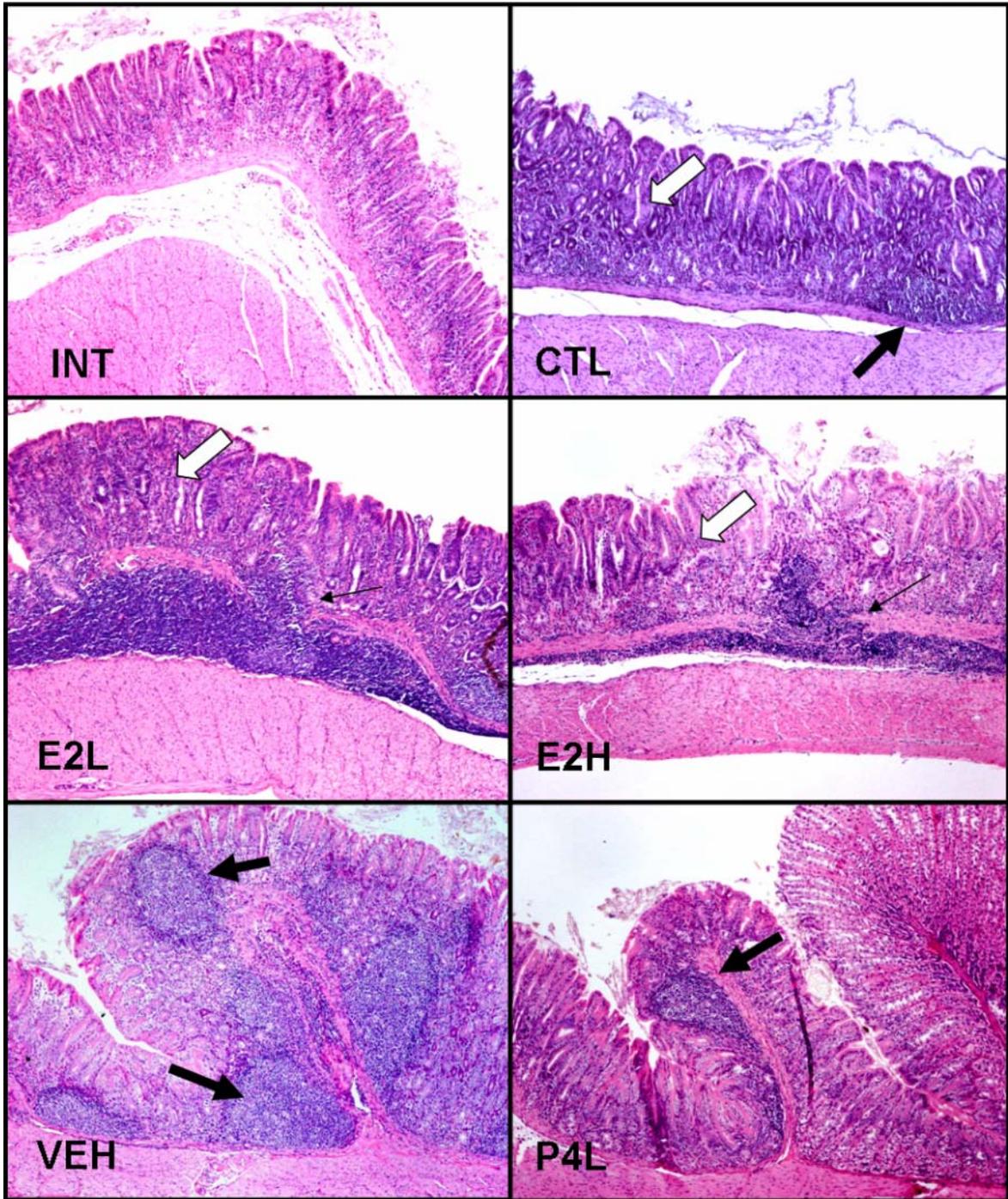


Figura 12. Imágenes representativas de algunas lesiones observadas a 18 SPI, mostrando gastritis aguda (flecha blanca), gastritis folicular (flechas negras gruesas) y presencia de infiltrado inflamatorio en la submucosa (flechas negras finas). Todas las imágenes a 8X.

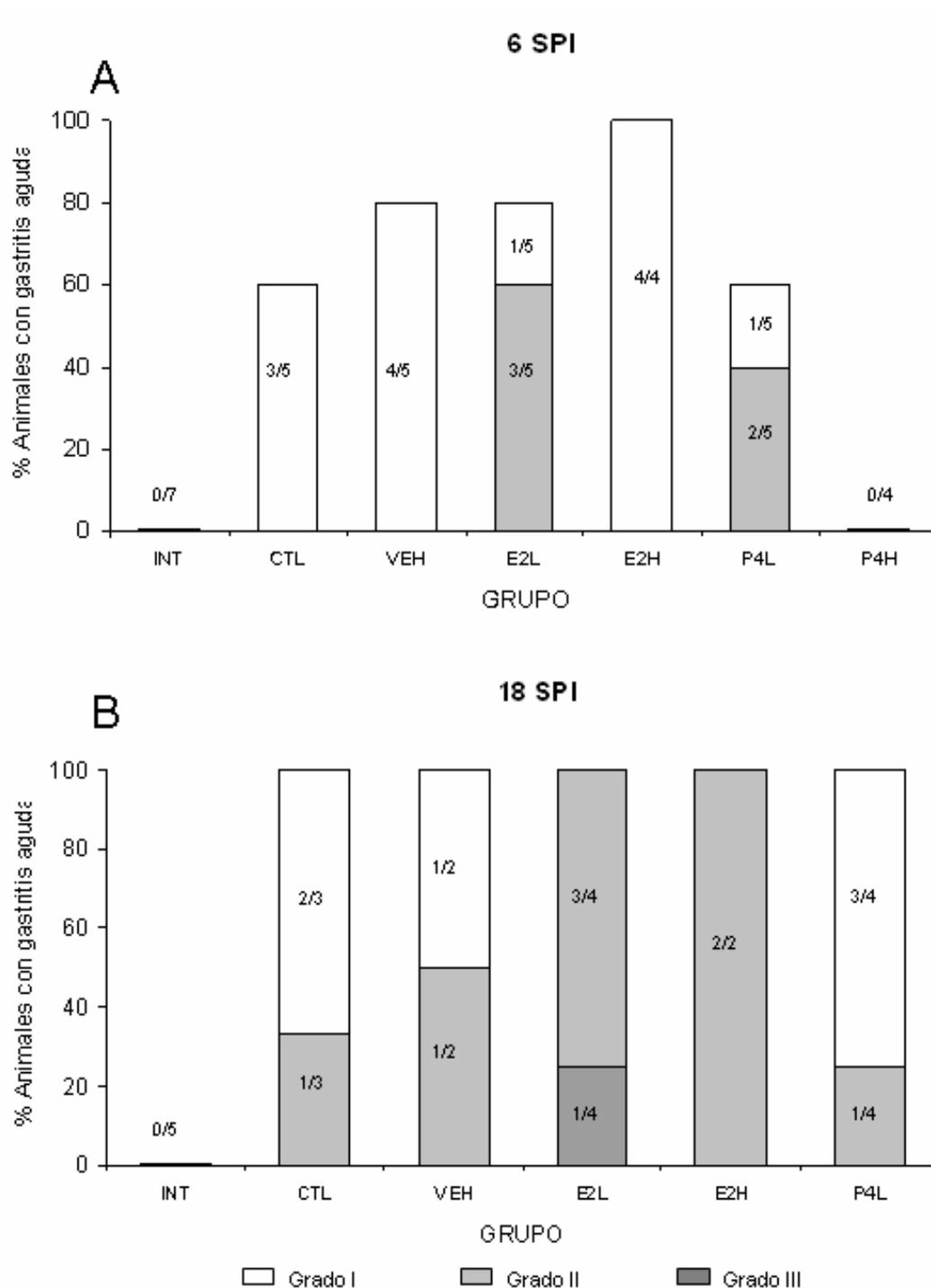


Figura 13. Incidencia de gastritis aguda en el antro de jerbos hembra ovariectomizadas tratadas con E2 o P4 después de 6 (A) y 18 (B) semanas de infección (SPI) por *H. pylori*. Los números en las barras representan el número de jerbos que presentan el grado de gastritis respectivo por grupo. La morfología fue evaluada en cortes teñidos con HE, usando la escala visual análoga de Sydney actualizada (Dixon et al., 1996).

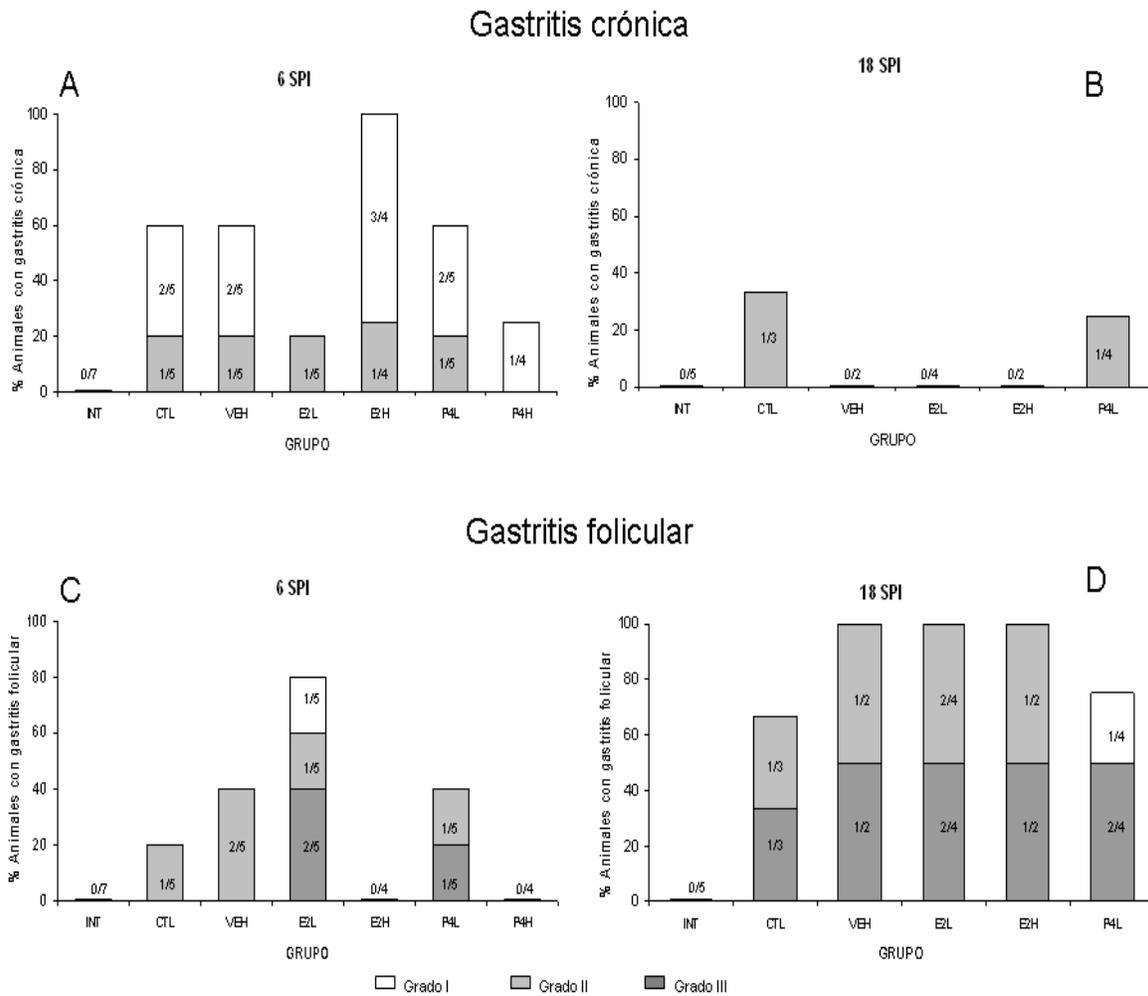


Figura 14. Incidencia de gastritis crónica (A y B) y folicular (C y D) en los antros de jerbos hembra ovariectomizadas tratadas con E2 o P4 a 6 (A y C) y 18 (B y D) semanas de infección (SPI) por *H. pylori*. Los números en las barras representan el número de jerbos que presentan el grado de gastritis respectivo por grupo. La morfología fue evaluada en cortes teñidos con HE, usando la escala visual análoga de Sydney actualizada (Dixon et al., 1996). Se consideró como gastritis folicular cuando además del infiltrado mononuclear se observó la presencia de folículos linfoides prominentes.

9.4. Proliferación y apoptosis

A 6 SPI, el grupo VEH presentó un índice de proliferación menor que el CTL ($p < 0.05$). Este índice fue más alto en los grupos E2L y P4L ($p < 0.05$) comparados con VEH. Sin embargo, las dosis altas tanto de E2 como de P4 tuvieron un efecto

similar al observado para el VEH, mostrando índices de proliferación más bajos en comparación con CTL (Figura 15).

A 18 SPI, los efectos del E2 y la P4 observados a 6 SPI no se mantuvieron: se observó una tendencia a disminuir el índice de proliferación en todos los grupos excepto E2H, comparados con los observados a 6 SPI (Figura 15).

A 6 SPI la ovariectomía disminuyó significativamente el índice de apoptosis de las células epiteliales comparadas con el grupo CTL, observándose que el tratamiento hormonal revirtió este efecto (Figura 16). Después de 18 SPI el índice de apoptosis fue aún menor en todos los grupos, excepto en el grupo VEH (Figura 16).

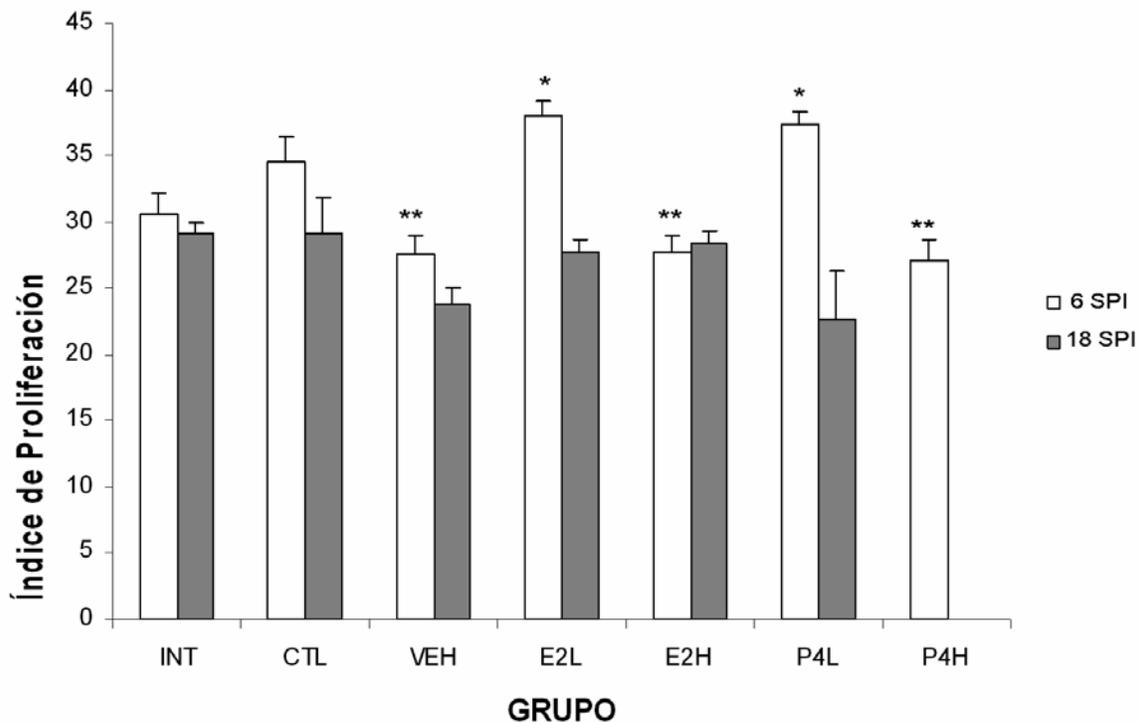


Figura 15. Índices de proliferación observados en los grupos durante el estudio. El índice de proliferación se calculó de la razón del número de células epiteliales inmunopositivas a PCNA entre el número de células epiteliales totales por glándula x100. Se contaron 10 glándulas bien orientadas por cada animal. Los datos presentados son medias \pm EEM. * $p < 0.05$ vs VEH y 18 SPI, ** $p < 0.05$ vs CTL.

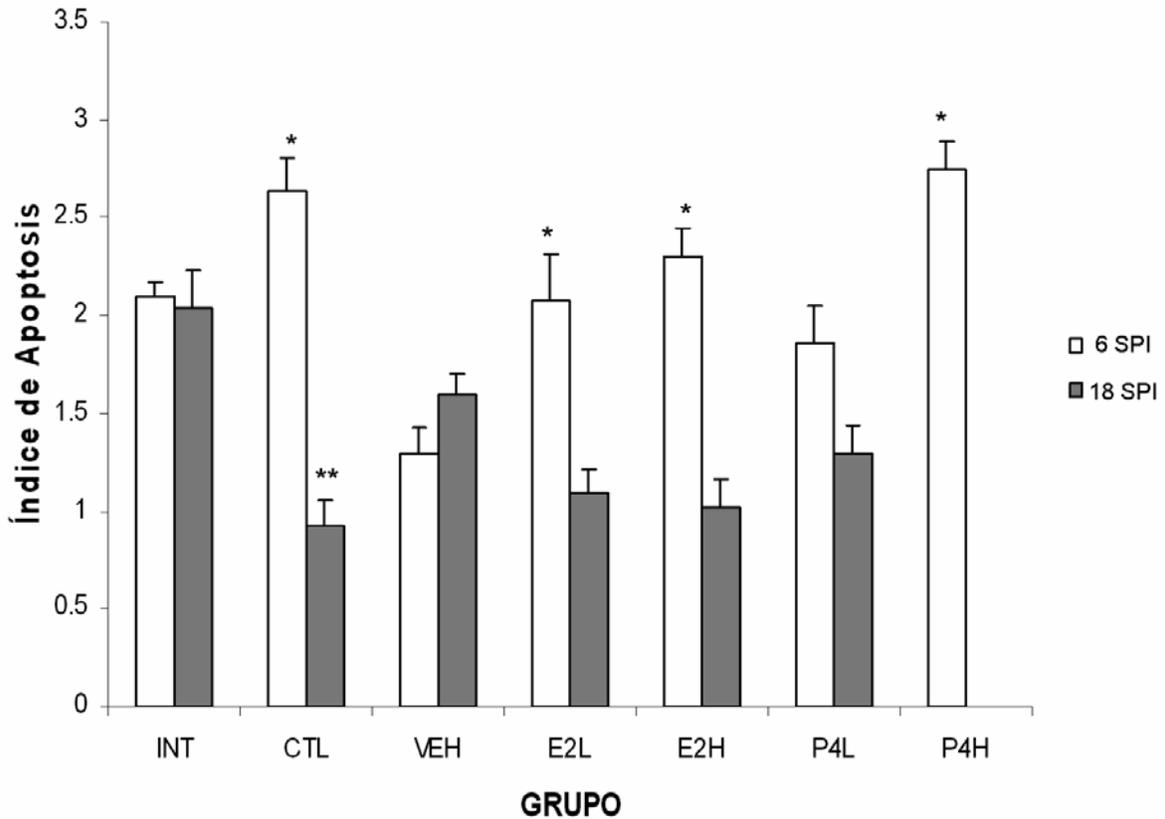


Figura 16. Índices de apoptosis observados en los grupos durante el estudio. El índice de apoptosis se calculó de la razón del número de células epiteliales positivas para TUNEL entre el número de células epiteliales totales por glándula x100. Se contaron 10 glándulas bien orientadas por cada animal. Los datos presentados son medias \pm EEM. * $p < 0.05$ vs VEH y 18 SPI, ** $p < 0.05$ vs VEH a 18 SPI.

9.5. Células productoras de gastrina

Se determinaron las células productoras de gastrina en 10 glándulas bien orientadas por jerbo (figura 17). La infección por *H. pylori* indujo una disminución del número de células G en todos los grupos comparados con los animales sin infección (INT). A 6 SPI el grupo P4H mostró el menor número de células G, significativo comparado con VEH.

A 18 SPI se observó una disminución en el número de células G en los grupos CTL y VEH comparados con sus respectivos valores a 6 SPI. Los

tratamientos con E2 y P4 revirtieron el efecto de disminución del número de células, siendo similares al CTL para E2H y P4L (Figura 17).

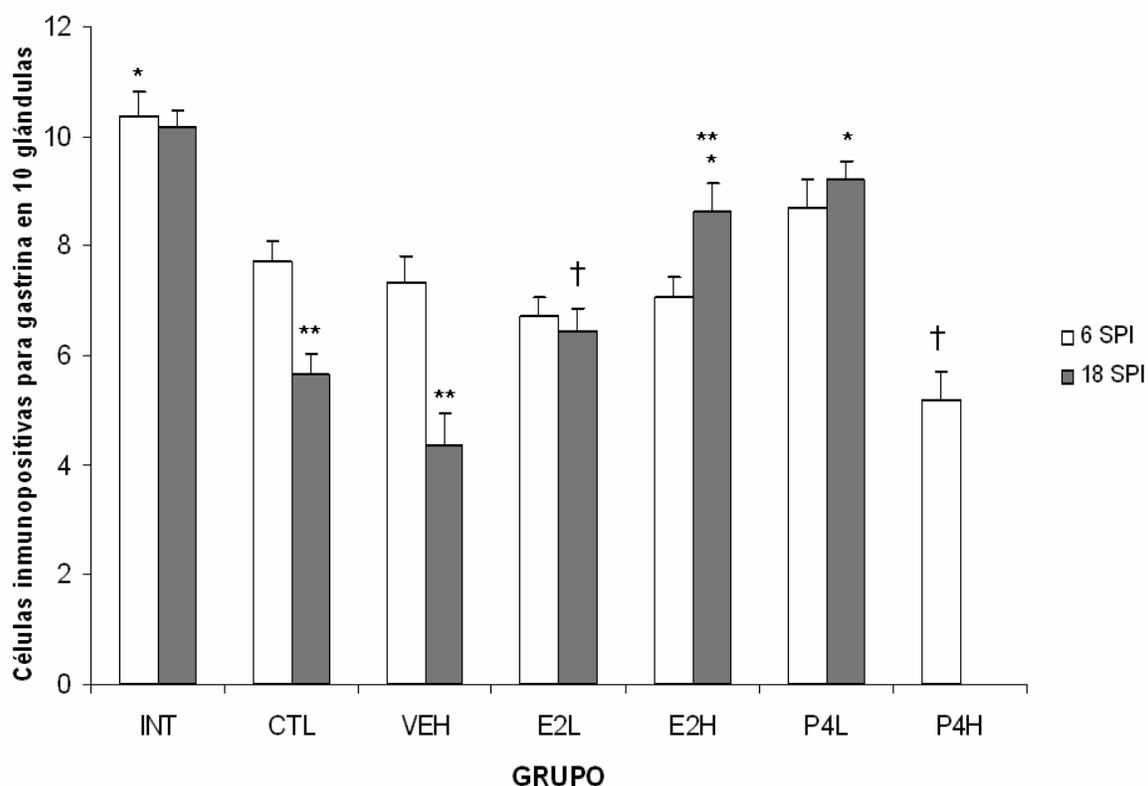


Figura 17. Células inmunopositivas para gastrina en 10 glándulas del antro de jerbos hembra ovariectomizadas tratadas con E2 o P4 después de 6 y 18 semanas de infección (SPI) por *H. pylori*. Se contaron las células positivas en 10 glándulas bien orientadas por cada animal. Los datos se presentan como medias \pm EEM. † $p < 0.05$ vs VEH, * $p < 0.001$ vs VEH, ** $p < 0.001$ 6 SPI vs 18 SPI.

9.6. Determinación del contenido del RE y RP

De acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, se determinó el contenido de RE α , RE β , RP-A y RP-B en el útero (como control positivo de un tejido hormono-regulado, no se muestran los datos) y en el antro gástrico de jerbos hembra ovariectomizadas y tratadas con VEH, E2 y E2+P4.

De la detección del RE α en el antro de jerbos hembra ovariectomizadas, se obtuvo una banda de 68 KDa y se observó que el RE α es regulado a la baja por E2 y P4 (Figura 18). La isoforma β del RE no fue detectada en los tejidos estudiados en el jerbo debido posiblemente, a que no hubo reacción cruzada del anticuerpo policlonal de cabra anti-RE β (Santa Cruz sc-6821) utilizado en el experimento con los tejidos del jerbo.

La detección de las isoformas del RP en el antro mostró dos bandas, una de ellas de 85 KDa correspondiente a la isoforma RP-A y la otra de 123 KDa que corresponde a RP-B. En ausencia de E2 y P4, el RP-B se expresa más que el RP-A en el antro de jerbos hembra ovariectomizadas. El E2 no tuvo efectos significativos sobre la expresión del RP-A; sin embargo, disminuyó la expresión de RP-B. El tratamiento con P4 aumentó la expresión tanto de RP-A como de RP-B (Figura 18).

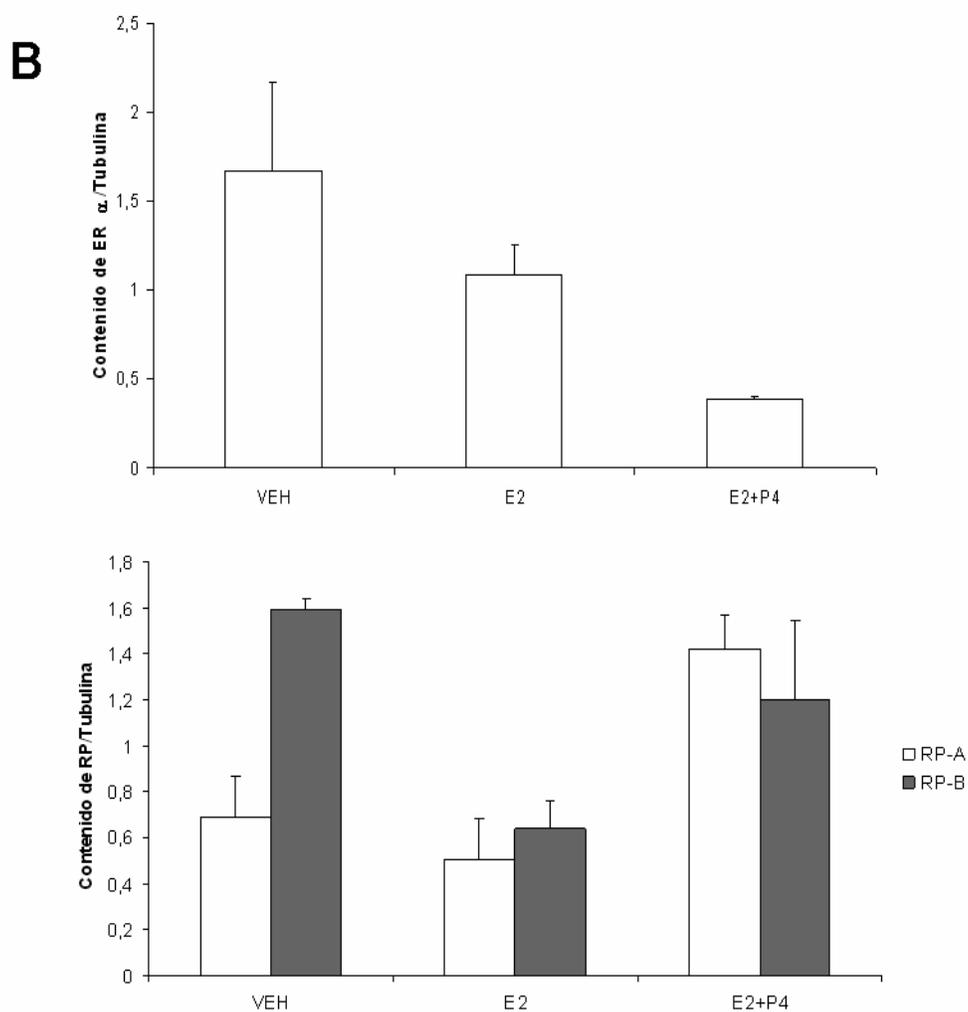
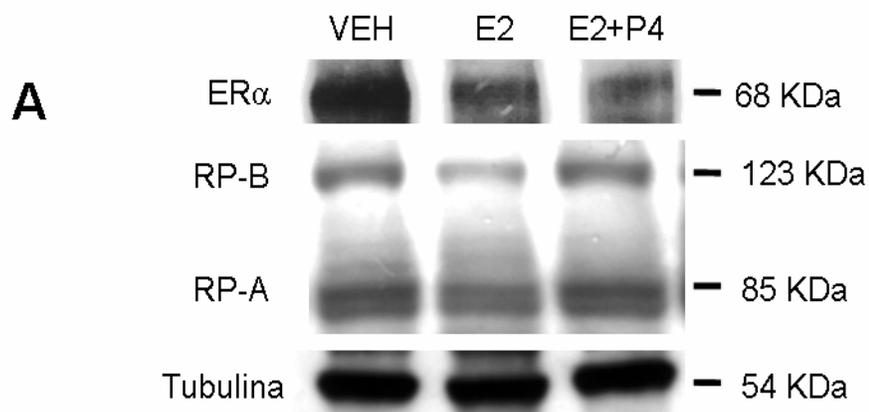


Figura 18. Contenido de RE , RP-A y RP-B en el antro de jebos hembra ovariectomizadas y tratadas con E2 y P4. En A se muestra un blot representativo de la detección de los receptores. En B se presenta el análisis densitométrico de los cambios en el contenido de RE y RP (media \pm EEM). Los datos fueron normalizadas con el contenido de tubulina (n=5).

10. DISCUSIÓN

El jerbo es el modelo más usado actualmente para estudiar la patogénesis gástrica inducida por *H. pylori*, sin embargo sólo en fechas recientes se han realizado estudios en hembras (Fox et al., 1999; Crabtree et al., 2004; Zheng et al., 2004); de hecho, este es el primer estudio que evalúa los efectos de las hormonas esteroides sexuales en la infección por *H. pylori*.

Los niveles de las hormonas sexuales en los jerbos no se han reportado hasta la fecha, por lo que las dosis empleadas en este estudio están basadas en determinaciones realizadas en nuestro laboratorio (datos no mostrados), donde se observaron niveles similares a los de las ratas durante el ciclo estral, por tanto, las dosis de las hormonas se determinaron de acuerdo a las concentraciones más alta y más baja de E2 y P4 en el ciclo estral de la rata.

Prácticamente todos los estudios de patogénesis gástrica inducida por *H. pylori* se llevan a cabo infectando jerbos machos de 8 semanas de vida. Los jerbos hembra alcanzan la madurez sexual entre las semanas 9 y 12 de edad, presentando ciclos regulares después de las 14 semanas de vida. Ohkusa et al. observaron que en la infección de jerbos machos de 5 y 14 semanas de edad con *H. pylori*, se presenta una respuesta diferencial de duodenitis y metaplasia gástrica después de 12 semanas de infección, dependiendo de la cepa de *H. pylori* empleada (Ohkusa et al., 2003).

El modelo de infección por *H. pylori* en ratones reveló diferencias de género asociadas al desarrollo de cáncer gástrico y los cambios asociados en la mucosa, mostrando que únicamente los machos presentaron cáncer y desarrollaron lesiones gástricas más severas y tempranas que las hembras (Fox et al., 2003), lo que sugiere un dimorfismo sexual en la respuesta a la infección por *H. pylori*.

Crabtree y su grupo infectaron jerbos machos y hembras intactas, de 6 a 8 semanas de edad con la cepa SS1, la misma empleada en nuestro estudio, y

observaron inflamación más severa en las hembras comparadas con los machos después de 36 semanas de infección (Crabtree et al., 2004).

Las lesiones gástricas inducidas por *H. pylori* se consideran procesos lentos y la mayoría de los estudios incluyen tiempos prolongados de infección. Nuestro estudio se restringió a la infección temprana debido a que nos interesó seguir desde las primeras fases de la infección los efectos del E2 y la P4 y a la presencia de hiperplasia grave y piometra uterinos en los animales tratados con E2 a 18 SPI.

En nuestro estudio, se observó un patrón de respuesta diferente a la infección por *H. pylori* en jerbos hembra ovariectomizadas y tratadas con E2 o P4. Se observó una respuesta inflamatoria más intensa y difusa en los grupos tratados con E2, tanto a 6 como a 18 SPI, mientras que la menor incidencia de gastritis aguda de alto grado, se presentó en los animales tratados con P4.

Se observó gastritis crónica a 6 SPI en más del 50% de los jerbos de los grupos CTL, VEH, E2H y P4L y en 25% o menos en E2L y P4H. Los animales tratados con P4 presentaron el menor grado de gastritis crónica. A 18 SPI, la gastritis crónica se observó únicamente en el grupo CTL y en un animal del grupo P4L, sin embargo, se presentó gastritis folicular en todos los grupos, siendo más extensa e intensa en los animales tratados con E2.

Los efectos de las hormonas sexuales en la respuesta inflamatoria se han estudiado en humanos y en diferentes modelos animales (Kita et al., 1989; Kaushic et al., 2000); el E2 se considera pro-inflamatorio, induciendo una respuesta de tipo Th1. El perfil de respuesta Th1 generalmente se asocia con la infección por *H. pylori cagA+* y desarrollo de gastritis, mientras que el perfil Th2 es considerado protector para el hospedero y auxiliar en el control de la infección (Mohammadi et al., 1997) y se ha sugerido que el desarrollo de una respuesta cooperativa Th1/Th2 es necesaria para el desarrollo de folículos linfoides secundarios en la mucosa gástrica (Uchida et al., 2001). Es interesante notar que en macrófagos murinos estimulados con lipopolisacáridos (LPS), el E2 disminuyó la producción de IL-1 α , IL-6 y TNF- α , así como la unión LPS-NF κ B (Deshpande et al., 1997); estos efectos del E2 en la respuesta inflamatoria pueden inducir una

incidencia alta e intensa de gastritis folicular, como la observada en los jerbos tratados con E2 (Figuras 12 - 14).

Se ha descrito que la P4 promueve la respuesta de tipo Th2 y juega un papel regulador en el proceso inflamatorio mediante el decremento de los niveles de mRNA y proteína de TNF- α en macrófagos murinos tratados con LPS y elevando los niveles de I κ B (Miller y Hunt, 1998), que actúa como represor de NF- κ B en la infección por *H. pylori* (Maeda et al., 2002). Estos efectos de la P4 sobre la respuesta inmune, induciendo un perfil Th2 podrían estar relacionados con los grados de gastritis más bajos observados en este estudio, especialmente en los grupos infectados por *H. pylori* y tratados con la dosis alta de P4.

En nuestro estudio, observamos que el tratamiento con E2 estuvo asociado con la inducción de proliferación de las células epiteliales en la infección temprana (6 SPI) y una reducción de la proliferación en la infección sub-aguda (18 SPI). Esta modificación de la proliferación de las células epiteliales puede deberse a alteraciones en el ciclo celular que modifiquen el balance entre la proliferación y la apoptosis de las células del epitelio gástrico, y pueden estar relacionadas la inhibición de la secreción de gastrina y ácido inducidos por el E2, en combinación con las alteraciones en los niveles de gastrina inducidas por la infección por *H. pylori* (Peek et al., 2000; Campbell-Thompson et al., 2001).

Aunque la información sobre los efectos del E2 y la P4 sobre el tejido gástrico es escasa, los efectos de las hormonas sobre la proliferación y la apoptosis del epitelio gástrico observados en nuestro estudio pueden relacionarse también con lo reportado en estudios previos *in vitro* en diferentes líneas celulares de cáncer gástrico (Messa et al., 1999; Messa et al., 2000; Pricci et al., 2001) que sugieren que el E2 podría activar a la caspasa-3 e inducir el arresto en G2/M de las células de carcinoma gástrico (Lin et al., 2001).

Campbell-Thompson et al. trataron de manera crónica a ratas Sprague Dawley con E2 y el carcinógeno N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina, observando que el E2 moduló los cambios en las glándulas gástricas e incrementó los niveles de gastrina en gránulos de almacenamiento; sin embargo, no tuvo efecto sobre los

índices de proliferación y apoptosis observados en presencia del carcinógeno (Campbell-Thompson et al., 1999). Nuestras observaciones sobre la inducción de la proliferación y la apoptosis por el E2 no están de acuerdo con este estudio previo, ya que observamos un incremento en la proliferación y la apoptosis, en el número total de células epiteliales por glándula (datos no mostrados) y en el número de células G en los animales tratados a 6 SPI. La divergencia puede estar relacionada con las diferencias intrínsecas entre el modelo de carcinogénesis química y la inducción de cambios en la mucosa gástrica inducidos en la infección temprana por *H. pylori*.

En nuestro estudio, observamos un aumento del número de células G con el tratamiento con el E2 y la P4, casi alcanzando, en el caso del grupo tratado con P4 a la dosis baja, el número de células G de la mucosa de jerbos hembra intactas, no infectadas. La infección por *H. pylori* induce hipergastrinemia en diferentes etapas del proceso infeccioso que puede estar asociada a la variación en el número de células G presentes en la mucosa (Blaser, 1996; McColl et al., 2000; McColl et al., 2000). Se ha reportado que el número de células G presentes en la mucosa gástrica en humano infectados por *H. pylori* no es diferente al de individuos sanos (Sirigu et al., 1993); sin embargo, recientemente Wang y su grupo reportaron que en ratas, el número de células G y la cantidad de gastrina en suero disminuyó en presencia de úlceras inducidas por métodos químicos (Wang et al., 2006). Nuestros datos sugieren un papel protector del E2 y la P4 en el número de células G presentes en el antro de jerbos hembra infectadas por *H. pylori*. Es necesario evaluar dicho efecto también en los niveles de gastrina y en periodos largos de infección.

El índice de apoptosis en nuestro estudio se redujo en el grupo VEH a 6 SPI comparado con todos los otros grupos y se incrementó significativamente en los grupos tratados con E2 y en el grupo P4H. Los índices de apoptosis fueron similares al CTL en todos los grupos hormonales a 18 SPI, mientras que se presentó significativamente mayor para el grupo VEH.

Los efectos de la P4 en la proliferación y apoptosis de las células epiteliales gástrica no son claros, pero algunos estudios han definido en general un papel protector de la P4 en la ulceración gástrica inducida por diferentes factores en humanos, especialmente durante el embarazo (Lanciers et al., 1999) y en modelos animales (Aguwa, 1984; Montoneri et al., 1997; Machowska et al., 2004).

Aguwa administró E2 y P4 a ratas y observó una disminución significativa en la presencia de úlceras inducidas por diferentes sustancias después del tratamiento con hormonas, especialmente en aquellos animales tratados únicamente con P4 o en combinación con E2 (Aguwa, 1984). La P4 aceleró la reparación del daño producido por las úlceras linguales y gástricas inducidas por sustancias químicas en ratas. Este proceso de reparación estuvo asociado a un incremento en el flujo sanguíneo en los bordes de la zona ulcerada (Machowska et al., 2004), incremento que no se observó con el tratamiento con E2 (Montoneri y Drago, 1997). Estos resultados y los nuestros, soportan la idea de que la P4 ejerce un efecto protector en el daño gástrico, posiblemente relacionado al incremento del flujo sanguíneo y la producción de moco (Montoneri y Drago, 1997; Machowska et al., 2004), aunados con una respuesta inflamatoria moderada.

El daño epitelial inducido por la infección por *H. pylori* está asociado tanto a modificaciones en el perfil de proliferación y apoptosis de la mucosa, así como con alteraciones debidas al entorno inflamatorio. Nuestros resultados sugieren que el E2 y la P4 tienen efectos sobre las células epiteliales de la mucosa gástrica, que muestran diferentes tasas de proliferación celular y apoptosis, así como respuesta inflamatoria diferente en la infección temprana. Para poder definir el papel de las hormonas sexuales femeninas en la carcinogénesis inducida por *H. pylori*, es necesario desarrollar estudios en períodos más largos de infección.

Por otra parte, se ha encontrado la expresión del RE y RP en el estómago humano normal, en tejido proveniente de cáncer gástrico humano (Singh et al., 1997; Matsuyama et al., 2002) y en líneas celulares gástricas (Wu et al., 1990; Wu et al., 1994; Karat et al., 1999). En el antro y fondo gástricos de ratas intactas, se ha observado una expresión diferencial de las isoformas α y β del RE, siendo

mayor la expresión del RE β tanto en humanos (Singh et al., 1997; Campbell-Thompson et al., 2001) como en ratas (Ueyama et al., 2002). En nuestro estudio no fue posible detectar el RE β , mas observamos la presencia tanto de RE α , como de las isoformas A y B del RP en el antro de jerbos hembra ovariectomizadas.

A la fecha, la regulación del RE y el RP en tejido gástrico humano o murino no ha sido reportada, sin embargo se sabe que es tejido-especifica. Nuestros resultados muestran que la regulación de los receptores a hormonas en el antro de jerbos hembra ovariectomizadas es diferencial: la expresión del RE α es disminuida tanto por E2 como por P4; la expresión del RP-A es aumentada en presencia de ambas hormonas mientras que la expresión del RP-B disminuye con el tratamiento con E2 y se recupera con el tratamiento con P4. La funcionalidad de los receptores para el E2 y la P4 en la mucosa gástrica requiere ser demostrada.

Nuestros resultados sugieren que el E2 y la P4 modifican el perfil de inflamación de la mucosa gástrica, la proliferación y la apoptosis de las células epiteliales y el número de células G en jerbos hembra infectadas por *H. pylori*. Estos efectos podrían ocurrir a través de la interacción del E2 y la P4 con sus receptores nucleares en el antro gástrico del jerbo.

11. CONCLUSIONES

- El E2 favorece el desarrollo de gastritis extensa de mayor grado. La P4 tiene un efecto protector en jerbos hembra ovariectomizadas e infectadas con *H. pylori*.
- La ausencia de hormonas ováricas provoca una disminución del índice de apoptosis de las células epiteliales del antro gástrico en jerbos hembra ovariectomizadas, mientras que el tratamiento con E2 y P4 revierte este efecto en etapas tempranas de la infección por *H. pylori*.
- En etapas tempranas de la infección (6 SPI) por *H. pylori*, los tratamientos con E2 y P4 a dosis bajas inducen un aumento en el índice de proliferación de las células epiteliales del antro gástrico.
- La infección por *H. pylori* disminuye del número de células G, en tanto que el tratamiento con E2 y P4 lo eleva.
- El antro gástrico de jerbos hembra adultas expresa RE α , RP-A y RP-B, que son regulados diferencialmente por el E2 y la P4.

12. PERSPECTIVAS

- Llevar el tiempo de infección por *H. pylori* a 36 y 52 semanas, con los ajustes necesarios al modelo para evitar el desarrollo de la hiperplasia uterina por el tratamiento hormonal.
- Analizar por inmunohistoquímica las proteínas reguladoras del ciclo celular y citocinas para identificar posibles alteraciones en su expresión después del tratamiento hormonal en jerbos infectados por *H. pylori*.
- Identificar si el E2 y la P4 tienen efectos sobre la carga bacteriana de *H. pylori* en el estómago a diferentes tiempos de infección.
- Evaluar los niveles séricos de los principales reguladores de la función gástrica: gastrina y somatostatina, en los jerbos hembra infectadas y tratadas con E2 y P4.
- Reconocer los tipos celulares específicos que expresan al RE y al RP.
- Valorar la funcionalidad de los receptores del E2 y la P4 en las células epiteliales y secretoras de la mucosa gástrica.
- Determinar la posible participación de rutas no-genómicas del E2 y la P4 en los efectos observados en la mucosa gástrica de jerbos infectados por *H. pylori*.

13. REFERENCIAS

- Aebischer, T, S Laforsch, et al. "Immunity against *Helicobacter pylori*: significance of interleukin-4 receptor alpha chain status and gender of infected mice." *Infect Immun* 2001;**69**(1): 556-8.
- Aguwa, CN. "Effects of exogenous administration of female sex hormones on gastric secretion and ulcer formation in the rat." *Eur J Pharmacol* 1984;**104**(1-2): 79-84.
- Beato, M y J Klug. "Steroid hormone receptors: an update." *Hum Reprod Update* 2000;**6**(3): 225-36.
- Blaser, MJ. "The bacteria behind ulcers." *Sci Am* 1996;**274**(2): 104-7.
- Boll, G y J Reimann. "Oestrogen treatment depletes extrathymic T cells from intestinal lymphoid tissues." *Scand J Immunol* 1996;**43**(3): 345-50.
- Bradford, MM. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 1976;**72**: 248-54.
- Bramley, T. "Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues." *Reproduction* 2003;**125**(1): 3-15.
- Calixto Gonzalez, E y S Brailowsky. "[Neurosteroids. Neuromodulators of cerebral excitability]." *Gac Med Mex* 1998;**134**(1): 69-84.
- Camacho-Arroyo, I. "Progesterone receptor isosforms expression and progesterone actions in the brain". En *Recent research developments in life sciences*. Trivandrum, India, Research Signpost. 2003 **1**: pág. 221-242.
- Camacho-Arroyo, I, G Perez-Palacios, et al. "Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit." *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994;**50**(5-6): 299-303.
- Camacho-Arroyo, I, O Villamar-Cruz, et al. "Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain." *Neuroendocrinology* 2002;**76**(5): 267-71.
- Campbell-Thompson, M, GY Lauwers, et al. "17Beta-estradiol modulates gastroduodenal preneoplastic alterations in rats exposed to the carcinogen N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine." *Endocrinology* 1999;**140**(10): 4886-94.
- Campbell-Thompson, M, KK Reyher, et al. "Immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in gastric epithelium and enteric neurons." *J Endocrinol* 2001;**171**(1): 65-73.
- Cariton, AE. "Experimental surgery of the genital system". En *Methods of animal experimentation*. WI Gay y JE Heavner. Orlando, FL, Academic Press. 1965 **7**: pág. 191.
- Chao, TC, PJ Van Alten, et al. "Steroid sex hormones and macrophage function: modulation of reactive oxygen intermediates and nitrite release." *Am J Reprod Immunol* 1994;**32**(1): 43-52.
- Chen, TS, ML Doong, et al. "Effects of sex steroid hormones on gastric emptying and gastrointestinal transit in rats." *Am J Physiol* 1995;**268**(1 Pt 1): G171-6.
- Chernova, OB, MV Chernov, et al. "The role of p53 in regulating genomic stability when DNA and RNA synthesis are inhibited." *Trends Biochem Sci* 1995;**20**(10): 431-4.
- Civitelli, R, YS Kim, et al. "Nongenomic activation of the calcium message system by vitamin D metabolites in osteoblast-like cells." *Endocrinology* 1990;**127**(5): 2253-62.
- Clemm, DL, BL Macy, et al. "Definition of the critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor." *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;**53**(1-6): 487-95.
- Correa, P. "Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention." *Cancer Res* 1992;**52**(24): 6735-40.
- Court, M, PA Robinson, et al. "The effect of gender on *Helicobacter felis*-mediated gastritis, epithelial cell proliferation, and apoptosis in the mouse model." *J Pathol* 2003;**201**(2): 303-11.
- Crabtree, JE, M Court, et al. "Gastric mucosal cytokine and epithelial cell responses to *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils." *J Pathol* 2004;**202**(2): 197-207.
- Dalkin, AC, SJ Paul, et al. "Gonadal steroids effect similar regulation of gonadotrophin subunit mRNA expression in both male and female rats." *J Endocrinol* 1992;**132**(1): 39-45.

- de Boland, AR y AW Norman. "Influx of extracellular calcium mediates 1,25-dihydroxyvitamin D3-dependent transcaltachia (the rapid stimulation of duodenal Ca²⁺ transport)." *Endocrinology* 1990;**127**(5): 2475-80.
- Deshpande, R, H Khalili, et al. "Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFκB activation in murine macrophages." *Am J Reprod Immunol* 1997;**38**(1): 46-54.
- Dictor, M, M Ehinger, et al. "Abnormal cell cycle regulation in malignancy." *Am J Clin Pathol* 1999;**112**(1 Suppl 1): S40-52.
- Dixon, MF, RM Genta, et al. "Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994." *Am J Surg Pathol* 1996;**20**(10): 1161-81.
- Dixon, MF, RM Genta, et al. "Classification and grading of gastritis: the updated Sydney System". En *Gastritis*. MF Dixon, RM Genta y DY Graham. Philadelphia, PA, Lippincott & Wilkins. 1999: pág. 35-50.
- Ehring, GR, HH Kerschbaum, et al. "A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K⁺ channels, Ca²⁺ signaling, and gene expression in T lymphocytes." *J Exp Med* 1998;**188**(9): 1593-602.
- Elfvin, A, I Bolin, et al. "Helicobacter pylori induces gastritis and intestinal metaplasia but no gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils." *Scand J Gastroenterol* 2005;**40**(11): 1313-20.
- Eslick, GD, LL Lim, et al. "Association of Helicobacter pylori infection with gastric carcinoma: a meta-analysis." *Am J Gastroenterol* 1999;**94**(9): 2373-9.
- Evans, RM. "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily." *Science* 1988;**240**(4854): 889-95.
- Falkenstein, E, HC Tillmann, et al. "Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects." *Pharmacol Rev* 2000;**52**(4): 513-56.
- Fox, HS, BL Bond, et al. "Estrogen regulates the IFN-gamma promoter." *J Immunol* 1991;**146**(12): 4362-7.
- Fox, JG, CA Dangler, et al. "High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances Helicobacter pylori colonization in C57BL/6 mice." *Cancer Res* 1999;**59**(19): 4823-8.
- Fox, JG, AB Rogers, et al. "Helicobacter pylori-associated gastric cancer in INS-GAS mice is gender specific." *Cancer Res* 2003;**63**(5): 942-50.
- Fox, SI (2002). Human physiology. Boston, McGraw-Hill.
- Furukawa, H, T Iwanaga, et al. "[The significance of hormone receptors in hormone therapy of gastric cancers]." *Gan To Kagaku Ryoho* 1989;**16**(6): 2156-60.
- Gold, R, M Schmied, et al. "Antigen presentation by astrocytes primes rat T lymphocytes for apoptotic cell death. A model for T-cell apoptosis in vivo." *Brain* 1996;**119** (Pt 2): 651-9.
- Gonzalez-Arenas, A, O Villamar-Cruz, et al. "Regulation of progesterone receptor isoforms expression by sex steroids in the rat lung." *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;**85**(1): 25-31.
- Gore-Langton, ME y DT Armstrong. "Follicular steroidogenesis and its control". En *The physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill. New York, Raven Press. 1988: pág. 331-335.
- Gorospe, WC y ME Freeman. "Effects of placenta and maternal serum on prolactin secretion in vitro." *Biol Reprod* 1985;**32**(2): 279-83.
- Graham, JD, RL Balleine, et al. "Expression of osteonectin mRNA in human breast tumours is inversely correlated with oestrogen receptor content." *Eur J Cancer* 1997;**33**(10): 1654-60.
- Graham, JD y CL Clarke. "Physiological action of progesterone in target tissues." *Endocr Rev* 1997;**18**(4): 502-19.
- Grandien, K, A Berkenstam, et al. "The estrogen receptor gene: promoter organization and expression." *Int J Biochem Cell Biol* 1997;**29**(12): 1343-69.
- Green, S, P Walter, et al. "Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A." *Nature* 1986;**320**(6058): 134-9.
- Guerra-Araiza, C, MA Cerbon, et al. "Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle." *Life Sci* 2000;**66**(18): 1743-52.
- Gustafsson, JA. "Estrogen receptor beta--getting in on the action?" *Nat Med* 1997;**3**(5): 493-4.
- Hirschowitz, BI. "Normal function of the stomach". En *Gastritis*. DY Graham, RM Genta y MF Dixon. Philadelphia, PA, Lippincott & Wilkins. 1999: pág. 9-34.

- Hsueh, AJ, EY Adashi, et al. "Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells." *Endocr Rev* 1984;**5**(1): 76-127.
- Hussell, T, PG Isaacson, et al. "The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*." *Lancet* 1993;**342**(8871): 571-4.
- Hutchison, JS, PB Nelson, et al. "Effects of different gonadotropin pulse frequencies on corpus luteum function during the menstrual cycle of rhesus monkeys." *Endocrinology* 1986;**119**(5): 1964-71.
- I.A.R.C. "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans." 1994.
- I.A.R.C. (2002). GLOBOCAN. **2005**.
- Ikeno, T, H Ota, et al. "*Helicobacter pylori*-induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils." *Am J Pathol* 1999;**154**(3): 951-60.
- Johnson, MD (2001). Human biology : concepts and current issues. San Francisco, Benjamin Cummings.
- Kaneko, S, A Tamakoshi, et al. "Menstrual and reproductive factors and the mortality risk of gastric cancer in Japanese menopausal females." *Cancer Causes Control* 2003;**14**(1): 53-9.
- Karat, D, I Brotherick, et al. "Expression of oestrogen and progesterone receptors in gastric cancer: a flow cytometric study." *Br J Cancer* 1999;**80**(8): 1271-4.
- Kastner, P, A Krust, et al. "Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B." *Embo J* 1990;**9**(5): 1603-14.
- Kaushic, C, F Zhou, et al. "Effects of estradiol and progesterone on susceptibility and early immune responses to *Chlamydia trachomatis* infection in the female reproductive tract." *Infect Immun* 2000;**68**(7): 4207-16.
- Khalil, RA. "Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension." *Hypertension* 2005;**46**(2): 249-54.
- Kita, E, Y Yagyu, et al. "Alterations of host resistance to mouse typhoid infection by sex hormones." *J Leukoc Biol* 1989;**46**(6): 538-46.
- Kraus, WL y BS Katzenellenbogen. "Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists." *Endocrinology* 1993;**132**(6): 2371-9.
- Kraus, WL, KE Weis, et al. "Inhibitory cross-talk between steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist- and antagonist-occupied progestin receptors." *Mol Cell Biol* 1995;**15**(4): 1847-57.
- Kuiper, GG, E Enmark, et al. "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**(12): 5925-30.
- Lanciers, S, B Despinasse, et al. "Increased susceptibility to *Helicobacter pylori* infection in pregnancy." *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999;**7**(4): 195-8.
- Lange, CA. "Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word?" *Mol Endocrinol* 2004;**18**(2): 269-78.
- Lange, CA, T Shen, et al. "Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**(3): 1032-7.
- Le Goascogne, C, N Sananes, et al. "Androgen biosynthesis in the stomach: expression of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase messenger ribonucleic acid and protein, and metabolism of pregnenolone and progesterone by parietal cells of the rat gastric mucosa." *Endocrinology* 1995;**136**(4): 1744-52.
- Lee, A, J O'Rourke, et al. "A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain." *Gastroenterology* 1997;**112**(4): 1386-97.
- Lewin, KJ y DN Lewin. "Stomach: normal anatomy and histology". En *Gastritis*. DY Graham, RM Genta y MF Dixon. Philadelphia, PA, Lippincott & Wilkins. 1999: pág. 3-8.
- Lin, HL, TY Liu, et al. "2-Methoxyestradiol-induced caspase-3 activation and apoptosis occurs through G(2)/M arrest dependent and independent pathways in gastric carcinoma cells." *Cancer* 2001;**92**(3): 500-9.
- Loosfelt, H, M Atger, et al. "Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;**83**(23): 9045-9.

- Machowska, A, A Szlachcic, et al. "The role of female and male sex hormones in the healing process of preexisting lingual and gastric ulcerations." *J Physiol Pharmacol* 2004;**55 Suppl 2**: 91-104.
- Maeda, S, H Yoshida, et al. "Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*." *Mol Pathol* 2002;**55**(5): 286-93.
- Marchetti, M, B Arico, et al. "Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease." *Science* 1995;**267**(5204): 1655-8.
- Matsuyama, S, Y Ohkura, et al. "Estrogen receptor beta is expressed in human stomach adenocarcinoma." *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;**128**(6): 319-24.
- McColl, KE, E el-Omar, et al. "*Helicobacter pylori* gastritis and gastric physiology." *Gastroenterol Clin North Am* 2000;**29**(3): 687-703, viii.
- McColl, KE, D Gillen, et al. "The role of gastrin in ulcer pathogenesis." *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;**14**(1): 13-26.
- Mendoza-Rodriguez, CA, I Camacho-Arroyo, et al. "Variations of progesterone receptor and c-fos gene expression in the rat uterus after treatment with norethisterone and its A-ring reduced metabolites." *Contraception* 1999;**59**(5): 339-43.
- Messa, C, M Pricci, et al. "Inhibitory effect of 17beta-estradiol on growth and the polyamine metabolism of a human gastric carcinoma cell line (HGC-27)." *Scand J Gastroenterol* 1999;**34**(1): 79-84.
- Messa, C, F Russo, et al. "Epidermal growth factor and 17beta-estradiol effects on proliferation of a human gastric cancer cell line (AGS)." *Scand J Gastroenterol* 2000;**35**(7): 753-8.
- Miller, L, EW Alley, et al. "Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages." *J Leukoc Biol* 1996;**59**(3): 442-50.
- Miller, L y JS Hunt. "Regulation of TNF-alpha production in activated mouse macrophages by progesterone." *J Immunol* 1998;**160**(10): 5098-104.
- Mizoshita, T, T Tsukamoto, et al. "Colonic and small-intestinal phenotypes in gastric cancers: relationships with clinicopathological findings." *Pathol Int* 2005;**55**(10): 611-8.
- Mohammadi, M, J Nedrud, et al. "Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load." *Gastroenterology* 1997;**113**(6): 1848-57.
- Montoneri, C y F Drago. "Effects of pregnancy in rats on cysteamine-induced peptic ulcers: role of progesterone." *Dig Dis Sci* 1997;**42**(12): 2572-5.
- Naito, Y y T Yoshikawa. "Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress." *Free Radic Biol Med* 2002;**33**(3): 323-36.
- Nilsson, N y H Carlsten. "Estrogen induces suppression of natural killer cell cytotoxicity and augmentation of polyclonal B cell activation." *Cell Immunol* 1994;**158**(1): 131-9.
- Ohkusa, T, I Okayasu, et al. "*Helicobacter pylori* infection induces duodenitis and superficial duodenal ulcer in Mongolian gerbils." *Gut* 2003;**52**(6): 797-803.
- Parsonnet, J, GD Friedman, et al. "*Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma." *N Engl J Med* 1991;**325**(16): 1127-31.
- Peek, RM, Jr., HP Wirth, et al. "*Helicobacter pylori* alters gastric epithelial cell cycle events and gastrin secretion in Mongolian gerbils." *Gastroenterology* 2000;**118**(1): 48-59.
- Peek, RM, Jr., . "*Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric mucosal cellular turnover: implications for carcinogenesis." *J Gastroenterol* 2002;**37 Suppl 13**: 10-6.
- Perrot-Appianat, M y JF David-Ferreira. "Immunocytochemical localization of progesterone-binding protein (PBP) in guinea-pig placental tissue." *Cell Tissue Res* 1982;**223**(3): 627-39.
- Pricci, M, M Linsalata, et al. "Effects of 17beta-estradiol administration on apoptosis and polyamine content in AGS cell line." *Anticancer Res* 2001;**21**(5): 3215-20.
- Quinla, JD y DA Hill. "Nausea and vomiting of pregnancy." *Am Fam Physician* 2003;**68**(1): 121-8.
- Roberts, CW y J Alexander. "Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy." *Parasitology* 1992;**104 Pt 1**: 19-23.
- Rugge, M, P Correa, et al. "Gastric dysplasia: the Padova international classification." *Am J Surg Pathol* 2000;**24**(2): 167-76.

- Salem, ML, G Matsuzaki, et al. "beta-estradiol suppresses T cell-mediated delayed-type hypersensitivity through suppression of antigen-presenting cell function and Th1 induction." *Int Arch Allergy Immunol* 2000;**121**(2): 161-9.
- Sartorius, CA, SD Groshong, et al. "New T47D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B- and A-receptors: only antiprogesterin-occupied B-receptors are switched to transcriptional agonists by cAMP." *Cancer Res* 1994;**54**(14): 3868-77.
- Schreihofe, DA, MH Stoler, et al. "Differential expression and regulation of estrogen receptors (ERs) in rat pituitary and cell lines: estrogen decreases ERalpha protein and estrogen responsiveness." *Endocrinology* 2000;**141**(6): 2174-84.
- Shen, T, KB Horwitz, et al. "Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294." *Mol Cell Biol* 2001;**21**(18): 6122-31.
- Singh, S, R Poulsom, et al. "Differential expression of oestrogen receptor and oestrogen inducible genes in gastric mucosa and cancer." *Gut* 1997;**40**(4): 516-20.
- Sipponen, P y P Correa. "Delayed rise in incidence of gastric cancer in females results in unique sex ratio (M/F) pattern: etiologic hypothesis." *Gastric Cancer* 2002;**5**(4): 213-9.
- Sirigu, F, S Capeccioni, et al. "Effect of Helicobacter pylori colonization on quantitative distribution of antral G-cells in apparently healthy subjects and in duodenal ulcer patients. A morphometric study." *Ital J Gastroenterol* 1993;**25**(6): 318-20.
- Stemmermann, GN, AM Nomura, et al. "Gastric carcinoma: pathology findings in a multiethnic population." *Cancer* 2002;**95**(4): 744-50.
- Stewart, T, R Henderson, et al. "Reduced incidence of rectal cancer, compared to gastric and colonic cancer, in a population of 73,076 men and women chronically immunosuppressed." *Clin Cancer Res* 1997;**3**(1): 51-5.
- Sylvia, VL, Z Schwartz, et al. "Maturation-dependent regulation of protein kinase C activity by vitamin D3 metabolites in chondrocyte cultures." *J Cell Physiol* 1993;**157**(2): 271-8.
- Szekeres-Bartho, J, B Autran, et al. "Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction." *Cell Immunol* 1989;**122**(2): 281-94.
- Tena-Sempere, M, VM Navarro, et al. "Regulation of estrogen receptor (ER) isoform messenger RNA expression by different ER ligands in female rat pituitary." *Biol Reprod* 2004;**70**(3): 671-8.
- Tessier, C, S Deb, et al. "Estrogen receptors alpha and beta in rat decidua cells: cell-specific expression and differential regulation by steroid hormones and prolactin." *Endocrinology* 2000;**141**(10): 3842-51.
- Tibbetts, TA, F DeMayo, et al. "Progesterone receptors in the thymus are required for thymic involution during pregnancy and for normal fertility." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**(21): 12021-6.
- Tomb, JF, O White, et al. "The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori." *Nature* 1997;**388**(6642): 539-47.
- Tung, L, MK Mohamed, et al. "Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors." *Mol Endocrinol* 1993;**7**(10): 1256-65.
- Turgeon, JL y DW Waring. "Progesterone regulation of the progesterone receptor in rat gonadotropes." *Endocrinology* 2000;**141**(9): 3422-9.
- Uchida, K, K Okazaki, et al. "Analysis of cytokines in the early development of gastric secondary lymphoid follicles in Helicobacter pylori-infected BALB/c mice with neonatal thymectomy." *Infect Immun* 2001;**69**(11): 6749-54.
- Ueyama, T, N Shirasawa, et al. "Estrogen-producing steroidogenic pathways in parietal cells of the rat gastric mucosa." *Life Sci* 2004;**74**(18): 2327-37.
- Ueyama, T, N Shirasawa, et al. "Gastric parietal cells: potent endocrine role in secreting estrogen as a possible regulator of gastro-hepatic axis." *Endocrinology* 2002;**143**(8): 3162-70.
- Ukena, K, C Kohchi, et al. "Expression and activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life." *Endocrinology* 1999;**140**(2): 805-13.

- Varayoud, J, JG Ramos, et al. "The estrogen receptor alpha sigma3 mRNA splicing variant is differentially regulated by estrogen and progesterone in the rat uterus." *J Endocrinol* 2005;**186**(1): 51-60.
- Vassiliadou, N, L Tucker, et al. "Progesterone-induced inhibition of chemokine receptor expression on peripheral blood mononuclear cells correlates with reduced HIV-1 infectability in vitro." *J Immunol* 1999;**162**(12): 7510-8.
- Vegeto, E, MM Shahbaz, et al. "Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function." *Mol Endocrinol* 1993;**7**(10): 1244-55.
- Villamar-Cruz, O, J Manjarrez-Marmolejo, et al. "Regulation of the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors SRC-1 and SMRT by the 26S proteasome in the rat brain during the estrous cycle." *Brain Res Bull* 2006;**69**(3): 276-81.
- Wang, LJ, SJ Chen, et al. "Morphological and pathologic changes of experimental chronic atrophic gastritis (CAG) and the regulating mechanism of protein expression in rats." *J Zhejiang Univ Sci B* 2006;**7**(8): 634-40.
- Watanabe, T, M Tada, et al. "Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils." *Gastroenterology* 1998;**115**(3): 642-8.
- Wee, A, JY Kang, et al. "Helicobacter pylori and gastric cancer: correlation with gastritis, intestinal metaplasia, and tumour histology." *Gut* 1992;**33**(8): 1029-32.
- Weisz, J y IL Ward. "Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring." *Endocrinology* 1980;**106**(1): 306-16.
- Wijsman, JH, RR Jonker, et al. "A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA." *J Histochem Cytochem* 1993;**41**(1): 7-12.
- Wira, CR, RM Rossoll, et al. "Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of estradiol on antigen presentation by vaginal cells." *Endocrinology* 2000;**141**(8): 2877-85.
- Wu, CW, YF Chang, et al. "Steroid hormone receptors in three human gastric cancer cell lines." *Dig Dis Sci* 1994;**39**(12): 2689-94.
- Wu, CW, CW Chi, et al. "Sex hormone receptors in gastric cancer." *Cancer* 1990;**65**(6): 1396-400.
- Yamaoka, Y, T Kodama, et al. "Relationship between Helicobacter pylori iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries." *J Clin Microbiol* 1999;**37**(7): 2274-9.
- Yao, JC, Schnirer, II, et al. "Effects of sex and racial/ethnic group on the pattern of gastric cancer localization." *Gastric Cancer* 2002;**5**(4): 208-12.
- Zhang, Z, Y Yuan, et al. "Apoptosis, proliferation and p53 gene expression of H. pylori associated gastric epithelial lesions." *World J Gastroenterol* 2001;**7**(6): 779-82.
- Zhang, ZW, SE Patchett, et al. "Role of Helicobacter pylori and p53 in regulation of gastric epithelial cell cycle phase progression." *Dig Dis Sci* 2002;**47**(5): 987-95.
- Zheng, Q, XY Chen, et al. "Development of gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils after long-term infection with Helicobacter pylori." *J Gastroenterol Hepatol* 2004;**19**(10): 1192-8.
- Zwain, IH y SS Yen. "Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain." *Endocrinology* 1999;**140**(8): 3843-52.

Effects of Estradiol and Progesterone on Gastric Mucosal Response to Early *Helicobacter pylori* Infection in Female Gerbils

Milena Saqui-Salces,^{*‡} Brenda L. Rocha-Gutiérrez,^{*} Jorge A. Barrios-Payán,^{*} Guillermo Ruiz-Palacios,[†] Ignacio Camacho-Arroyo[‡] and Armando Gamboa-Domínguez^{*}

^{*}Departamentos de Patología e [†]Infectología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México; [‡]Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Keywords

H. pylori, estradiol, progesterone, gastritis, proliferation, apoptosis.

Reprint requests to: Dr Armando Gamboa-Domínguez, Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, 14000 Tlalpan, México, D.F., México. E-mail: agamboat@quetzal.innsz.mx

Abstract

Background: Gender differences have been shown regarding the changes in the inflammatory response, gastrin secretion, and gastric acidity during *Helicobacter pylori* infection.

Aim: To investigate the role of estradiol and progesterone in the changes of the gastric mucosa induced by *H. pylori* during the early stage of infection in female gerbils.

Materials and Methods: Thirty-three adult ovariectomized female gerbils were infected with *H. pylori* (SS1); 7 days after infection they were treated with low and high doses of estradiol (50 and 250 µg/60 days pellet), progesterone (15 and 50 mg/60 days pellet) and vehicle. Non-ovariectomized infected gerbils were used as control. Gerbils were euthanized after 6 weeks of infection. Histologic evaluation, immunohistochemical detection of proliferation cell nuclear antigen (PCNA), gastrin, and apoptosis by terminal deoxynucleotide nick end labeling (TUNEL) assay were performed. Positive cells for PCNA, TUNEL, and gastrin were counted in 10 oriented glands per animal. Two-sided $p = .05$ was considered significant.

Results: Estradiol-treated groups showed more intense and extended acute and follicular gastritis compared to the vehicle group, whereas progesterone-treated groups presented less gastritis than the other groups. Proliferation and apoptosis indexes were significantly lower in the vehicle group when compared with those of the control; both indexes were increased in the high-dose estradiol and progesterone groups as compared with those of the vehicle. Grade I nonmetaplastic atrophy was observed in the vehicle and progesterone groups. The high-dose progesterone group showed a significant reduction in the number of gastrin cells.

Conclusions: Estradiol and progesterone participate in the gastric mucosal response to early *H. pylori* infection in gerbils.

Helicobacter pylori is a Gram-negative bacterium prevalent in more than one-third of the population worldwide [1]. The infection with *H. pylori* induces a chronic inflammatory response related to preneoplastic changes in the gastric mucosa, and it has been associated to the presence of gastritis, duodenal and gastric ulceration, atrophy, metaplasia, gastric adenocarcinoma, and mucosal-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma [2–4]. *H. pylori* infection has a direct effect on the gastric epithelial cell turnover, inducing changes in the proliferation and apoptosis rates related to hypo- and hypergastrinemia [5–7].

There is a gender difference in the incidence of gastric cancer with a 2:1 men to premenopausal women ratio [8];

this tendency nearly disappears in post-menopausal women [9,10]. Female mice infected with *Helicobacter felis* and *H. pylori* showed more intense inflammatory responses than male mice [11,12].

A previous study showed that the administration of estradiol (E2) to rats with ulcers induced by different methods (chemical, stress, pyloric shay) exerted an anti-ulcerative effect, increased parietal cells activity and gastrin secretion, and maintained mucosa integrity [13]. Also, the treatment with E2 in male rats for 4 weeks reduced the carcinogenic effect induced by N-methyl-N-nitro-nitrosoguanidine and increased both mucine and gastrin secretion in the antral mucosa [13]. In vitro studies in different

human gastric cancer cell lines have shown an antiproliferative effect of E2 administration [15–17]. Aguwa administered E2 and progesterone (P4) to albino rats and observed, after 7 hours, a significant decrease in ulcers induced by different chemicals, especially in those treated with P4 [14].

In 1998, gerbils were used in *H. pylori* infection and the sequence of morphological changes observed adjacent to gastric carcinomas were reproduced with higher frequency, and in shorter time compared with other animal models [18,19]. Causality of gastric cancer intestinal phenotype was demonstrated in this model originally described in male gerbils [18–20]. There have been reports using female gerbils, showing similar alterations of the gastric mucosa to those observed in male gerbils [21–24].

In 2004, Crabtree et al. found that the INF- γ and IL-12p40 expression was significantly higher in female gerbils infected with *H. pylori* compared with age-matched male gerbils [23]. However, the role of E2 and P4 in the development of *H. pylori*-induced gastritis is unknown.

The aim of this study was to evaluate the effects of the administration of E2 and P4 on the gastric epithelial cell turnover, G-cell number, and inflammatory response induced by early *H. pylori* infection in female gerbils.

Materials and Methods

Animals and Treatments

Adult pathogen-free female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*, 15-week-old, 65–73 g, derived Harlan, IA, USA) maintained in microisolators with free access to water and food under a 12:12 hours light : dark cycle were divided into seven groups (Table 1). Gerbils were ovariectomized under anesthesia (ketamine hydrochloride 120 mg/kg, xilazine 20 mg/kg) as previously described [25]. Gerbils in intact (INT) and control (CTL) groups were manipulated without ovaries removal.

Ten days after ovariectomy, an intragastric *H. pylori* infection was performed after a 24-hour fasting under general anesthesia with zoletil (80 mg/kg). *H. pylori* standardized SS1 strain (*cagA*⁺, *vacA*⁺) culture suspension on saline solution with 1×10^6 CFU was administered to each gerbil. The INT group received only saline solution.

Ovariectomized animals were treated as indicated in Table 1. E2, P4, and vehicle were administered by 60 days release pellets (Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA) 1 week after infection. Pellets were allocated subcutaneously in the dorsal area according to the manufacturer's instructions. Animals in the INT and CTL groups were manipulated without the pellet. Animals' weight and vaginal cytology were monitored on a weekly basis.

Table 1 Study groups used in the experiment at 6 weeks of *H. pylori* infection. OVH, ovariectomy; INT, intact; CTL, control; VEH, vehicle; E2L, E2 low dose; E2H, E2 high dose; P4L, P4 low dose; and P4H, P4 high dose. Intragastric *H. pylori* infection was performed after 24 hours of fasting, under anesthesia with zoletil (80 mg/kg). One milliliter *H. pylori* standardized SS1 strain (*cagA*⁺, *vacA*⁺) culture suspension on saline solution with 1×10^6 CFU was administered to each gerbil when indicated. INT group received only saline solution. One week after infection, E2, P4, and vehicle were administered subcutaneously by 60 days release pellets

Group	OVH	<i>H. pylori</i>	E2	P4	6 Weeks (n)
INT	–	–	–	–	5
CTL	–	+	–	–	5
VEH	+	+	–	–	5
E2L	+	+	50 μ g/60 days	–	5
E2H	+	+	250 μ g/60 days	–	4
P4L	+	+	–	15 mg/60 days	5
P4H	+	+	–	50 mg/60 days	4

Euthanasia was performed at 6 weeks of infection after bleeding by intracardiac puncture under ether anesthesia. The stomach and uterus were removed from all animals. All procedures used in these experiments were approved by the local ethical committee for animal use in research (CINVA 167).

H. pylori Infection Confirmation

Infection was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) for *cagA* amplification of DNA extracted from feces collected weekly from each group. Feces were suspended in phosphate-buffered saline (PBS), digested with proteinase K (10 μ g/ μ l, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and centrifuged (113.4 g, 3 minutes, and 1260 g, 3 minutes, 4 °C). DNA was extracted with phenol–chloroform–isopropyl alcohol, and PCR was performed using the primers 5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG-3', and 5'-CTGCAAAA-GATTGTTTGGCAGA-3' [26]. After a denaturation step at 94 °C for 3 minutes, 35 cycles were carried out for PCR amplification. The cycles profile was: 93 °C, 1 minute; 55 °C, 1 minute; and 72 °C, 1 minute. A final extension was performed at 72 °C, 5 minutes and kept at 4 °C.

DNA extracted from the *H. pylori* inoculum was used as a positive control, the negative control included sterile water instead of DNA. PCR products were separated on 2.5% agarose gels using ϕ X174 DNA-*Hae*III (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) as a molecular weight marker. The amplified DNA was 352 bp.

Additional confirmation of the *H. pylori* infection was performed by immunohistochemistry (IHC) on formalin (4%) fixed, paraffin-embedded gastric tissue with heat antigen retrieval, using anti-*H. pylori* polyclonal antibody (Dako Cytomation, Denmark A/S, 1:50) with

avidin-biotin-peroxidase detection system and diaminobenzidine in NexES automated ICH system (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA).

Hormonal Activity and Tissues

Vaginal smears were taken weekly from all animals, from 1 week before ovariectomy until the date when euthanasia was performed. Smears were fixed with ethanol and a Papanicolaou stain was performed for further microscopic evaluation of the estrous cycle.

After euthanasia, the collected stomachs were opened along the major curvature and longitudinal cuts were performed, taking care of including oxintic and antral mucosa. Uteri were also obtained and transversally sectioned. Tissues were fixed in 4% buffered formalin (pH 7.6) to be embedded in paraffin and processed for histologic evaluation in hematoxylin–eosin (H&E) stained slides and immunohistochemistry (IHC).

Immunohistochemistry

IHC was performed to detect proliferation cell nuclear antigen (PCNA) in gastric tissues using anti-PCNA clone PC10 (Dako Cytomation, Denmark A/S 1:150), a primary antibody that has shown reactivity in gerbils tissues [5]. IHC was also performed in all collected samples using an antigastrin polyclonal antibody (Dako Cytomation, Denmark A/S, 1:300) to detect gastrin-producing cells (G cells).

Briefly, 4- μ m sections of formalin-fixed, paraffin-embedded gastric tissue were mounted on positive-charged glass slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Tissues were deparaffinized and dehydrated with xylene, ethanol, and Tris (0.05 mol/l) pH 7.6, consecutive baths. PCNA antigen retrieval was performed with EDTA (10 mmol/l) buffer, pH 8.0, in a microwave pressure cooker for 12 minutes. In the case of gastrin detection, protein digestion with trypsin (Protease I, Ventana Medical Systems) was performed for 6 minutes. IHC was carried out in a NexES automated system (Ventana Medical Systems), using iView DAB detection system (Ventana Medical Systems). Tonsil and human gastric adenocarcinoma were used as positive controls. In all cases, the negative control consisted of omitting the primary antibody. All antibodies used in this study had been previously tested and standardized in gerbil tissues in our laboratory.

Apoptosis

Apoptosis was detected by the terminal deoxynucleotide nick end labeling (TUNEL) assay as previously described using the Apoptag Plus Peroxidase kit (S7101, Chemicon

International, Temecula, CA, USA), following manufacturer's instructions. Slides were prepared following the procedures described previously, except for antigen retrieval [23,27].

Evaluation

H&E-stained sections were reviewed by two observers with experience in human and animal gastric pathology (AGD, MSS), blinded to treatments. Antral morphology was evaluated using Sydney's updated analog visual scale to identify and grade acute and chronic inflammation, atrophy, and metaplasia [28]. The presence of acute gastritis was considered when extravascular polymorphonuclear neutrophil infiltration was observed. Chronic gastritis was reported if mononuclear infiltrate was present, and incidence of follicular gastritis only when additional prominent lymphoid follicles were observed.

Proliferation and apoptotic indexes were determined by counting positive epithelial cells for PCNA and TUNEL, respectively, in 10-well-oriented antral glands per animal. The indexes were calculated as the ratio of total positive cells/total cells counted multiplied by 100. Gastrin-immunopositive cells were also counted in 10 oriented antral glands per animal.

Analysis

Data were analyzed with one-way analysis of variance ANOVA and Student's *t*-test, after demonstrating variances homogeneity in all groups. All comparisons were performed using SPSS 12.0 software for Windows considering $p = .05$ as statistically significant.

Results

Infection was confirmed using the *H. pylori* *cagA* gene amplification by PCR, gels showed a band of 352 bp in all groups except in INT. Additionally, the presence of *H. pylori* was demonstrated in gastric tissue by IHC to confirm each animal infection (data not shown). Gerbils negative for *H. pylori* presence by IHC were not considered for further analysis. There were no significant differences in the animals' weights among groups during the experiment (data not shown).

Hormonal Activity

Vaginal smears stained by Papanicolaou technique were evaluated by an experienced observer in rodent cytology (ICA). Animals in INT and CTL groups (both non-ovariectomized) showed cytologies corresponding to different stages of the estrous cycle. The E2L group presented estrus, diestrus, and proestrus cytologies,

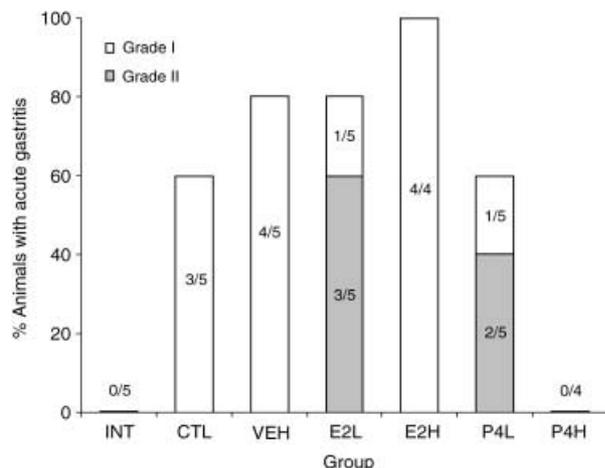


Figure 1 Incidence of acute gastritis in the antrum of female gerbils. Data in bars correspond to number of gerbils presenting the respective grade of damage per group. Antral morphology was blindly evaluated using Sydney's updated analog visual scale. INT, intact; CTL, control; VEH, vehicle; E2L, E2 low dose; E2H, E2 high dose; P4L, P4 low dose; P4H, P4 high dose.

whereas the E2H group showed diestrus and proestrus. Gerbils treated with VEH and P4 presented cytologies corresponding to diestrus.

In INT and CTL groups, uteri presented a normal histology. Uteri from groups treated with E2 showed focal mature (E2L) and immature (E2H) epidermoid metaplasia with pyometra; P4- and VEH-treated animals showed intense uterine atrophy and corneous layer thickening.

Histologic Analysis of the Gastric Antrum

Animals in the INT group presented normal gastric morphology without signs of inflammatory response or any other noticeable change during the study.

The gastritis observed in the study was subscribed to gastric antrum in all cases. Antral morphology was evaluated using Sydney's updated analog visual scale to identify and grade acute and chronic inflammation and atrophy [28]. The presence of acute gastritis was considered when extravascular polymorphonuclear neutrophil infiltration was observed; additionally, chronic gastritis was reported if a mononuclear infiltrate was present; follicular gastritis was reported only when additional prominent lymphoid follicles were observed. Animals presenting both chronic and follicular gastritis are reported as presenting follicular gastritis only.

Acute gastritis was observed in all groups except for the INT and P4H groups (Fig. 1). Grade II acute gastritis was observed in animals treated with low doses of sex steroid hormones (E2L and P4L), whereas the rest of the animals only showed low-grade (grade I) gastritis (Fig. 1).

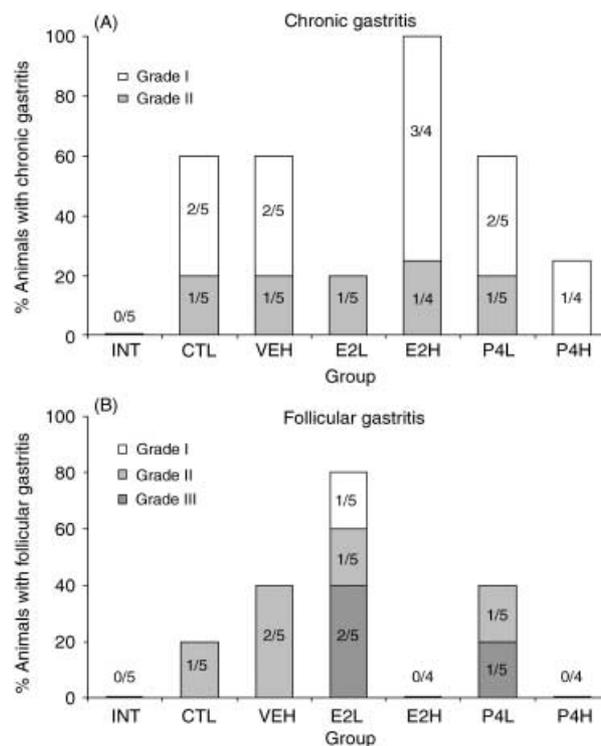


Figure 2 Incidence of chronic and follicular gastritis in the antrum of female gerbils. Percentage of animals per group with chronic gastritis (A) and follicular gastritis (B) are presented. Data in bars represent the number of gerbils showing the corresponding grade of gastritis per group. Antral morphology was evaluated using Sydney's updated analog visual scale to identify and grade chronic and follicular inflammation.

Both low and moderate chronic gastritis (grades I and II, respectively) were observed in all treated groups except in P4H group, which only presented low-grade chronic gastritis, and in E2L group which exhibited moderate gastritis. Interestingly, the E2H group showed the highest incidence of chronic gastritis (100%) (Fig. 2A).

Moderate follicular gastritis (grade II) was observed in CTL, VEH, and low-hormone-treated groups (E2L and P4L). The latter also presented grade III follicular gastritis. The highest incidence of follicular gastritis (80%) was observed in the E2L group (Fig. 2B).

Mild atrophy was only observed in groups treated with VEH (20%) and in P4L and P4H groups (20 and 50%, respectively).

Proliferation and Apoptosis

At early *H. pylori* infection, we observed that ovariectomy (VEH) significantly diminished the proliferation index as compared to the CTL group, whereas the low dose of E2 and P4 induced a recovery in the proliferation index. Interestingly, the high dose of both E2 and P4 had a similar effect to that observed with VEH (Fig. 3).

Figure 3 Proliferation indexes of antral epithelial cells in female gerbils. Proliferation was determined by counting epithelial cells positive for immunohistochemical detection of PCNA in 10 oriented antral glands per animal. The indexes were calculated as the ratio of total positive cells/total cells counted $\times 100$. Data presented are mean \pm SEM of all animals in each group. * $p < .05$ versus CTL; ** $p < .05$ versus VEH.

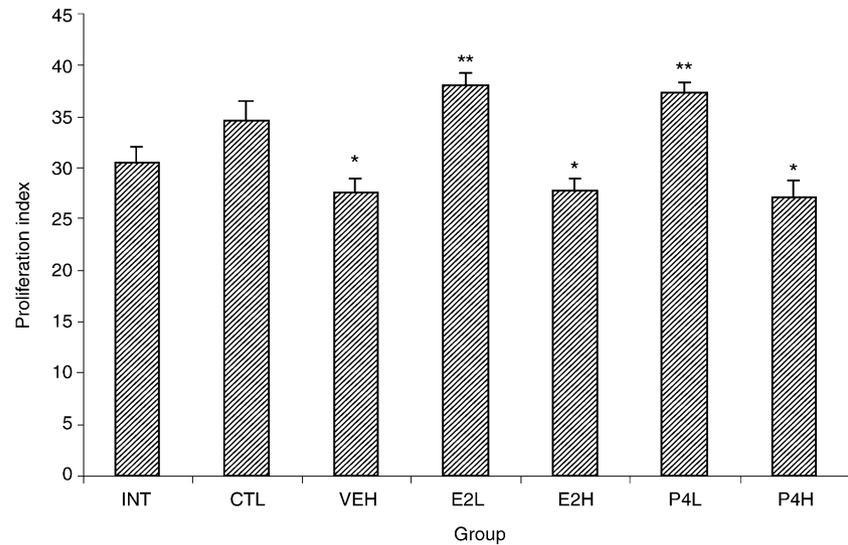
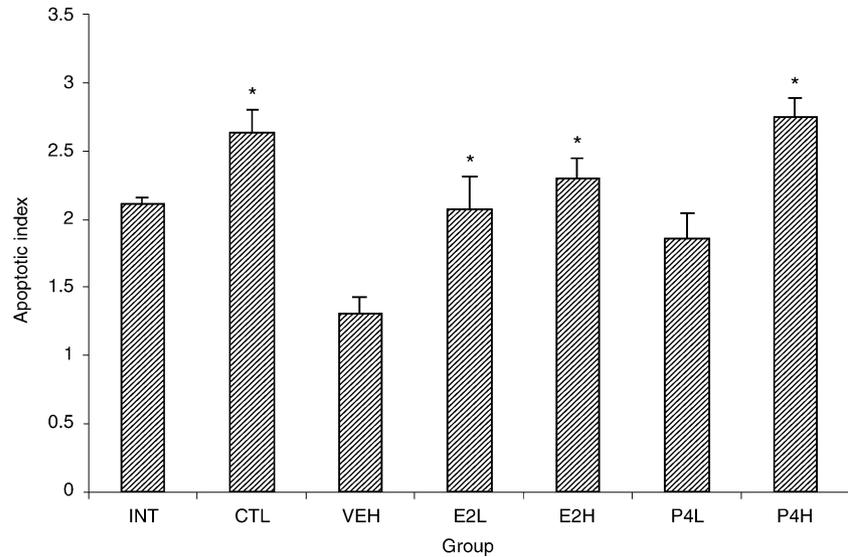


Figure 4 Apoptosis indexes of antral epithelial cells in female gerbils. Apoptosis was determined by counting epithelial cells positive for TUNEL assay in 10 oriented antral glands per animal. The indexes were calculated as the ratio of total positive cells/total cells counted $\times 100$. Data presented are mean \pm SEM of all animals in each group. * $p < .05$ versus CTL; ** $p < .05$ versus VEH.



Ovariectomy (VEH group) significantly diminished the apoptotic index of epithelial cells compared with the CTL group, whereas hormone treatment reverted this effect (Fig. 4).

Gastrin Cells

Gastrin IHC was performed on antral sections, which were blindly evaluated by two experienced observers (AGD, MSS). Total positive cells in 10 oriented antral glands were counted per animal. We observed that all *H. pylori*-infected animals presented a decrease in the number of immunopositive gastrin cells compared to the INT group. Animals treated with P4H showed the lowest number of G cells (Fig. 5).

Discussion

The gastric cancer incidence has a male to premenopausal women ratio of approximately 2:1 [8], there are some studies evaluating the effects of E2 and P4 on gastric cancer cell lines, gastric ulcerations, and chemical gastric carcinogenesis, reporting hormonal effects after short-term treatments (= 8 weeks) [13,14]. However, to our knowledge, this is the first study characterizing the effects of female sex steroid hormones on *H. pylori* infection.

Our results demonstrate that E2 and P4 modify the gastric mucosal response to early *H. pylori* infection in ovariectomized gerbils. A more intense and extended acute inflammatory response was observed in the groups treated with E2, whereas the P4-treated animals presented a

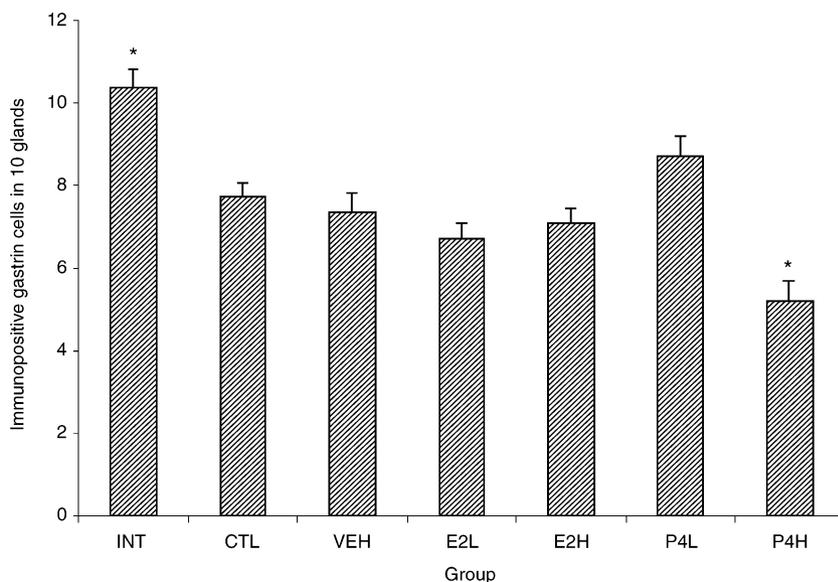


Figure 5 Immunopositive gastrin cells in the gastric antrum of female gerbils. Immunohistochemical analysis was performed in 10 oriented gastric antral glands per animal. Data are expressed as mean ± SEM. * $p < .05$ versus all other groups.

lower incidence of high-grade acute gastritis when compared to the E2 group.

Grade I and II chronic gastritis were observed in all treated groups. Interestingly, E2H and E2L were the groups with the highest incidence of chronic and follicular gastritis, respectively; thus suggesting that E2 induces a higher inflammatory response in female gerbils infected with *H. pylori*.

The physiological concentrations of E2 and P4 in female gerbils during the estrous cycle have not been reported. The doses used in this study are based on hormone supplementation data to achieve physiologic concentrations corresponding to proestrus and diestrus phases in female rats, which correspond to the vaginal smears observed in our study.

The effects of sex steroid hormones on the inflammatory response have been studied in humans and in different animal models [29,30]; E2 is considered as proinflammatory, inducing TH1 responses, whereas P4 is considered as anti-inflammatory. A TH1 response has generally been associated to *cagA*⁺ *H. pylori* infection [31]. In murine macrophages stimulated with lipopolysaccharides (LPS), E2 diminished IL-1 α , IL-6, and TNF- α production; whereas IL-10, IL-12, and macrophage inflammatory protein production was unaffected but associated with decreased LPS-NF κ B binding in a dose- and time-dependent manner [32]. These effects of E2 over macrophages may induce the high incidence and intensity of follicular gastritis observed in *H. pylori*-infected E2-treated gerbils.

It is well known that P4 promotes a TH2 response and plays a regulatory role in inflammation by decreasing the levels of TNF- α mRNA and protein production by murine macrophages treated with LPS, and elevating levels of I κ B

[33], which acts as a NF- κ B repressor in *H. pylori* infection [34]. These effects over the immune response induced by P4 could be related to the lower inflammatory response to early *H. pylori* infection.

We observed that the gastric mucosal epithelial cell proliferation and apoptosis were significantly reduced in ovariectomized (VEH) animals and increased by E2L and P4L treatment. Apoptosis diminution in VEH was reverted by all hormone treatment, thus suggesting that E2 and P4 participate in the gastric mucosal turnover during *H. pylori* infection.

Mild atrophy was observed in the VEH- and P4-treated animals, indicating that P4 acts as anti-inflammatory agent and, in high doses, as an apoptosis inducer in the antral mucosa of gerbils infected with *H. pylori*.

This study reports a novel animal model to evaluate the effects of estradiol and progesterone on *H. pylori* interaction with the gastric mucosa. At 6 weeks of infection, our results suggest that E2 and P4 have an effect on the inflammatory response and participate in the dynamics of antral mucosal epithelial cell turnover in early *H. pylori* infection, supporting the idea that female sex hormones – mainly progesterone – exert a protective role on gastric damage.

The effects of E2 and P4 have been evaluated on several different tissues and cell types. Although information about E2 and P4 effects on gastric tissue is scarce, E2 and P4 receptors have been found in the normal human stomach, gastric cancer tissues, and cell lines [35–37]. In the intact rat stomach, differential expression of E2 receptor isoforms α and β in gastric antrum and fundus has been observed. Moreover, the inhibition of gastric acid output and gastrin concentration induced by E2 suggests that E2 has a regulatory function on the gastric mucosa [38],

supported by the steroidogenic activity of parietal cells in the normal stomach [39,40]. In our study, we observed that the treatment with E2 was associated with an induction of epithelial cell proliferation in early *H. pylori* infection and no changes were observed on the G-cell number.

The effect of P4 in normal gastric epithelial cell proliferation and apoptosis is not clear, some studies have defined a general protective role on gastric ulceration induced by different factors in humans, especially during pregnancy [41], as well as in animal models [14,42,43]. Aguwa administered E2 and P4 to albino rats and observed a significant decrease in ulcers induced by different chemicals after hormone treatment, especially in those animals treated with P4 alone or in combination with E2 [14]. P4 accelerated the gastric and lingual healing process after chemical ulcers in rats, associated to an increased blood flow at the edge of ulcer area [42] that is not observed under treatment with E2 [43]. In our study, P4H induced a reduction of the proliferation index and increased the apoptotic rate, supporting the protective role of P4 to gastric damage.

In summary, sex steroid hormones have a differential effect on the response of the gastric mucosa to early *H. pylori* infection in gerbils. E2 induces an inflammatory response, epithelial cell proliferation, and maintains G-cell number; whereas P4, at high doses, exerts an anti-inflammatory effect, induces apoptosis, atrophy, and reduces the G-cell number. As these effects were observed in the early phase, we are currently studying E2 and P4 at sub-acute and chronic phases of *H. pylori* infection, which are necessary to better characterize this new animal model.

Acknowledgements

We thank Flora García-Formentí from Centro de Estudios de Lenguas Extranjeras, Universidad Nacional Autónoma de México, for the revision of the English manuscript; Verónica Luqueño and Gumaro Cano from Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición for technical assistance and Jesús Serrano and Gerardo Rivas from Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, for their help with data analysis.

References

- 1 Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997;388:539–47.
- 2 Parsonnet J, Friedman G, Vandersteen DP, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991;325:1127–31.
- 3 Wee A, Kang JY, Teh M. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: correlation with gastritis, intestinal metaplasia, and tumor histology. *Gut* 1992;33:1029–32.
- 4 Hussel T, Isaacson P, Crabtree JE. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993;342:571–4.
- 5 Peek RM, Wirth HP, Moss SF, Yang M, Abdalla AM, Tham KT, Zhang T, Tang LH, Modlin IM, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* alters gastric epithelial cell cycle events and gastrin secretion in Mongolian gerbil. *Gastroenterology* 2000;118:48–59.
- 6 Peek RM. *Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric mucosal cellular turnover: implications for carcinogenesis. *J Gastroenterol* 2002;37:10–6.
- 7 Rokkas T, Ladas S, Liatsos C, Petridou E, Papatheodorou G, Theocharis S, Karameris A, Raptis S. Relationship of *Helicobacter pylori* Cag A status to gastric cell proliferation and apoptosis. *Dig Dis Sci* 1999;44:487–93.
- 8 Stemmermann GN, Nomura AMY, Kolonel LN, Goodman MT, Wilkens LR. Gastric carcinoma, pathology findings in a multiethnic population. *Cancer* 2002;95:744–50.
- 9 Sipponen P, Correa P. Delayed rise in incidence of gastric cancer in females results in unique sex ratio (M/F) pattern: etiologic hypothesis. *Gastric Cancer* 2002;5:213–9.
- 10 Yao JC, Schnirer I, Reddy S, et al. Effects of sex and racial/ethnic group on the pattern of gastric cancer localization. *Gastric Cancer* 2002;5:208–12.
- 11 Court M, Robinson PA, Dixon MF, Jeremy AH, Crabtree JE. The effect of gender on *Helicobacter felis*-mediated gastritis, epithelial cell proliferation, and apoptosis in the mouse model. *J Pathol* 2003;201:303–11.
- 12 Aebischer T, Laforsch S, Hurwitz R, Brombacher F, Meyer TF. Immunity against *Helicobacter pylori*: significance of interleukin 4 receptor α chain status and gender of infected mice. *Infect Immun* 2001;69:556–8.
- 13 Campbell-Thompson M, Lauwers GY, Reyher KK, Cromwell J, Shiverick KT. 17 β -estradiol modulates gastroduodenal preneoplastic alterations in rats exposed to the carcinogen N-methyl-N'-nitro-N nitrosoguanidine. *Endocrinology* 1999;140:4886–94.
- 14 Aguwa CN. Effects of exogenous administration of female sex hormones on gastric secretion and ulcer formation in the rat. *Eur J Pharmacol* 1984;104:79–84.
- 15 Messa C, Pricci M, Linsalata M, Russo F, Di Leo A. Inhibitory effect of 17 β -estradiol on growth and the polyamine metabolism of a human gastric carcinoma cell line (HGC-27). *Scand J Gastroenterol* 1999;34:79–84.
- 16 Messa C, Russo F, Pricci M, Di Leo A. Epidermal growth factor and 17 β -estradiol effects on proliferation of a human gastric cancer cell line (AGS). *Scand J Gastroenterol* 2000;35:753–8.
- 17 Pricci M, Linsalata M, Russo F, Messa C, Amati L, Caradonna L, Jirillo E, Di Leo A. Effects of 17 β -estradiol administration on apoptosis and polyamine content in AGS cell line. *Anticancer Res* 2001;21:3215–20.
- 18 Marchetti M, Aricó B, Burrioni D, et al. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 1995;267:1655–8.
- 19 Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 1998;115:642–8.
- 20 Ikeno T, Ota H, Sugiyama A, et al. *Helicobacter pylori*-induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils. *Am J Pathol* 1999;154:951–60.
- 21 Fox JG, Dangler CA, Taylor NS, et al. High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice. *Cancer Res* 1999;59:4823–8.

- 22 Ohkusa T, Okayasu I, Miwa H, Ohtaka K, Endo S, Sato N. *Helicobacter pylori* infection induces duodenitis and superficial duodenal ulcer in Mongolian gerbils. *Gut* 2003;52:797–803.
- 23 Crabtree JE, Court M, Aboshikiwa MA, Jeremy AHT, Dixon MF, Robinson PA. Gastric mucosal cytokine and epithelial cell responses to *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J Pathol* 2004;202:197–207.
- 24 Zheng O, Chen XY, Shi Y, Xiao SD. Development of gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:1192–8.
- 25 Cariton AE. Experimental surgery of the genital system. In: Gay WI, Havner JE, eds. *Methods of Animal Experimentation: Vol. 7; Research Surgery and Care of the Research Animal; Part B Surgical Approaches to Organ Systems*. Orlando, FL: Academic Press, Inc., 1986;191.
- 26 Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* *ice A*, *cag A*, and *vac A* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 1999;37:2274–9.
- 27 Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer CJH, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993;41:7–12.
- 28 Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161–81.
- 29 Kaushic C, Zhou F, Murdin AD, Wira CR. Effects of estradiol and progesterone on susceptibility and early immune responses to *Chlamydia trachomatis* infection in the female reproductive tract. *Infect Immun* 2000;68:4207–16.
- 30 Kita E, Yagyu Y, Nishikawa F, Hamuro A, Oku D, Emoto M, Katsui N, Kashiba S. Alterations of host resistance to mouse typhoid infection by sex hormones. *J Leukoc Biol* 1989;46:538–46.
- 31 Mohammadi M, Nedrud J, Redline R, Lycke N, Czinn SJ. Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. *Gastroenterology* 1997;113:1848–57.
- 32 Despahde R, Khalili H, Pergolizzi RG, Michael SD, Chang MDY. Estradiol down-regulated LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:46–54.
- 33 Miller L, Hunt JS. Regulation of TNF-alpha production in activated mouse macrophages by progesterone. *J Immunol* 1998;160:5098–104.
- 34 Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Shiratori Y, Omata M. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Mol Pathol* 2002;55:284–5.
- 35 Karat D, Brothrick I, Shenton BK, Scott D, Raimes SA, Griffin SM. Expression of oestrogen and progesterone receptors in gastric cancer: a flow cytometric study. *Br J Cancer* 1999;80:1271–4.
- 36 Wu CW, Chi CW, Chang TJ, Lui WY, P'eng FK. Sex hormone receptors in gastric cancer. *Cancer* 1990;65:1396–400.
- 37 Wu CW, Chang YF, Ye TH, Chang TJ, Lui WY, P'eng FK. Steroid hormone receptors in three human gastric cancer cell lines. *Dig Dis Sci* 1994;39:2689–94.
- 38 Campbell-Thompson M, Reyher KK, Wilkinson LB. Immunolocalization of estrogen receptor α and β in gastric epithelium and enteric neurons. *J Endocrinol* 2001;171:65–73.
- 39 Le Goascogne C, Sananes N, Eychenne B, Gouézou M, Baulieu EE, Robel P. Androgen biosynthesis in the stomach: expression of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase messenger ribonucleic acid and protein, and metabolism of pregnenolone and progesterone by parietal cells of the rat gastric mucosa. *Endocrinology* 1995;136:1744–52.
- 40 Ueyama T, Shirawasa N, Ito T, Tsuruo Y. Estrogen-producing steroidogenic pathways in parietal cells of the rat gastric mucosa. *Life Sci* 2004;74:2327–37.
- 41 Lanciers D, Despinasse B, Mehta DI, Blecker U. Increased susceptibility to *Helicobacter pylori* infection in pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999;7:195–8.
- 42 Machowska A, Szlachcic A, Pawlik M, Brzozowski T, Konturek SJ, Pawlik WW. The role of female and male sex hormones in the gastric healing process of preexisting lingual and gastric ulcerations. *J Physiol Pharmacol* 2004;55:91–104.
- 43 Montoneri C, Drago F. Effects of pregnancy in rats on cysteamine-induced peptic ulcers: role of progesterone. *Dig Dis Sci* 1997;42:2572–5.