



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITÁN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**ASOCIACIÓN ENTRE LAS LESIONES HISTOPATOLÓGICAS Y LA  
EXPRESIÓN GÉNICA DE *Helicobacter pylori* EN UN MODELO MURINO**

T E S I S  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
MVZ JOSÉ ARTURO FLORES PALACIOS

TUTOR: GONZALO CASTILLO ROJAS  
FACULTAD DE MEDICINA UNAM

COMITÉ TUTOR:  
DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ  
DR. GILBERTO CHÁVEZ GRIS  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

MÉXICO, D.F. A MARZO DE 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue desarrollado en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana, del departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la Tutoría del Dr. Gonzalo Castillo Rojas, al cual agradezco su comprensión, tolerancia y solidaridad en los momentos más difíciles durante mi estancia.

Agradezco el apoyo y la Co-tutoría a la Dra. Yolanda López Vidal. Por su capacidad de liderazgo, exigencia y tenacidad. Que por llevarme y mantenerme a límite, aprendí más sobre mi mismo. ¡Gracias por no correrme!

A los miembros de mi comité tutor, Dr. Antonio Verdugo, por hacerle honor a su apellido, por su sarcasmo, exigencias y consejos en los momentos oportunos que me mantuvieron a flote.

Al Dr. Gilberto Chávez por su humildad, paciencia, consejo y sabiduría, por enseñarme que la ciencia también se disfruta y su visión de la vida.

Al Dr. Francisco García por su ideología, apoyo incondicional, asesoría, amistad y consejo que me sirvieron durante este arduo camino.

A mi querida familia y amigos quienes con su consejo, comprensión, tolerancia, paciencia, sabiduría y apoyo incondicional contribuyeron a que todo esto fuera posible. Disculpen la ingratitud que tuve con ustedes.

A mis compañeros de los diferentes laboratorios, pues compartimos frustraciones, buenos, malos y peores momentos, pero que aún con ello aprendimos a disfrutar y reírnos de nuestra desgracia ja ja ja ja.

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con los proyectos SALUD2009-C01-112588 e ICyTDF/150/2012. El sustentante fue becario del CONACyT en el programa Becas Nacionales durante el periodo 01 de febrero del 2012 al 31 de enero del 2014.

Al Histotecnólogo Marco Antonio Aguilar Urbano por su amistad y apoyo en los cortes y tinciones histopatológicas que se presentan en esta tesis.

A la QFB. Rosa Isabel Amieva Fernández por su apoyo en el cultivo microbiológico de las cepas de *H. pylori* empleadas en este trabajo así también por sus apapachos, gritos y buenos momentos.

A el estudiante Gabriel Santiago por su apoyo en la elaboración de las pruebas de PCR que se presentan en esta tesis.

## **DEDICATORIAS**

Deja ya de engañarte. Eres la causa de ti mismo, de tu tristeza, de tu necesidad, de tu dolor, de tu fracaso o de tus éxitos, alegría y paz.

**Jorge V. Santamaría**

## ÍNDICE GENERAL

	Página
i <b>AGRADECIMIENTOS</b>	ii
ii <b>DEDICATORIAS</b>	iii
iii <b>ÍNDICE GENERAL</b>	iv
iv <b>RESUMEN</b>	vi
v <b>ABREVIATURAS</b>	vii
1 <b>INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Historia	1
1.2 Características microbiológicas de <i>H. pylori</i>	1
1.3 Epidemiología	1
1.3.1 Vías de transmisión	2
1.4 Patogénia	2
1.5 Presentación clínica	3
1.5.1 Úlcera péptica	3
1.5.2 Tejido Linfoide Asociado a Mucosa (Linfoma MALT)	4
1.5.3 Cáncer gástrico	5
1.6 Factores de Virulencia	6
1.6.1 Proteína Asociada a la Citotoxina (CagA)	6
1.6.2 Citotoxina Vacuolizante (VacA)	7
1.6.3 Adhesinas	8
1.7 Diagnóstico Histopatológico	8
1.7.1 Clasificación de Sydney	9
1.8 Modelos animales para el estudio de la infección por <i>H. pylori</i>	9
1.8.1 Primates no humanos	9
1.8.2 Gerbo ( <i>Meriones unguiculatus</i> )	10
1.8.3 Perros y gatos	10
1.8.4 Otros animales reportados	11
1.8.5 Rata y ratón	11
1.8.6 Embriones de pollo	

2 **JUSTIFICACION**

3 **OBJETIVOS**

3.1 Objetivo General

3.2 Objetivos específicos

4 **HIPÓTESIS**

5 **METODOLOGÍA**

5.1 Cultivo y preparación del inóculo de *H. pylori*

5.2 Infección de ratones Balb/c con *H. pylori*

5.3 Toma de muestra vena mandibular

5.4 Inoculación de *H. pylori* dosis única

5.5 Inoculación de *H. pylori* dosis triple

5.6 Fase quirúrgica y determinación de pH gástrico

5.7 Recolección de muestras gástricas

5.8 Cultivo microbiológico a partir de biopsia de ratón

5.9 Procesamiento de las biopsias gástricas de ratón para histopatología  
(Giemsa e IHQ)

5.9.1 Criterios de Evaluación Histopatológica

5.9.2 Extracción de ADN a partir de biopsias gástricas de ratón

5.9.3 PCR-Hibridación del Gen *16S RNA ribosomal*

5.9.4 Inoculación de *H. pylori* en embrión de pollo

5.9.5 Evaluación macroscópica del embrión de pollo y cultivo de  
Saco Vitelino

6 **RESULTADOS**

7 **DISCUSIÓN**

8 **CONCLUSIONES**

9 **PERSPECTIVAS**

10 **BIBLIOGRAFÍA**

11 **ANEXOS**

## RESUMEN

*Helicobacter* se encuentra en más del 50% de la población mundial humana y es causa de enfermedad en cerdos, aves, gatos y perros, y su relevancia en la zoonosis es controversial. La infección del microorganismo en humanos se asocia al desarrollo de gastritis crónica, úlcera gástrica o duodenal y adenocarcinoma gástrico. Este último considerado como la segunda causa de muerte a nivel mundial. La severidad y localización del proceso inflamatorio de la infección por *H. pylori* en individuos con gastritis predominante en antro tienen mayor riesgo de úlcera duodenal, en contraste, sujetos con gastritis severa predominantemente en cuerpo del estómago e hipoclorhidria, presentan un mayor riesgo para el cáncer gástrico. Además, el pH gástrico y el polimorfismo en IL-1 $\beta$ , facilitan la colonización de *H. pylori* en el cuerpo gástrico y/o reducen la secreción ácida, lo que provoca mayor susceptibilidad para desarrollar cáncer gástrico. *H. pylori* suprime la respuesta inflamatoria en su microambiente gástrico, mediante mecanismos diferentes a alguno de los efectores en la respuesta inmune, que ocasiona incremento en su colonización y facilita la cronicidad de la infección. La topografía de la infección por *H. pylori*, mostró una distribución uniforme en el estómago de pacientes dispépticos y predominancia de *cagA+* en fondo y cuerpo, en contraste, los pacientes con cáncer gástrico, *H. pylori* se presentó en el fondo y cuerpo gástrico. Los modelos murinos son ideales para este tipo de experimentos debido a que desarrolla lesiones similares a las del humano así como el fondo genético uniforme que facilita su estudio. El objetivo del estudio es establecer un modelo murino de infección para cepas de *H. pylori* aisladas de distintos casos clínicos mediante el uso de técnicas moleculares e histopatológicas para caracterizar las diferentes lesiones o posibles patologías. Para ello se utilizaron ratones machos Balb/c, de 6-8 y 12-14 semanas de edad, divididos en grupo control y experimental para cada una de las cepas obtenidas de distintos casos clínicos (Hp CGA, Hp UPH y Hp GC), a los cuales se les tomó suero e inoculó con una dosis de  $1 \times 10^7$  y  $1.2 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias de *H. pylori*. Las muestras adquiridas se utilizaron para determinar colonización, inflamación y daño histopatológico a partir del día 1, 7, 14, 90 y 180 post-inoculación oral. En un segundo esquema a las 2, 4, 6, 12 y 24 semanas por la misma vía. En cada tiempo se determinaron los niveles de pH gástrico y se analizaron utilizando la Prueba de Mann-Whitney con una  $P < 0.05$ , para la cepa CGa se encontró diferencia significativa a los 7 y 180 días donde los

animales infectados mostraron un pH inferior a 4 con respecto al grupo control. En ratones infectados con la cepa UPH se observó que el pH en la mayoría de los tiempos fue ligeramente menor que en el grupo control. Al analizar los cortes histopatológicos de ratones de 6-8 semanas infectados con la cepa CGa y el primer esquema de infección en donde se encontró, gastritis erosiva y gastritis ulcerativa, en contraste, los ratones del grupo control desarrollaron infiltrado inflamatorio linfocitario leve-moderado y gastritis focal erosiva. Los ratones de 12-14 semanas infectados con la cepa UPH desarrollaron gastritis ulcerativa en contraste los ratones del grupo control desarrollaron solamente gastritis erosiva. Posteriormente, se demostró la presencia de *H. pylori* por inmunohistoquímica en las cepas CGa y UPH y se confirmó mediante las técnicas de PCR-Hibridación. En conclusión, se observaron lesiones de gastritis erosiva con la cepa proveniente de cáncer gástrico Hp29CaP, mientras que con la cepa proveniente de úlcera péptica hemorrágica Hp62A9, se observaron lesiones de gastritis ulcerativa. Asimismo, se observó la presencia de *H. pylori* en tejido gástrico de ratón con ambas las cepas Hp29CaP y Hp62A9, las cuales fueron capaces de persistir crónicamente, a diferencia de la cepa aislada de gastritis crónica Hp7C.



## ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
AGS	Células Epiteliales Gástricas
BabA	Blood group Antigen Binding Adhesin
BHI	Brain Heart Infusion Broth
CagA	Proteína asociada a la citotoxina
<i>cag</i> PAI	Isla de Patogenicidad <i>cag</i>
CM	Complejo de Multimerización
DANE	Drogas anti-inflamatorias no esteroideas
EPIYA	Glutamato-prolina-isoleucina-tirosin- alanina
Grb2	Receptor de la proteína de unión 2 al factor de crecimiento
Hop	Porinas de membrana externa
Hor	Porinas relacionadas a membrana externa
Hp CGa	<i>Helicobacter pylori</i> obtenida de cáncer gástrico
Hp GC	<i>Helicobacter pylori</i> obtenida de gastritis crónica
Hp UPH	<i>Helicobacter pylori</i> obtenida de úlcera péptica hemorrágica
HTM	<i>Haemophilus</i> Test Medium
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBP	inhibidor de bomba de protones
IHQ	Inmunohistoquímica
JAM	Moléculas de adhesión a la unión
LPS	Lipopolisacárido
MALT	Tejido Linfoide Asociado a Mucosa
MCL-1	Myeloid cell leukaemia sequence-1 protein
MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-nitroguanidina
NMU	N-metil-N-nitrosurea
OipA	Outer inflammatory protein
OMS	Organización Mundial de la Salud
Par1	Receptores de activación de proteasas
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PBST	Buffer Salino de Fosfatos con Tween

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrogeniones
RAS	Proteínas de regulación molecular
RNA	Ácido ribonucleico
RUNX3	Proteína de factor de transcripción
SabA	Sialic Acid-Binding Adhesin
SHP2	Phosphatase tyrosina
SPF	Specific Pathogen Free
SS1	Sydney Strain
SSF	Solución Salina Fisiológica
SSTIV	Sistema de Secreción Tipo IV
ZO-1	Proteína de unión estrecha

# 1 Introducción

## 1.1 Historia

En el año de 1982 los doctores Robin Warren y Barry J Marshall obtuvieron el primer cultivo de una bacteria en forma de espiral aislada de biopsias gástricas de pacientes con gastritis. El descubrimiento de esta bacteria ahora conocida como *Helicobacter pylori* revoluciono la gastroenterología, puesto que cambio el concepto fundamental de que toda enfermedad gastroduodenal tenia una base fisiopatológica [1].

Actualmente, conocemos que esta bacteria se encuentra en más de la mitad de la población humana mundial y se considera el agente causal de gastritis, úlcera gástrica, úlcera duodenal y esta fuertemente asociado al desarrollo de cáncer gástrico, el cual es considerado la segunda causa de muerte a nivel mundial [2]. *H. pylori* probablemente ha acompañado al ser humano por miles de años y se ha planteado que la colonización de *H. pylori* ha provisto beneficios al ser humano proporcionándole una ventaja selectiva a lo largo de la historia de la humanidad [3].

Actualmente, esta bacteria gramnegativa es considerada el principal factor de riesgo en todo el mundo para desarrollar gastritis crónica y carcinogénesis gástrica [4]. En 1994 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a *Helicobacter pylori* como un carcinogénico del tipo I (IARC, OMS, 1994) por lo que ahora es considerado como el agente etiológico más común de cánceres relacionados a infecciones, el cual representa 5.5% de los casos mundiales de cáncer [4, 5]. En 2005 les fue otorgado a Marshall y Warren el Premio Nobel de Medicina por el descubrimiento de la bacteria y por demostrar su participación en la enfermedad de úlcera péptica [4, 5].

## 1.2 Características microbiológicas de *H. pylori*

*Helicobacter pylori* es una bacteria gramnegativa, en forma de espiral, sin embargo, se pueden encontrar formas cocoides en cultivos y biopsias gástricas viejas, este bacilo mide

aproximadamente 0.5-1  $\mu\text{m}$  de ancho por 2-4  $\mu\text{m}$  de largo, posee de 2-6 flagelos lofótricos que le permiten desplazarse a través de la capa de mucosa del epitelio gástrico, es microaerófilico, catalasa, ureasa y oxidasa positivo [6, 7].

*H. pylori* es un microorganismo de crecimiento lento, sus colonias son pequeñas, húmedas convexas y transparentes, para su crecimiento requiere medios complejos como Agar Sangre, Columbia, Brucella, entre otros, los cuales deben estar suplementados (sangre de carnero, caballo, suero de caballo, suero fetal bovino, emulsión de yema de huevo) e incubados bajo condiciones de microaerofilia (5% de  $\text{O}_2$ , 10%  $\text{CO}_2$ ), a una temperatura de 37°C para lograr su crecimiento [8, 9].

### **1.3 Epidemiología**

La infección por *H. pylori* constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial, pues se estima que cerca del 50% de la población humana está infectada crónicamente por este microorganismo. La prevalencia de la enfermedad varía ampliamente entre y dentro de grupos poblacionales, lo cual es atribuido principalmente a la condición socioeconómica, así como a los servicios sanitarios básicos con los que cuentan dichas poblaciones además de la raza, área geográfica y edad [10, 11]. Asociado a esto las tasas de infección parecen ser más altas en países en vías de desarrollo, presentando tasas de infección cercanas al 90%, mientras que en países desarrollados (Europa occidental, Norteamérica y Oceanía), las tasas de infección son menores a 30% [11, 12].

En un estudio realizado en Estados Unidos, se evaluó la prevalencia de la infección de acuerdo al nivel socioeconómico de un grupo de niños, en el cual observaron, que en la clase socioeconómica baja hay un 85% de prevalencia, en comparación con la clase socioeconómica mas alta donde la prevalencia fue del 11% [13].

Por otro lado, en México se analizó la seroprevalencia de *H. pylori* en sueros provenientes de hombres y mujeres de toda la Republica Mexicana (1-90 años) representativos de todas las edades y niveles socioeconómicos, en el que encontraron una prevalencia del 66% y en

donde la infección se adquiere a una edad temprana, ya que a los 10 años, el 50% de la población ya está infectada y a la edad adulta el 80% fueron positivos [14].

### **1.3.1 Vías de Transmisión**

Se ha planteado que las formas de transmisión de *H. pylori* más probables son de persona a persona por vía oral-oral y fecal-oral, ya que la propagación puede ocurrir por contacto directo de la persona infectada o por malas condiciones sanitarias, hacinamiento o a partir de agua o alimentos contaminados.

Evidencia que soporta estas vías de transmisión han sido descritas, en algunos estudios, donde se detecta la presencia de *H. pylori* en heces humanas por cultivo y PCR [15]. También se ha detectado en gran medida por PCR en placa dental y saliva, sin embargo este tipo de estudios son problemáticos por que utilizando medios de cultivo selectivo, muchas otras bacterias resistentes a los antibióticos adicionales crecen, y la detección por PCR no indica viabilidad o transmisibilidad del microorganismo.

Por ello, se ha postulado la transmisión por regurgitación ya que *H. pylori* habita el estómago y ha sido aislado de este jugo gástrico, por lo que puede ser una fuente más probable de transmisión [16].

Debido a la alta prevalencia en niños menores a 10 años que llega a ser del 50% en todo el mundo, es importante identificar los mecanismos de transmisión en la niñez, siendo los factores de riesgo el nivel socioeconómico, hacinamiento, gran número de hermanos, condiciones sanitarias deficientes, agua contaminada y etnia [17].

## **1.4 Patogenia**

Una vez que *H. pylori* ingresa a la mucosa gástrica es capaz de colonizar el epitelio aun cuando este sea un medio hostil para la bacteria, aunque esta bacteria sea sensible al pH ácido, es capaz de amortiguar su microambiente mediante la producción de grandes

cantidades de ureasa, una enzima que transforma la urea en amonio y dióxido de carbono lo que permite neutralizar el efecto del jugo gástrico. Además posee capacidad quimiotáctica a gradientes de pH y múltiples flagelos que le permiten desplazarse por la capa de mucina y llegar a células epiteliales donde se encuentra un pH neutro [18].

El *Helicobacter pylori*, una vez en la mucosa gástrica se adhiere a las células epiteliales gástricas que provocan cambios o modificaciones en la superficie celular o en el citoesqueleto. Las adhesinas de *H. pylori* más estudiadas son las proteínas de membrana externa, estas proteínas se unen a glicoproteínas celulares. La adhesina BabA se une a un grupo antigénico de Lewis-b glucosilado. La proteína de membrana externa SabA se adhiere a glicoproteínas sialiladas, específicamente al antígeno sialil-Lewis-X [18].

Estas interacciones entre adhesinas y factores de virulencia, contribuyen al proceso inflamatorio de la mucosa gástrica durante el periodo de infección, la cual puede evolucionar en diferentes lesiones [18].

## **1.5 Presentación clínica**

La infección por *H. pylori* ocurre principalmente en la infancia y es generalmente asintomática. Sin embargo, puede asociarse a una dispepsia significativa, con dolor abdominal, náuseas y halitosis, aunque en la mayoría de los sujetos permanece desapercibida. La evolución de la infección es caracterizada histológicamente por gastritis persistente (inflamación de mucosa del estómago). Del cien por ciento de los infectados la mayoría permanece asintomáticos (85%), mientras que cerca del 10% desarrolla úlcera péptica, 1 a 3% cáncer gástrico y menos del 0.1% linfoma tipo MALT (Tejido linfoide asociado a mucosa) [19].

### **1.5.1 Úlcera péptica**

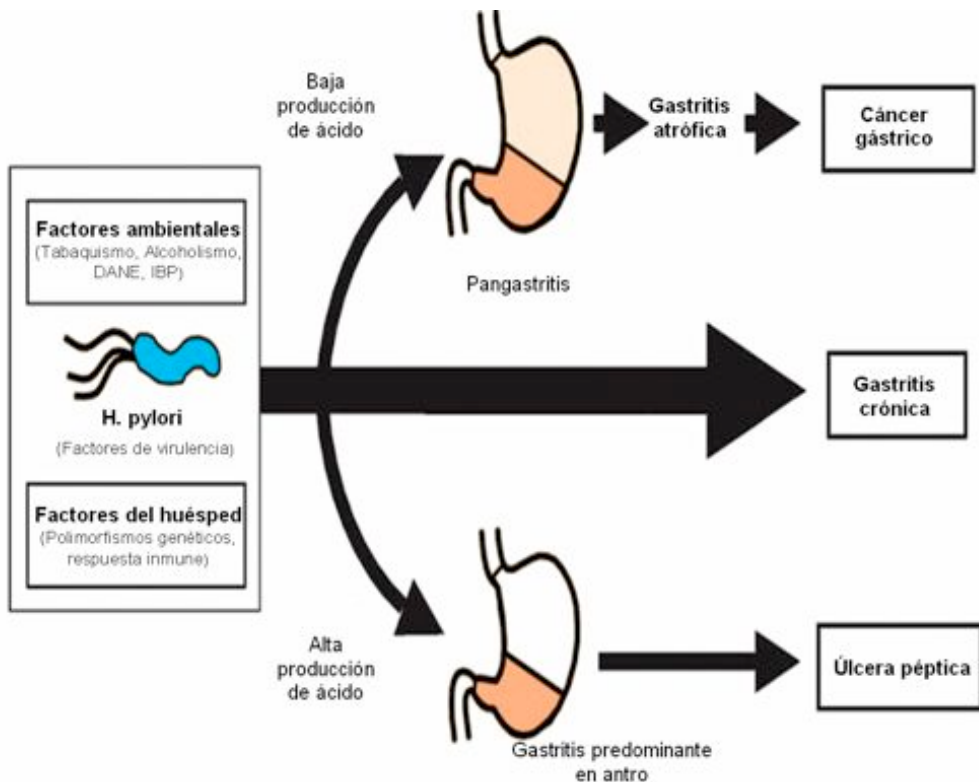
La colonización por *H. pylori* provoca la infiltración de células polimorfonucleares y mononucleares de la mucosa gástrica. Sin embargo, los pocos datos que se conocen hacen

referencia a que los sujetos infectados pueden asociarse con signos dispépticos no específicos, como sensación de plenitud y vomito. Esta fase se asocia con hipoclorhidria la cual puede durar meses. Es probable que la infección inicial pueda resolverse rápidamente por mecanismos desconocidos, sin embargo, cuando la infección persiste se correlaciona con la producción de ácido y la distribución de gastritis [20].

La úlcera péptica se define como la pérdida de la integridad de la mucosa gástrica o duodenal en lesiones con diámetros de al menos 0.5 cm y que penetra hasta la muscular de la mucosa. La úlcera gástrica se presenta más comúnmente a lo largo de la curvatura menor del estómago, en particular en la transición de cuerpo a antro. La úlcera duodenal se localiza en el área del bulbo duodenal siendo esta el área más expuesta al ácido gástrico [20].

Los individuos con úlcera gástrica cursan con altos niveles de inflamación del cuerpo, atrofia gástrica multifocal y bajos niveles de secreción ácida debido a la destrucción de células parietales. La úlcera duodenal, se caracteriza por gastritis confinada a la región del antro, con una relativa baja inflamación del cuerpo y altos niveles de secreción de ácido [19].

Según Kusters en sujetos con secreción ácida intacta *H. pylori* coloniza el antro gástrico, donde la cantidad de ácido gástrico es menor, la evaluación histológica del cuerpo revela colonización leve y poca inflamación. Por otro lado sujetos en los que la secreción ácida se deteriora, la bacteria se distribuye en antro y cuerpo provocando una pangastritis, esta predispone al desarrollo de atrofia gástrica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico [20].



**Figura 1.** Representación esquemática de los factores que contribuyen a la patología gástrica y el desarrollo de enfermedad en una infección con *H. pylori* (Tomado y adaptado de Kusters *et al*, 2006). DANE=Drogas anti-inflamatorias no esteroideas, IBP= inhibidor de bomba de protones.

En contraste un estudio realizado por López-Vidal y colaboradores en el cual tomaron sistemáticamente tres biopsias gástricas de cada uno de los sitios del estómago (antro, porción angular, cuerpo y fondo), encontraron que la colonización de *H. pylori* en pacientes dispepticos estaba distribuido uniformemente en todo el estómago, mientras que los pacientes con cáncer gástrico presentaron una colonización preferente del fondo y cuerpo del estómago [21].

### 1.5.2 Tejido Linfoide Asociado a Mucosa (Linfoma TLAM)

La mucosa gástrica en respuesta a la colonización por *H. pylori* siempre desarrolla MALT y en algunos casos raros puede surgir una población de células monoclonales B y proliferar hasta formar un linfoma tipo MALT [20]. El diagnóstico histológico de rutina demuestra



que los pacientes con linfoma gástrico son *H. pylori* positivos. Sujetos infectados con *H. pylori* presentan un riesgo mayor para desarrollar linfoma MALT, sin embargo solamente ocurre en menos del 1% de los pacientes positivos a *H. pylori* [20].

### **1.5.3 Cáncer gástrico**

Al carcinoma gástrico es la segunda causa más común de muerte relacionada a cáncer en todo el mundo, representando 560,000 nuevos casos y 405,000 muertes por año, en un estudio prospectivo se demostró que el riesgo de padecer cáncer gástrico es mas elevado en personas infectadas con *H. pylori* que las no infectadas. La erradicación de *H. pylori* disminuye significativamente el desarrollo de carcinoma gástrico en pacientes infectados con *H. pylori* y sin lesiones precancerosas. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales *H. pylori* provoca cáncer gástricos aun son desconocidos [22].

Antes de que se reconociera la asociación de *H. pylori* con el desarrollo de carcinoma gástrico se habían propuesto diferentes clasificaciones para carcinoma, siendo la de Jarvi y Lauren la más aceptada. Ellos propusieron que el carcinoma se originaba de islas de epitelio intestinal encontrado en mucosa gástrica, concluyendo que estas surgían a partir de una gastritis crónica [23].

Correa Pelayo postuló una secuencia de cambios patológicos que van de gastritis crónica a gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia y eventual desarrollo de cáncer gástrico [24].

Laurent estableció dos categorías para identificar el cáncer tipo intestinal y el de tipo difuso. El cáncer tipo intestinal es más común en pacientes viejos y está más relacionado con factores medioambientales y dietarios. En contraste el cáncer de tipo difuso afecta a jóvenes, es menos común y de peor pronóstico, la casusa es principalmente de origen genético y está asociado a mutaciones en el gen de la caderina-E. Estudios recientes mencionan que ambos tipos de cáncer están estrechamente relacionados con la infección por *H. pylori*, sin embargo para el tipo intestinal la incidencia ha venido disminuyendo [23].

Basados en estudios epidemiológicos sobre las dietas, el primer paso para el desarrollo de inflamación gástrica podría iniciarse por una dieta rica en sal (NaCl) y nitratos/nitritos, así como, deficiencias en la ingesta de frutas y verduras frescas [23].

Histológicamente el cáncer gástrico de tipo difuso consiste en infiltrado de células neoplásicas que no forman estructuras glandulares, en contraste el cáncer tipo intestinal o adenocarcinoma se caracteriza por ser progresivo, el cual se presenta mediante una serie de eventos histológicos bien definidos descritos en 1975 (atrofia, metaplasia, displasia y cáncer). El adenocarcinoma tipo intestinal inicia por la transición de la mucosa normal a gastritis crónica superficial seguido por gastritis atrófica y metaplasia intestinal, lo que provoca displasia y finalmente el desarrollo de adenocarcinoma [4].

Una gastritis predominante en el cuerpo del estómago predispone a cáncer gástrico, en parte debido a la disminución de la secreción ácida. En contraste, la infección principalmente en el antro gástrico resulta en un incremento de la producción ácida, lo que predispone a úlcera duodenal, la cual está asociada con una disminución en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

## **1.6 Factores de Virulencia**

Debido a la heterogeneidad presente dentro de los genomas de *H. pylori* que han sido secuenciados, los factores de virulencia de la bacteria juegan un papel determinante en el desenlace de la infección. La isla de patogenicidad *cag* (*cag* PAI) es un elemento de inserción de DNA de 40 kb, la cual contiene de 27 a 31 genes flanqueados por una secuencia de 31 pb directamente repetidas y que codifica para la proteína CagA [4].

Aunque todas las cepas de *H. pylori* inducen gastritis, las cepas que contienen la isla de patogenicidad *cag*, aumentan el riesgo de desarrollar gastritis severa, gastritis atrófica y cáncer gástrico en comparación con las cepas que son negativas a la presencia de esta isla de patogenicidad. Al menos 18 genes de la *cag* PAI codifican para componentes de un

sistema de secreción tipo IV (SSIV), el cual transporta proteínas a través de la membrana bacteriana hacia las células epiteliales del hospedero [4].

Varios factores de virulencia desempeñan una función importante en el desarrollo de la enfermedad. Muchos de estos factores están relacionados con la promoción de respuesta inflamatoria, quizás la respuesta más importante en la infección por *H. pylori*. Los factores de virulencia de *H. pylori* más estudiados son: la citotoxina vacuolizante (VacA) y la proteína asociada a la citotoxina (CagA). Estos factores de virulencia son polimórficos en su estructura, y determinadas variantes se asocian al desarrollo de patología gástrica. Así por ejemplo, el polimorfismo s1/i1/m1 de la citotoxina vacuolizante y el motivo EPIYA-D de CagA se asocian con mayor frecuencia a cáncer gástrico y úlcera péptica [22].

### **1.6.1 Proteína asociada a la Citotoxina (Cag A)**

Después de que *H. pylori* se une a las células del hospedero, CagA una proteína de 120 a 140 kDa, es translocada a través de un sistema de secreción tipo IV. Una vez dentro de la célula del hospedero CagA es fosforilada en sus motivos glutamato-prolina-isoleucina-tirosin-alanina (EPIYA) estos motivos induce cambios morfológicos denominados “fenotipo colibri” el cual esta asociado con un incremento en la migración celular. Cuatro diferentes motivos EPIYA se han identificado (A, B, C y D) en la proteína CagA, en la región polimórfica del extremo carboxilo terminal, los cuales se distinguen por diferentes secuencias de aminoácidos alrededor de los motivos EPIYA. Los motivos EPIYA-A y B están presentes en todas las cepas del mundo, mientras que en cepas de países occidentales el motivo EPIYA-C es el que se encuentra normalmente en estas cepas, un número incrementado del motivo EPIYA-C es un importante indicador para el desarrollo de atrofia gástrica y cáncer gástrico. El motivo EPIYA-D es casi exclusivo de cepas de Oriente, las cuales inducen grandes cantidades de interleucina-8 (IL-8 o CXCL-8) por parte de las células epiteliales gástricas [4].

La integridad de la mucosa es mantenida por el balance entre la proliferación y muerte celular. El desarrollo de adenocarcinoma gástrico es un proceso que requiere la alteración

en la expresión de genes, incluyendo oncogenes y genes supresores de tumores, entre otros. Cuando las células epiteliales gástricas son expuestas continuamente a la proteína CagA de la bacteria, esta desregula la función de la SHP2 (fosfatasa de tirosina). La activación de SHP2 por CagA induce rápidamente apoptosis en cultivo de células epiteliales gástricas. SHP2 también puede actuar como un activador de la vía de señalización RAS, esta actividad proapoptótica de CagA puede ser causa una desregulación de señales mitogénicas generadas por la interacción CagA-SHP2 como ha sido mostrado en caso de la expresión oncogénica de RAS en células no transformadas [22].

La pérdida de células epiteliales debido a que CagA induce a apoptosis, puede llevar al desarrollo de gastritis atrófica asociada a *H. pylori*, por la disminución de glándulas y por lo tanto de la secreción ácida. El incremento en el pH gástrico podría facilitar la colonización crónica de *H. pylori* en el estómago [22].

### **1.6.2 Citotoxina Vacuolizante (VacA)**

La citotoxina vacuolizante fue identificada por primera vez como una proteína citotóxica que inducía vacuolización intracelular, posteriormente se purificó y se identificó como una proteína de 87 kDa en su forma desnaturalizada. VacA suprime la respuesta de linfocitos T en respuesta a la infección por *H. pylori* lo que puede contribuir a la cronicidad de la infección [4].

El gen *vacA* está presente en la mayoría de las cepas de *H. pylori*, sin embargo, se ha observado considerables diferencias en la actividad vacuolizante, estas diferencias se atribuyen a la variación estructural, tanto de la región señal (s), región media (m) y actualmente identificada la región intermedia (i). La región s está estratificada en subtipos s1 y s2 y codifica para el péptido señal y N-terminal de la proteína madura. La región m codifica para subunidad carboxilo terminal, la cual se clasifica como m1 o m2. Las cepas con mayor actividad vacuolizante son las que presentan el genotipo s1/m1, mientras que las s2/m2 normalmente no presentan dicha actividad. En población occidental el alelo *vacA*

s1/m1 esta asociado con úlcera gástrica y cáncer gástrico, mientras que en cepas del este de Asia no se asocian con un desenlace clínico específico [4].

La proteína VacA ejerce múltiples efectos en la estructura de células epiteliales gástricas que inducen la alteración de la función y modulación de la respuesta inflamatoria. Otros efectos incluyen la alteración de compartimentos endosomales dando como resultado la formación de vacuolas *in vitro* y la desorganización de las mitocondrias que llevan a una disminución del potencial transmembranal, la liberación del citocromo c, la activación de las caspasas-8 y -9 y la inducción de la apoptosis *in vitro* [4].

Por otro lado, VacA tiene varios efectos específicos que contribuyen a la persistencia de *H. pylori* en el epitelio gástrico, por ejemplo, la formación de poros en membranas epiteliales que permiten la salida de aniones y urea, esto le permite a *H. pylori* hidrolizar y catalizar la ureasa para protegerse del medio ácido. VacA también provoca el incremento de la permeabilidad celular, lo que permite el cruce de nutrientes a través de la barrera de la mucosa a donde se encuentra la bacteria. Estudios recientes sugieren que VacA puede inhibir la formación del fagosoma en los macrófagos, inhibe la presentación de antígenos a las células T y por lo tanto su proliferación [25].

Uno de los receptores a los cuales se une VacA a las células epiteliales gástricas es el receptor tipo proteína fosfatasa de tirosina. Este receptor regula la proliferación celular, diferenciación y adhesión, todos ellos probablemente participan en la ulcerogénesis [4].

### **1.6.3 Adhesinas**

La marcada diversidad genética en *H. pylori* es atribuible a la alta incidencia de mutaciones puntuales, así como, la extraordinaria frecuencia de recombinación homóloga dentro del genoma. Los genomas de varias cepas de *H. pylori* muestran que contienen una gran familia de aproximadamente 32 proteínas de membrana externa (proteínas Hop) que probablemente participen mediando la adhesión al epitelio gástrico [26-28].

La adhesión a las células epiteliales gástricas es un paso crucial para el establecimiento de una infección exitosa, porque esta provee de protección contra los mecanismos de defensa del hospedero, tales como el flujo de líquidos, movimientos peristálticos o desprendimiento de la capa mucosa. *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica por medio de adhesinas que le permiten unirse a las células epiteliales gástricas y a la capa mucosa que recubre el epitelio gástrico. Actualmente, se ha demostrado que *H. pylori* codifica para un extenso grupo de factores de adhesión, tales como la familia de proteínas Hop, incluye también varias adhesinas bien descritas, como BabA, SabA, Alp/B HopZ y OipA [26-28].

El lipopolisacárido (LPS) es un componente de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Una molécula típica de LPS está compuesta de tres partes (i) una fracción es el lípido A que se ancla en la capa lipídica, (ii) un núcleo conservado de polisacáridos y (iii) y un polisacárido variable de la cadena antígeno O o antígeno somático. En *H. pylori* la apariencia de los LPS pueden variar ampliamente entre diferentes aislados, la única característica de la cadena antígeno O, es que exhiben el antígeno de Lewis, estructuras que se encuentran en la superficie de algunas células humanas, como los eritrocitos y las células epiteliales [26-28].

### **1.7 Diagnóstico histopatológico**

Individuos infectados con *H. pylori* pueden desarrollar gastritis no atrófica, gastritis predominante en antro, una condición común en países industrializados y úlcera duodenal ó una gastritis progresiva, gastritis metaplasica y gastritis atrófica. La proporción de sujetos infectados que desarrollan una gastritis atrófica es mayor en poblaciones que están en vías de desarrollo, y está estrechamente relacionada con la incidencia de cáncer gástrico de tipo intestinal. La relación entre gastritis atrófica y cáncer gástrico ha sido establecida en varios estudios epidemiológicos, además el reconocimiento y cuantificación de la atrofia son percibidos como elementos importantes para determinar el riesgo y últimamente la prevención del cáncer gástrico [23].

### **1.7.1 Clasificación de Sydney**

La atrofia se ha definido como la disminución del volumen y tamaño del epitelio glandular. A pesar de la sencillez del concepto para establecer un diagnóstico histopatológico, los patólogos han tenido serias dificultades para ponerse de acuerdo para establecer las características de gastritis. Con la finalidad de establecer una menor variación interobservador en la evaluación histopatológica, se ha establecido la clasificación de Sydney. La cual consiste en establecer un diagnóstico basado en la etiología o asociación patogénica, la topografía en la cual define la distribución de las lesiones en las diferentes partes anatómicas del estómago y la morfología, con diferentes grados variables de inflamación, actividad, atrofia, metaplasia y presencia de *H. pylori*, así como los grados no variables que puede ser por causas específicas o no específicas, como el caso de lesiones por agentes químicos ó por autoinmunidad. Todo esto con la finalidad de establecer uniformidad en los criterios histopatológicos que permitan facilitar las comparaciones entre estudios diferentes [23].

### **1.8 Modelos animales para el estudio de la infección por *H. pylori***

Poco se sabe sobre los mecanismos por los cuales la infección de *H. pylori* incrementa el riesgo de desarrollar cáncer gástrico. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), enfatiza que las pruebas realizadas en animales no son suficientes para confirmar el potencial carcinogénico de *H. pylori*. Es por ello, que se han establecido diferentes modelos animales para el estudio de la infección, los cuales pretenden dilucidar los posibles mecanismos que contribuyen al desarrollo de adenocarcinoma gástrico [29].

#### **1.8.1 Primates no humanos**

El establecimiento de modelos de infección para *H. pylori* como el caso de primates no humanos, permiten el esclarecimiento de la relación de este microorganismo y el desarrollo de enfermedades gástricas. Estos modelos, son muy útiles ya que su estómago es similares

tanto fisiológicamente como anatómicamente, además de tener un promedio de vida entre 10 y 20 años, lo que permite realizar estudios a largo plazo [29].

En este modelo, se ha encontrado que la infección crónica producida por *H. pylori* en cinco años ocasiona una aparente disminución de tejido glandular pilórico, comparado con el grupo control, esto indica que la infección causa atrofia gástrica en el mono Japonés. Además, el cambio atrófico avanzó poco a poco y reveló una proliferación celular activa en la mucosa de animales infectados. Estos hallazgos demuestran que la infección por *H. pylori* provoca en el estómago, daño celular, proliferación celular, sin embargo, no se logró observar lesiones precancerosas lo que no permite el estudio de la carcinogénesis asociada a *H. pylori* [29]. Sin embargo, estos modelos animales de infección resultan difíciles de manejar, costosos de mantener y necesitan instalaciones especiales de mantenimiento, por ello no resultan ser un modelo ideal [29].

### **1.8.2 Gerbo (*Meriones unguiculatus*)**

El gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) es un pequeño roedor utilizado como modelo de infección para *H. pylori* el cual fue propuesto por Yokota *et al.*, en 1991, ya que al infectarlos con *H. pylori*, se encontró que a los dos meses desarrollaban leve infiltrado inflamatorio en la mucosa gástrica de los animales infectados. Posteriormente, en otros estudios que utilizaron gerbos, se encontró que a los 6 meses los animales infectados con *H. pylori* desarrollaban úlcera y metaplasia intestinal, y al año después de la inoculación se observó engrosamiento irregular de las paredes gástricas, hemorragias y erosiones del epitelio gástrico [29].

La secuencia de cambios histológicos en la mucosa gástrica, gastritis, atrofia y metaplasia intestinal apreciada en los gerbos de Mongolia es similar a la observada en humanos lo que permitiría el estudio de la relación entre la infección con *H. pylori* y las lesiones gástricas, incluyendo cáncer gástrico [29]. Sin embargo, algunos investigadores no han sido capaces de reproducir estos hallazgos, probablemente debido a las diferencias en el fondo genético de los gerbos.



En 1998, Tatematsu *et al.*, describieron el establecimiento de un modelo animal para el estudio de la carcinogénesis de estómago, utilizando jerbos de Mongolia y coinoculados con N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) y N-metil-N-nitrosurea (NMU) como carcinógenos; además se encontró que la infección con *H. pylori* incrementaba la incidencia de ambos tipos histológicos de adenocarcinoma inducidos con agentes químicos (MNNG y MNU) en las glándulas del estómago de jerbos de Mongolia. Sin embargo, resulta complicado conseguir este tipo de modelo animal, además los reactivos para el estudio en este modelo se encuentran comercialmente poco accesibles, por lo que resulta complicado establecer este modelo [29].

En conclusión, el gerbo provee un modelo de estudio para la patogénesis de la infección por *Helicobacter*, especialmente cáncer gástrico, sin embargo la falta de animales transgénicos o la disponibilidad de reactivos inmunológicos a limitado la utilización de estos animales en comparación con los ratones [30].

### **1.8.3 Perros y gatos**

Organismos similares a *H. pylori* son altamente prevalentes en perros y gatos, encontrándose en 86% de los gatos y en el 100% de los perros, estos microorganismos incluyen a *H. felis*, *H. heilmannii* y *H. bizzozeronii*. *H. felis* se aisló primero en estómago de gatos, pero más tarde se encontró que también coloniza estómago de los perros. Infecciones experimentales demuestran que la infección de *H. felis* durante un año induce la formación de folículos linfoides en la mucosa gástrica con infiltrado celular leve, atrofia y fibrosis. Este podría ser un buen modelo para el estudio de linfoma gástrico ya que individuos infectados tardan décadas en desarrollar esta patología. La infección con *H. pylori* ha sido reportada en gatos de manera natural, resultando en inflamación de la mucosa gástrica [31].

### **1.8.4 Otros Animales reportados**

*Helicobacter* causa una infección común en animales de granja, sin embargo, poco se sabe sobre su impacto en la producción [30].

Después del descubrimiento de *H. pylori*, se estudio una serie de abortos en ganado ovino, en las cuales a la necropsia, la única patología evidente de los fetos abortados, fue inflamación focal y necrosis del hígado. En el cultivo microbiológico se encontró una bacteria en forma de espiral, anaerobia y flagelada, demostrando que este agente producía abortos en ovejas gestantes y cerdas de guinea [30].

Inesperadamente se encontró que pastores presentaban una prevalencia inusualmente más alta de infección por *H. pylori* y en estudios posteriores se encontró colonizando el estómago de ovejas italianas y fue cultivado en leche bronca de oveja, aunque este último no fue apoyado por otro estudio realizado en Turquía [30].

### **1.8.5 Rata y Ratón**

Durante los últimos años se han desarrollado numerosos modelos animales en roedores que han permitido estudiar la patogénesis de adenocarcinoma gástrico, esto ha permitido comprender los efectos bacterianos, factores genéticos del hospedero y los factores ambientales que deberían evaluarse [24].

Se ha intentado inducir experimentalmente cáncer de estómago en diferentes modelos animales, utilizando diferentes carcinógenos, sin embargo, solo Sugimura y Fujimura, fueron capaces de reportar adenocarcinoma en las glándulas del estómago de ratas utilizando N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina [24]. En la mucosa pilórica del estómago se presentan lesiones erosivas, desorden estructural de las glándulas y proliferación de las células epiteliales de la mucosa pilórica. El tipo de cáncer de estómago se desarrolla de manera similar con respecto a los tipos histológicos de cáncer de estómago que desarrolla el humano [24].

El desarrollo espontáneo de adenocarcinoma gástrico en los roedores, en particular en ratas y ratones de laboratorio ocurre raramente. Los estudios de adenocarcinoma gástrico espontaneo han sido en ratas de la cepa Cotton, sin embargo, estas desarrollan más frecuente cáncer de células enterocromoafines. En el caso de los ratones se ha observado

que la infección con *H. pylori* provoca lesiones en mucosa gástrica, pero no desarrollo de carcinoma gástrico, por lo que se han utilizado agentes químicos junto con la infección para que estos ratones desarrollen carcinoma gástrico [24].

Los modelos de ratón han demostrado el impacto de la colonización por *Helicobacter* en el medio ácido del estómago, ratones infectados con *H. pylori* y *H. felis* mostraron diferentes patrones de colonización cuando se les administró una terapia supresora de ácido [24]. Sin embargo, *H. felis* no cuenta con la isla de patogenicidad *cag* que codifica para el sistema de secreción tipo IV y que trasnloca CagA dentro de la célula, por lo que persiste la problemática de dilucidar los datos obtenidos con respecto a su actividad oncogénica [30].

Las cepas de ratón C57BL/6 y Balb/c son las que se han utilizado para la investigación de *H. pylori* debido a la disponibilidad de características genéticas similares. La respuesta inmunológica ante la infección de la cepa C57BL/6, presenta una respuesta inmunológica Th1 predominantemente, con alto grado de daño epitelial y poca carga bacteriana. Mientras que la respuesta inmunológica característica de los ratones Balb/c resulta predominante Th2, con menor daño epitelial y alta carga bacteriana. La agregación linfocitaria es característica de los ratones Balb/c después de una infección a largo plazo y el Linfoma tipo MALT puede ser inducido por algunos aislados de *H. pylori* [30]. Son numerosos los factores que deben considerarse para interpretar los resultados que se obtienen de modelos de ratón, si bien las características inmunológicas y fisiológicas son similares, hay diferencias específicas entre ratones y humanos que deben tomarse en cuenta [32].

Pocos estudios han descrito la colonización de *H. pylori* en ratones, pero en estos descritos la colonización fue muy baja y la manifestación de la enfermedad prácticamente inexistente, así como, resultados poco alentadores. Sin embargo, en 1997, Lee *et al.*, describieron una cepa de *H. pylori*, la cual se adaptó al ratón, denominandola cepa Sydney (SS1). Esta cepa fue aislada de un paciente humano y adaptada al ratón, con lo cual obtuvieron altos niveles de colonización de la mucosa gástrica en varias cepas de ratón, gastritis crónica similar a la observada en el humano y resultados consistentes. Por lo cual, esta cepa ha sido la más utilizada en modelos de ratón [33].

Por lo anteriormente descrito la cepa Sydney de *H. pylori* es considerada la de elección para trabajar con modelos de ratón, sin embargo, aun con la adaptación se considera difícil de reproducir en distintos laboratorios por factores como: viabilidad del cultivo bacteriano, concentración del inóculo, frecuencia de dosis de inoculación, número de pases en cultivo microbiológico así como la cepa de ratón que se eligió [35]. Además de ello, la cepa Sydney de *H. pylori* presenta una isla de patogenicidad *cag* (*cag* PAI) disfuncional, (atribuida a la adaptación en ratón) lo que restringe el estudio de estos factores de patogenicidad [32].

El empleo de ratones Libres de Patógenos Específicos (SPF) son los más adecuados para el estudio de *Helicobacter*, sin embargo, también se puede utilizar animales gnotobióticos (de microbiota definida), libres de gérmenes (Axénicos) o convencionales. De cualquier forma estos ratones deben estar libres de cualquier especie enterica de *Helicobacter* spp. y en lo particular de *H. bilis* y *H. hepaticus*, ya que estos patógenos alteran o influyen en la respuesta inmune que induce la infección gástrica por *Helicobacter* [35]. En la Tabla 1, se mencionan algunas cepas convencionales de ratón susceptibles a la colonización por *H. pylori* y *H. felis* [34].

La respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica de ratón se reduce en animales infectados con especies de *Helicobacter* cuando existe coinfección con helmintos, es por ello necesario considerar este tipo de factores al establecer un modelo de infección. En el mismo sentido la coinfección con *Toxoplasma gondii* altera la respuesta inmune de *H. felis*, obteniendo una respuesta inflamatoria gástrica más severa, por ello es sumamente importante utilizar animales libres de patógenos, que no afecten la respuesta inmune en los modelos de infección con *H. pylori* [30].

Dentro de las pocas opciones para realizar estudios con *H. pylori* en modelo de ratón se encuentra la cepa Sydney (SS1) que coloniza con altas cargas bacterianas y con una *cag* PAI intacta, pero un sistema de secreción tipo cuatro (SSTIV) no funcional, la B128 y su variante adaptada a gerbo B128 7.13 que contiene la *cag* PAI y un SSTIV funcional, sin embargo, los niveles de colonización son muy bajos. Por último, la cepa de *H. pylori* X47-

2AL no presenta la *cag* PAI, ni un SSIV funcional y coloniza de manera similar a la cepa *H. pylori* SS1 [35].

<b>Tabla 1. Suceptibilidad a <i>H. pylori</i> y <i>H. felis</i> con diferentes cepas ratón.</b>				
<b>Cepa de ratón</b>	<b>Colonización por <i>H. pylori</i> SS1</b>	<b>Patología</b>	<b>Colonización por <i>H. felis</i></b>	<b>Patología</b>
<b>C57BL/6</b>	Si	Gastritis activa crónica, progresa a hiperplasia y atrofia	Si	Gastritis activa crónica, progresa a hiperplasia y atrofia
<b>Balb/c</b>	Si	Gastritis activa crónica, progresa a atrofia severa	Si	Algunos atrofia gástrica, menor apoptosis gastritis antral y MAL Toma
<b>SJL</b>	Si pero en bajas cantidades	Gastritis leve	Si	Gastritis de cuerpo
<b>C3H/He</b>	Si pero en bajas cantidades	Gastritis activa crónica moderada a severa	Si	Gastritis de cuerpo
<b>DBA/2</b>	Si pero en bajas cantidades		Si	Gastritis de cuerpo
<b>CBA</b>	Si pero en bajas cantidades	Gastritis leve	Si	Gastritis antral leve
<b>Swiss Webster</b>	Si pero en bajas cantidades	Gastritis leve	Si	Gastritis autolimitante moderada

Debido a que este tipo de animales son más fáciles de conseguir, manipular, menos costosos y más fáciles de mantener, comparten características genéticas y desarrollan lesiones similares a las que presentan los humanos, estos modelos animales resultan muy asequibles para el estudio de las patologías por *H. pylori* [24].

### **1.8.6. Embriones de pollo**

Otro modelo que ha sido utilizado es el embrión de pollo. Algunos estudios han tratado de demostrar la viabilidad de las formas cocoides de *H. pylori* empleando este modelo, tal como ha sido reportado por Helena Enroth y Lars Engstrand, en el cual inocularon embriones de pollo con formas cocoides y bacilares [36]. Para las formas bacilares se logró obtener el cultivo en 82% de los embriones inoculados, sin embargo, no se lograron revertir las formas cocoides, pero notaron que 59% de los embriones murieron, sugiriendo que estas formas podrían ser tóxicas y pueden provocar la muerte del embrión [54]. En otro estudio, publicado por Panaro *et al.*, donde inocularon diferentes concentraciones de bacterias viables, LPS y lípido A, demuestran que el polisacárido de *H. pylori* resulta cardiotóxico para los embriones de pollo [37]. Sin embargo, no hay estudios que demuestren la virulencia de *H. pylori* en los embriones de pollo o la obtención de cepas más virulentas al inocularlas en el embrión de pollo.

## **2 JUSTIFICACIÓN**

Debido a la importancia mundial y en México de la enfermedad y lo inviable que resulta estudiar sujetos infectados con *H. pylori*, es necesario establecer modelos de infección animales, que nos permitan estudiar diferentes cepas de *H. pylori* provenientes de distintos padecimientos clínicos para estudiar la patogenia y los distintos tipos de lesiones que se presenten en el tejido gástrico.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Establecer un modelo murino de infección para cepas de *H. pylori* aislada de casos clínicos distintos mediante el uso de técnicas moleculares e histopatológicas para caracterizar el tipo de lesión que ocasionan.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Establecer el modelo murino de infección para cepas de *H. pylori* aisladas de distintos casos clínicos.

Establecer el diagnóstico histopatológico en el modelo murino utilizando la clasificación de Sydney.

Detectar la presencia de *H. pylori* en tejido gástrico mediante inmunohistoquímica.



#### **4 HIPÓTESIS**

H0. Al establecer un modelo murino de infección para cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de distintos casos clínicos, se logrará caracterizar para cada una de ellas diferentes tipos de lesiones histopatológicas en la mucosa gástrica.

HA. Al establecer un modelo murino de infección para cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de distintos casos clínicos, se logrará caracterizar el mismo tipo de lesión histopatológica en la mucosa gástrica.

## 5 METODOLOGÍA

### 5.1 Cultivo y preparación del inóculo de *H. pylori*

Se utilizaron tres cepas de *H. pylori* (7C, 62A9 y 29CaP) aisladas de distintos padecimientos clínicos (gastritis crónica, úlcera péptica hemorrágica y cáncer gástrico). Las cuales se cultivaron en placas de agar *Haemophilus* Test Medium (HTM) o Casman (BIOXON), suplementadas con 10% de suero de caballo, bajo condiciones de microaerofilia, a un temperatura de 37°C.

A los cuatro días se cosecharon las placas con *H. pylori* y se realizó una suspensión bacteriana en 3 ml de medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) o Solución Salina Fisiológica estéril (SSF) hasta obtener una concentración de  $9 \times 10^8$  y  $1.2 \times 10^8$  UFC/ml, respectivamente. Ambos inóculos se ajustaron con el nefelómetro de McFarlan (tubo 3 y 4) y se confirmó midiendo la densidad optica a 625 nm (BioMate5, ThermoSpectronic). Tanto del caldo BHI como la SSF se realizaron pruebas bioquímicas (ureasa, catalas y oxidasa) y una tinción de gram para confirmar viabilidad y pureza del inóculo.

### 5.2 Infección de ratones Balb/c con *H. pylori*

Para los ensayos de infección se utilizaron ratones BALB/c de 6-8 y 12-14 semanas de edad para las cepas de *H. pylori* provenientes de cáncer gástrico (HpCGa) úlcera péptica hemorrágica (HpUPH) y gastritis crónica (HpGC). Los ratones fueron divididos en grupos infectados (i) y sin infección (si). Los ratones fueron evaluados a los días 1, 7, 14, 90 y 180 post-inoculación (pi). Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité interno para el cuidado y uso de los animales de experimentación (CICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y de la Facultad de Medicina de la UNAM.

### **5.3 Toma de sangre de vena mandibular**

A todos los ratones se le tomó una muestra de sangre a partir de la vena mandibular previo a la inoculación con las cepas de *H. pylori*. Se sujeto a cada ratón firmemente de manera que la cabeza quede alineada con el cuerpo, se comprimió ligeramente los vasos del cuello, del lado opuesto al que se realizó la punción con una aguja hipodérmica 19G en una zona desprovista de pelo. La sangre se recolectó un tubo eppendorf de 1.5 mL. La muestra de sangre se centrifugó a 1,000 rpm, se recolectó el suero en un tubo eppendorf nuevo de 600 ul y se almaceno a -70°C.

### **5.4 Inoculación de *H. pylori* dosis única**

Para los ensayos de infección con la cepa HpCGaP se utilizaron 60 ratones Balb/C divididos en dos grupos, 40 infectados y 20 sin infectar, para la cepa HpUPH se utilizarón 45 ratones divididos, en 30 infectados y 15 sin infectar. Después de la toma de la muestra sanguínea se administraron 0.07 mg de cimetidina vía intraperitoneal (IP), una hora más tarde xilacina (50 mg/Kg) por la misma vía. Posteriormente, se inoculó 100 ul de la suspensión bacteriana ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) en SSF, dosis única vía orogástrica.

### **5.5 Inoculación de *H. pylori* dosis triple**

Para los ensayos de infección con la cepa HpGC, se utilizaron 15 ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad. Los ratones se dividieron en 10 infectados y 5 sin infectar. Después de tomar una muestra sanguínea se administró 0.07 mg de cimetidina vía intraperitoneal (IP), una hora mas tarde se administró Xilacina (50 mg/Kg) por la misma vía. Posteriormente, se inoculó 100 ul de la suspensión bacteriana ( $1.2 \times 10^8$  UFC/mL) en SSF, se realizaron tres inoculaciones en un periodo de 5 días por vía orogástrica.

## **5.6 Fase quirúrgica y determinación de pH gástrico**

En el tiempo de 1, 7, 14, 90 y 180 días se realizó la ligadura de píloro, para determinar el pH gástrico de todos los ratones infectados y no infectados, para ello se utilizó un coctel anestésico de Ketamina-Xilacina (0.25 mg/25 g y 0.2 mg/25 g, respectivamente) mediante el procedimiento descrito por Shurman, D. [28]. Brevemente, se realizó una incisión de la punta del cartílago xifoides a la cicatriz umbilical, se separó musculo recto abdominal y se realizó un ojal en peritoneo, se identificó y ligó el píloro con seda de 3-0. Tres horas después, se tomó una muestra de sangre y se realizó el sacrificio con 200 mg/Kg de Pentobarbital Sódico por vía IP, como se indica en la NOM-062-ZOO-1999, que establece las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se realizó la extracción del estómago, el contenido gástrico se recolectó en 1 ml de agua desionizada estéril y se tomó lectura con un potenciómetro (Scholar 425, Laboratory Equipment) [2].

## **5.7 Recolección de muestras gástricas**

El estómago se dividió longitudinalmente por la curvatura mayor en dos fracciones, una fracción se depositó en formol al 4% amortiguado con PBS 1X para su análisis histopatológico (análisis inmunohistoquímico, tinciones de Giemsa y hematoxilina-eosina). La otra fracción se dividió longitudinalmente en dos, una muestra se almacenó en un estabilizador de ácidos nucleicos (RNAlater, AMBION) a -70°C para futuros estudios y la otra parte del estómago, se empleó para el cultivo microbiológico de *H. pylori*.

## **5.8 Cultivo microbiológico a partir de la biopsia gástrica de ratón**

Una cuarta parte del estómago se lavó con SSF, después se colocó el tejido gástrico dentro de un homogeneizador con 50 ul de SSF estéril, se homogenizó para disgregar todo el tejido y se colectó en un tubo eppendorf con 450 ul de SSF, posteriormente, se tomaron 100 ul de homogeneizado y se sembraron tal como se describe el punto 5.1 (Cultivo y preparación del inóculo de *H. pylori*).

## 5.9 Procesamiento de las biopsias gástricas de ratón para histopatología

Todas las biopsias gástricas tomadas se depositaron en una solución de formol amortiguado al 4% con base al procedimiento descrito en el Manual de Histología del INP [32]. Brevemente, la biopsia gástrica se depositó en 20 mL de formol amortiguado durante 12-24 horas, posteriormente, la muestra se incluye en parafina, iniciando con un proceso de deshidratado, utilizando para ello concentraciones de alcohol que van del 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, alcohol anhidro, xilol y por último parafina a 56-59°C. Finalmente, se orienta el tejido de forma que al realizar el corte se aprecie la mucosa, submucosa, muscular y serosa. Para tinciones de hematoxilina-eosina (H-E) los cortes se obtuvieron de 2 µm y de 1 µm para la tinción de Giemsa e inmunohistoquímica (IHQ).

Para evaluar la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica de ratones se realizaron 15 cortes seriados, dos de estos se utilizaron para la tinción de H-E, 12 para Giemsa y 1 para IHQ. Cada uno de los doce cortes teñidos con Giemsa, fueron utilizados para escudriñar con 4,000 y 1,000 aumentos en un microscopio óptico (Leica ICC50 HD). De las muestras que resultaron positivas se realizó la IHQ para confirmar la presencia de *H. pylori*.

La IHQ se realizó con base al protocolo descrito por García Vázquez Francisco, en el Manual, *Herramientas Moleculares en el Laboratorio de Anatomía Patológica*, ed. I.N.d. Pediatría, 2010. Brevemente, se efectúan cortes de 1 µm que se montan en portaobjetos electrocargados (colorfrost plus), las cuales se introdujeron para su des-parafinado en una estufa a 60°C, durante 15 min, posteriormente, se rehidrataron las muestras iniciando con xilol, alcohol anhidro, al 90%, 80%, 70%, 60% y finalmente en agua destilada.

Se procedió a desenmascarar con citrato de sodio al 0.1 M pH 6, se dejó reposar y se lavó con agua destilada tres veces, las laminillas se introdujeron en una solución al 0.9% de peróxido, se lavó nuevamente con agua destilada y otra con amortiguador salino de fosfatos-Tween 1X (PBST), se montan los portaobjetos en Coverplates para Cassette Rack Sequenza y se adiciona el anticuerpo policlonal anti-*H. pylori* hecho en conejo (Dako) a una dilución 1:50 y se dejó incubando por una hora. Cumplida la hora se lavó con PBST y

se adicionó el anticuerpo secundario goat anti-rabbit (BIORAD) hecho en cabra y acoplado a biotina a una dilución 1:200, se dejó incubando una hora y se lavó con PBST para después agregar la estreptavidina (Bio-SB) la cual se dejó incubando durante 1 hora. Se lavó con PBST y se reveló con diaminobenzidina (Dako) monitoreando en el microscopio. Para la contra tinción se utilizó hematoxilina, se deshidrató la muestra con alcohol a diferentes concentraciones, hasta alcohol absoluto (No sumergir en Xilol), se dejó secar y finalmente se cubrió con un cubreobjetos.

### **5.9.0 Criterios de Evaluación Histopatológica**

Se utilizaron los siguientes criterios para evaluar el daño a la mucosa gástrica, con base a los criterios establecidos por Arlin B. Rogers, en 2012 y modificados para los hallazgos encontrados en nuestro modelo. Brevemente, para cuantificar el daño histopatológico se evaluaron cuatro criterios para determinar la localización, grado y tipo de lesión [33-38]. Los criterios utilizados para caracterizar las lesiones son los siguientes; I) Inflamación, II) alteraciones epiteliales, III) atrofia, IV) hiperplasia. I) Inflamación: se define como el acumulo o presencia de leucocitos. Pequeñas islas o parches de células inflamatorias en la mucosa y/o submucosa reciben la puntuación de 1. Cuando el infiltrado aumenta en varios campos microscópicos de la mucosa+/- submucosa la puntuación es de 2. Nódulos o folículos linfoides extensos y algunas otras células inflamatorias ameritan un puntaje de 3. La extensión de inflamación en muscular y adventicia recibe un puntaje de 4. II) Alteraciones epiteliales: denotan la presencia de daño epitelial, erosión y ulceración del epitelio. Bordes irregulares, hendidos o extendidos se asigna el 1. Cuando la superficie del epitelio se hace mas delgada, la erosión se presenta en algunas zonas y la dilatación glandular es común, la lesión es de grado 2. Cuando la presencia de erosión es extendida, se encuentran áreas de fibrosis, reactividad celular y dilatación celular, la lesión se considera de tipo 3. Cuando se encuentra cicatrización, regeneración, erosión, daño en la base del epitelio que irrumpa con la continuidad (úlceras) la lesión se considera de tipo 4. III) Atrofia: es definida como la disminución del tamaño y función celular por ello una disminución en el número de células principales se considera una lesión de tipo 1. Cuando la ausencia casi completa de células principales con una pérdida mínima de parietales se

considera una lesión de tipo 2. Una puntuación de 3 significa una pérdida completa de células principales y la mitad de células parietales). Por último la pérdida de ambas poblaciones celulares significan una puntuación de 4. IV) Hiperplasia: se define como el aumento en el tamaño del órgano debido a un incremento en el número de células. Por ello, se considera una puntuación de 1 cuando el aumento tamaño de un órgano es del 50% mayor al esperado. Cuando el tamaño de la mucosa es dos veces mayor al esperado la puntuación es de 2. Una puntuación de 3 se obtiene cuando la mucosa es tres veces mayor al tamaño esperado. Y una puntuación de cuatro cuando el tamaño supera más de tres veces el tamaño esperado y se pierde por completo la función de la mucosa.

### **5.9.1 Extracción de DNA a partir de biopsias gástricas de ratón**

Las extracciones de DNA se realizaron a partir del homogeneizado con el kit comercial (QIAamp DNA mini Kit; QIAGEN, USA), de acuerdo con lo especificado por el proveedor. Brevemente, se tomaron 80 µl del homogeneizado y se le añadió buffer ATL, se homogeneizó e incubó dos horas a 56°C, posteriormente, se agregó 4 µl de RNAsa y se incubó durante dos minutos a TA, al finalizar la incubación se agregó 200 µl de buffer AL, se incubó a 70°C, durante 10 min, después se agregó etanol absoluto y se agitó vigorosamente, se pasó esta solución a una columna y se centrifugó a 8,000 rpm/1 min, se desechó el filtrado y se añadió el buffer AW1, nuevamente se centrifugó a 8,000 rpm/1 min, se desechó el filtrado, se agregó el buffer AW2, se centrifugó a 14,000 rpm/5 min, se agregó el buffer AE y se incubó dos minutos a TA, nuevamente se centrifugó a 8,000 rpm durante tres minutos y posteriormente, se colectó y se cuantificó el DNA. Se almacenó a -20°C hasta su uso. La otra parte de estómago se guardó en 100 µl del estabilizador de ácidos nucleicos (RNAlater, Ambion) a -70°C.

### **5.9.2 PCR-Hibridación del Gen *16S rRNA***

Para la detección de *H. pylori* en las muestras de tejido gástrico en el modelo murino, se realizó la amplificación del gen *16S rRNA* por PCR semianidado e hibridación, previamente ha sido reportado por Castillo-Rojas, *et al.*, [39]. Brevemente, se realizó una

primera amplificación del DNA en un Termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems), utilizando los iniciadores Hp1 (5'-CTGGAGAGACTAAGCCCTCC-3') y Hp3 (5'-AGGATGAAGGTTTAAGGATT-3'), el producto de esta amplificación fue utilizado como template para la segunda amplificación con los iniciadores Hp1 y el Hp2 (5'-ATTACTGACGCTGATTGTGC-3'), en ambas reacciones de amplificación se utilizaron las siguientes condiciones: 94°C, 45s; 60°C, 45s y 72°C por 45s, durante 25 ciclos de reacción. El producto de la segunda amplificación (ppPCR) fue visualizado en un gel de agarosa al 2%, tenido con bromuro de etidium; el resto del producto fue transferido en una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham) y fijado con luz ultravioleta (CL-100 Ultraviolet Crosslinker, UVP) a 12,000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$  para su hibridación con la sonda marcada con digoxigenina (pHp-Dig). La Hibridación se realizó bajo las siguientes condiciones, se agregaron 10 ml de solución de prehibridación (Solución amortiguadora de citrato salino [SSC, 750 mM NaCl, 75 mM de citrato de sodio, pH 7.0], Reactivo de bloqueo 2% [Boehringer Mannheim], N-laurilsarcosina 0.1%, Dodecil Sulfato de Sodio [SDS] 0.02% y reactivo de Denhart [0.5 g Albúmina sérica bovina fracción V, 0.5 g Ficoll (tipo 400) y 0.5 g de Polivinilpirrolidona]), y se dejó incubar a 42°C durante una hora, posteriormente, se desechó y agregó solución de prehibridación nueva con 10pmol/mL de sonda pHp-Dig (5'-CATCCATCGTTTAGGGCGTG-Digoxigenina 3') la cual se dejó incubando toda la noche a 42°C. Luego, la membrana fue lavada con una solución 2X de citratos de sodio salino-dodecil sulfato de sodio al 0.1% (SSC 2X-SDS 0.1%), a 42°C, durante 5 min, después se realizó un lavado con SSC 0.5X-SDS 0.1% a las misma temperatura y tiempo, posteriormente, se realizó un lavado con una solución de malatos (ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) a 42°C, durante 2 min, se desechó esta solución para adicionar reactivo de bloqueo al 2% e incubar durante 30 min a 42°C, concluida la incubación se adicionó reactivo de bloqueo nuevo, más anticuerpo Anti-Dig (1:5000), se incubó durante 30 min a temperatura ambiente (TA), posteriormente, se realizaron dos lavados con solución de malatos, durante 15 min a TA. Finalmente, se realizó un lavado con solución de detección (0.1 M TrisBase, 0.1 M NaCl), durante 10 min a TA. El revelado fue realizado con DuoLux Chemiluminescent/Fluorescent substrate for Alkaline Phosphatase (Vector Laboratories), de acuerdo a las especificaciones del fabricante, brevemente, se agregan 50  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  del reactivo directamente en la membrana, se incubó a TA en oscuridad durante 5



min. Por ultimo se expone la membrana en un papel fotografico, durante 30-60 seg hasta detectar señal de los controles positivos.

### **5.9.3 Inoculación de *H. pylori* en embrión de pollo**

Embriones de pollo libres de patógenos específicos (ALPES II), de 7 y 9 días, fueron inoculados en el saco vitelino con las cepas de *H. pylori* 29CaP, 62A9 y 7C. Dicho procedimiento se realizó con base a lo descrito por Figueroa Ochoa, 2003. Brevemente, se revisó con ovoscopio que todos los embriones se encontraran viables (movilidad e irrigación), se marcó la posición en la que se encontraba ubicado el embrión, así como, el contorno y la parte central del saco aéreo. En una área de esterilidad, se desinfectó con solución yodada al 10% el cascaron delimitada anteriormente (saco aéreo), se ubicó la marca central del saco aéreo y se perforó el cascaron, a un costado de esta marca (lado contrario a la posición del embrión). Con una jeringa de insulina con aguja del número 22G se introdujo completamente, en un ángulo de 90° y se depositaron 100 ul de un inóculo bacteriano ( $1.2 \times 10^8$  UFC/mL) en el saco vitelino. Se selló perfectamente la perforación y se regresó el embrión a la incubadora, este procedimiento se realizó para todas las cepas de *H. pylori* y el control (SSI-estéril)[40,41]. Todos los embriones fueron examinados con el ovoscopio diariamente, al quinto día se realizó el sacrificio.

### **5.9.4 Evaluación macroscópica del embrión de pollo y cultivo de saco vitelino**

Después del sacrificio, los embriones infectados con las diferentes cepas y el control, fueron evaluados macroscópicamente, para identificar la presencia de lesiones. Posteriormente, se recuperó el líquido del saco vitelino, el cual fue cultivado en medio Casman (tal como se mencionó anteriormente), el resto fue depositado en criotubos y almacenado en nitrógeno líquido. Los cultivos microbiológicos de saco vitelino, se revisaron diariamente durante 5 días. De las colonias obtenidas, se realizaron pruebas bioquímicas (ureasa, catalasa y oxidasa) y tinción de Gram, para determinar la presencia del microorganismo y su pureza [1,40,41].

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Determinación de pH gástrico a partir de biopsias gástricas

En el presente estudio se compararon las lesiones de tres cepas de *H. pylori*, obtenidas a partir de aislados clínicos diferentes: cáncer gástrico (CGa), úlcera péptica hemorrágica (UPH) y gastritis crónica (GC), las cuales fueron inoculadas vía orogástrica en ratones machos Balb/C de 6-8 y 10-12 semanas de edad. Como se describió anteriormente en la metodología, se realizó la determinación de pH gástrico en el grupo infectado con la cepa CGa, utilizando el esquema de dosis única, en los cuales se encontró diferencia estadísticamente significativa a los 7 y 180 días post-infección, en estas lecturas se observa que los ratones infectados de los 7 y 180 días presentan niveles de pH gástrico menores a 4, en contraste los no infectados mantienen niveles de pH iguales o mayores a 4 al analizar los datos con la prueba de U de Mann-Whitney  $P < 0.05$  (Figura 1A).

Al analizar las lecturas de pH gástrico del grupo de ratones infectados con la cepa UPH utilizando el esquema de dosis única no se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los tiempos al evaluarla los datos con la prueba de U de Mann-Whitney  $P < 0.05$ . Como se puede observar en la Figura 1B, la dispersión de los datos fue mayor, sin embargo, en la mayoría de los tiempos las medianas tienden a ser ligeramente menores en el grupo infectado que en el no infectado. Con respecto al grupo infectado con la cepa GC, utilizando el esquema de infección dosis única no se logró obtener muestras suficientes para el análisis ya que la mayoría de los grupos fueron sacrificados en el bioterio sin previo aviso.

### 6.2 Cultivo Microbiológico

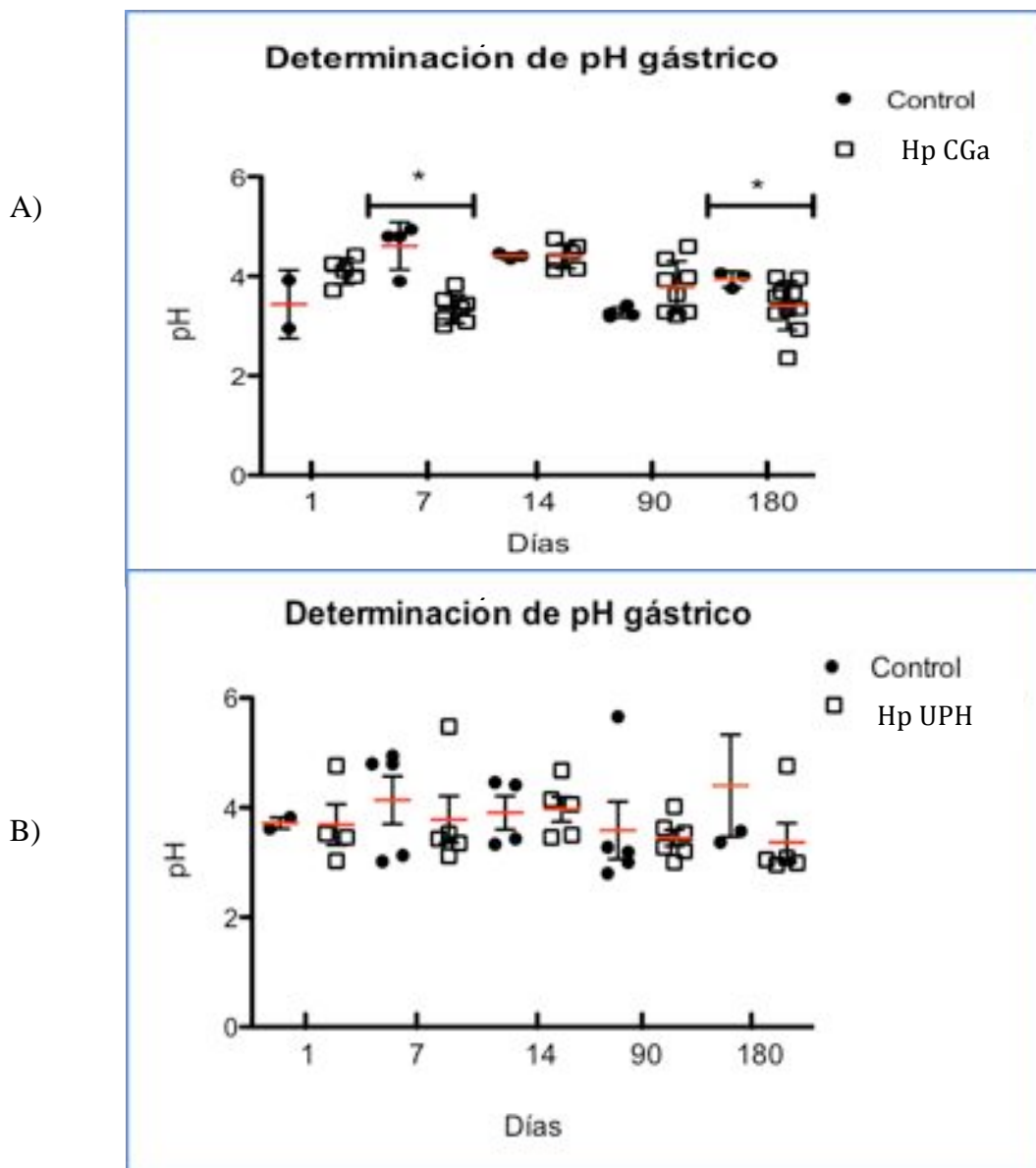
Mediante diferentes estrategias de cultivo microbiológico, se trató de recuperar las diferentes cepas de *H. pylori* (CGa, UPH y GC), con una cuarta parte de estómago dividida longitudinalmente de manera que obtuviéramos antro, cuerpo y fondo tal como se detalla en la metodología, se homogeneizó y cultivó en medios de cultivo Casman, HTM, BHI con y

sin antibióticos, se lavó el estómago, homogeneizó y sembró, por improntas directamente en los medios de cultivo, así como lavar y raspar directamente la mucosa gástrica del estómago, sin embargo, no se logró aislar al microorganismo.

### **6.3 Evaluación Histopatológica**

Posteriormente, con las biopsias gástricas incluidas en parafina de los grupos de ratones Balb/c de 6-8 semanas infectados con la cepa CGa y sin infección se realizó la evaluación histopatológica, con base en la clasificación de Sydney. Todas las biopsias fueron evaluadas histopatológicamente a los 1, 7, 14, 90 y 180 días post-inoculación (Figura 2), en la mayoría de los ratones de 6-8 semanas infectados con la cepa CGa se encontró infiltrado inflamatorio linfocitario leve-moderado y gastritis erosiva, de manera interesante cuatro ratones desarrollaron gastritis ulcerativa (Figura 2B), en contraste, los ratones del grupo no infectado, desarrollaron un infiltrado inflamatorio linfocitario leve-moderado, cuatro gastritis focal erosiva y uno gastritis ulcerativa (Figura 2A).

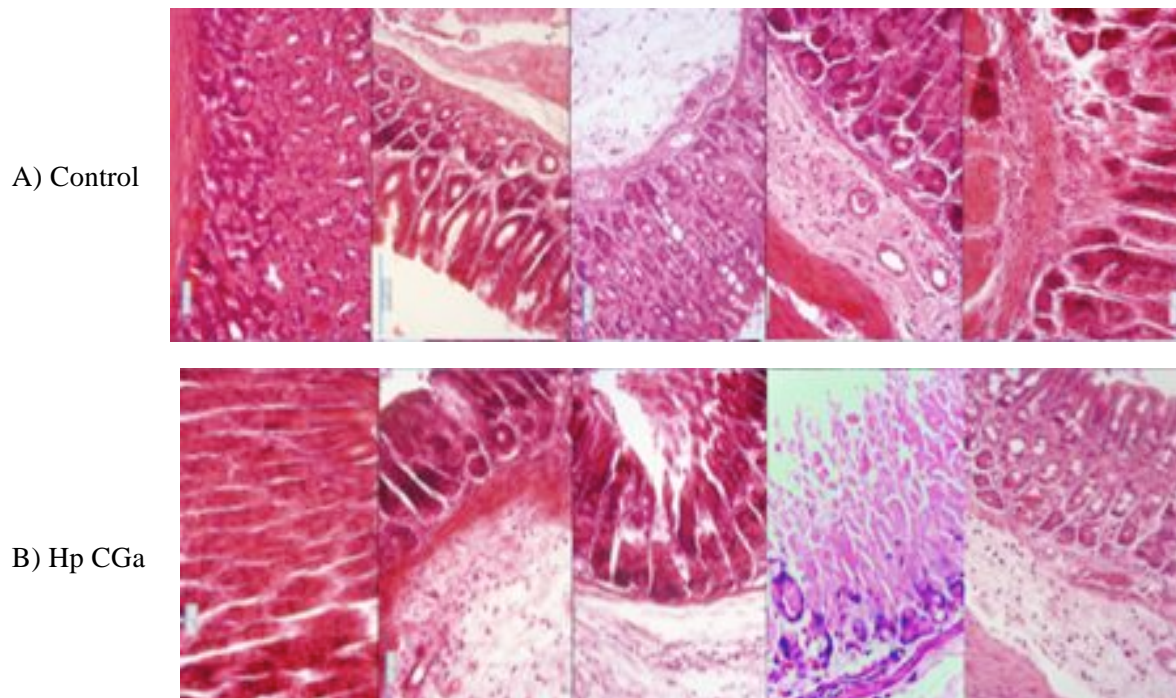
En el caso de las biopsias incluidas en parafina de los ratones Balb/c de 12-14 semanas inoculados con la cepa aislada de UPH, se encontró gastritis erosiva con infiltrado inflamatorio linfocitario a los 1, 7 y 14 días post-inoculación, a los 90 días tres de los ratones evaluados desarrollaron gastritis erosiva con regeneración y dos gastritis ulcerativa con infiltrado linfocitario moderado-grave. Finalmente, a los 180 días tres de los ratones desarrollaron gastritis ulcerativa con infiltrado linfocitario y dos desarrollaron gastritis erosiva con reactividad (Figura 3A), en contraste, el grupo de ratones sin infección desarrolló gastritis erosiva focal leve-moderada a los 1, 7 y 14 días, solamente un ratón presentó úlcera gástrica a los 14 días. A los 90 días no se obtuvieron biopsias gástricas para evaluar. Finalmente, los ratones de 180 días desarrollaron gastritis erosiva focal leve-moderada (Figura 3B).



**Figura 1.** Determinación de pH gástrico a los 1, 7, 14, 90 y 180 días post-inoculación. Ambos grupos fueron privados de alimento durante 24 horas previo a la medición de pH, posterior a 3 horas después la intervención quirúrgica fueron sacrificados para medir el pH gástrico con un potenciómetro. A) Cepa de *H. pylori* aislada de CGa  $n$  total=60 (36 experimentales, 16 controles y 8 muertos). B) Cepa de *H. pylori* aislada de UPH  $N=$  45 (20 experimentales; 15 controles; 10 muertos). Prueba de Mann-Whitney (\*  $P < 0.05$ ).

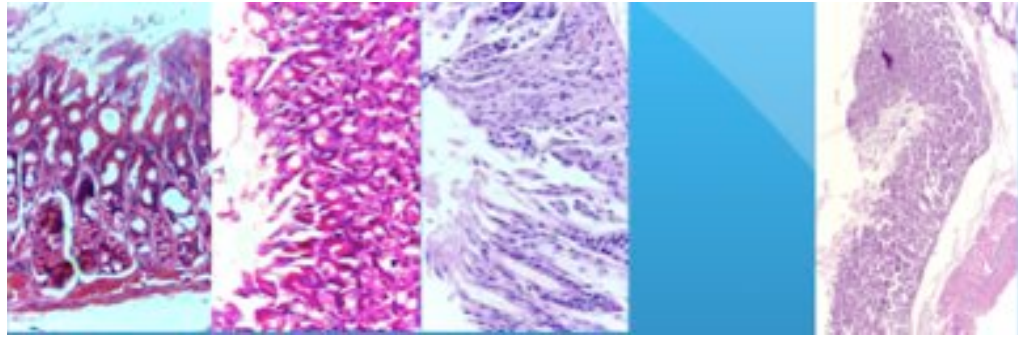
Los ratones infectados con la cepa de GC bajo el esquema de dosis única, fueron sacrificados sin previo aviso dentro del bioterio, por lo que no se obtuvieron muestras para realizar el diagnóstico histopatológico a los 7, 14, 90 y 180 días.

Siguiendo con la estrategia planteada, a partir de las biopsias gástricas incluidas en parafina se obtuvieron 15 cortes seriados, el primero y el último se utilizaron para realizar la tinción de H-E y realizar la evaluación histopatológica anteriormente descrita, los cortes restante se tiñeron con Giemsa e Inmunohistoquímica para confirmar la presencia de las distintas cepas de *H. pylori* en las biopsias gástricas.

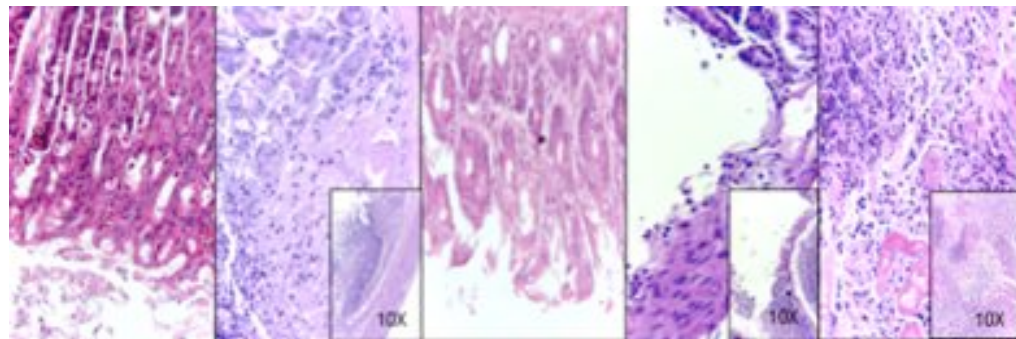


**Figura 2.** Evaluación histopatológica 40X de la mucosa gástrica de ratón a los 1, 7, 14, 90 y 180 días post-inoculación. **A)** Mucosa gástrica de ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad inoculados con solución salina fisiológica (SSF), mucosa gástrica sin daño epitelial e infiltrado inflamatorio leve, **B)** Mucosa gástrica de ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad inoculados con la cepa CGa, nótese la mucosa gástrica erosiva e infiltrado inflamatoria moderado

C) Control



D) HpUPH



**Figura 3.** Evaluación histopatológica 40X de la mucosa gástrica de ratón a los 1, 7, 14, 90 y 180 días post-inoculación. En las fotos 10X (cuadros pequeños) se muestra el área panorámica de la úlcera, **A)** Mucosa gástrica de ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad inoculados con solución salina fisiológica (SSF), mucosa gástrica sin daño epitelial e infiltrado inflamatorio leve. **C)** Mucosa gástrica de ratones Balb/c de 10-12 semanas de edad inoculados con SSF, mucosa con gastritis erosiva focal leve en el grupo control **D)** Mucosa gástrica de ratones Balb/c de 10-12 semanas de edad inoculados con Hp UPH, lesiones de tipo erosivo en ratones de 1 y 14 días, mientras que ratones de 7, 90 y 180 días desarrollaron gastritis ulcerativa.

#### 6.4 Índice de daño histológico

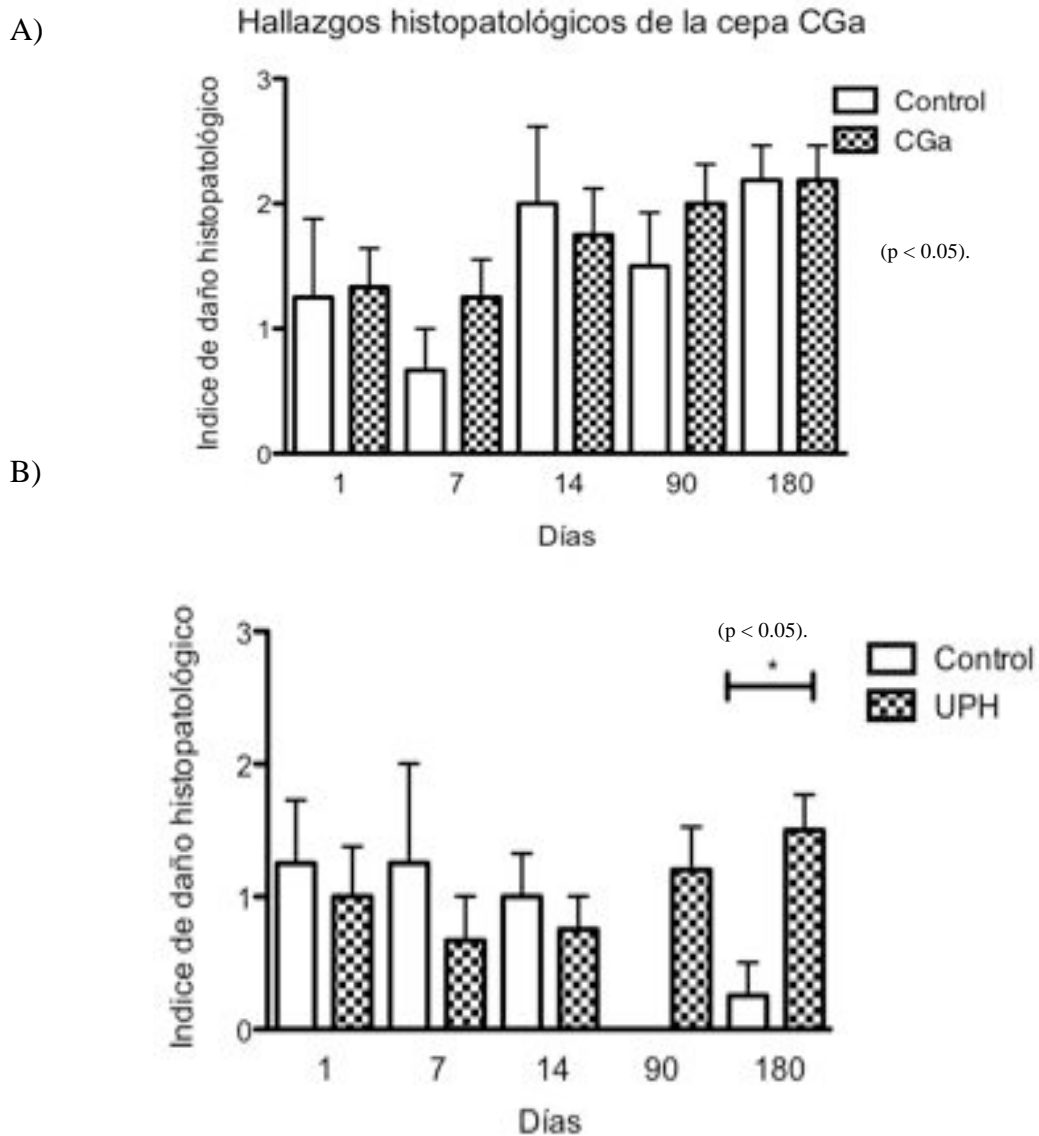
Los diagnósticos histopatológicos se realizaron con ayuda de un patólogo experto y con base en la clasificación de Sydney. Utilizando los diagnósticos obtenidos y con base en los parámetros de inflamación y daño epitelial, se estableció una escala del 0-4 (tal como se detalla en la metodología), con lo que se obtuvo el índice de daño histológico, el cual se utilizó para comparar estadísticamente ambos grupos, mediante un análisis con la prueba de U de Mann-Whitney, estableciendo una  $P < 0.05$ . Al comparar los grupos de ratones infectados con la cepa CGa de 6-8 semanas, no se encontraron diferencias estadísticamente

significativas, sin embargo, se observó que en la mayoría de los tiempos evaluados, los ratones del grupo infectado desarrollaron un mayor patrón inflamatorio y daño epitelial, que los ratones del grupo no infectado (Figura 4A).

Con respecto al análisis realizado en los grupos de ratones de 10 a 12 semanas infectados con la cepa UPH, se observó mayor daño epitelial y patrón inflamatorio a los 1, 7 y 14 días en el grupo sin infección, a los 90 días no se logró obtener muestra para evaluar y finalmente, a los 180 días los ratones infectados con la cepa UPH, desarrollaron mayor patrón inflamatorio y daño epitelial que el grupo control. Al analizar los datos con la prueba de U de Mann-Whitney ( $P < 0.05$ ), solamente se encontró diferencia significativa a los 180 días (Figura 4B).

## **6.5 Inmunohistoquímica**

Posteriormente, para identificar la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica, se realizaron tinciones de Warthin-Starry y Giemsa, a partir de quince cortes seriados para cada biopsia se realizó la búsqueda de la bacteria. Para la cepa CGa se encontraron biopsias positivas a los 7, 14, 90 y 180 días, en contraste para el grupo sin infección se encontraron biopsias positivas a los 7 y 90; por otro lado, en el grupo infectado con la cepa proveniente de UPH se encontraron biopsias positivas desde el primer día y hasta los 180 días, en contraste las biopsias gástricas de los ratones sin infección se encontró una muestra positiva a los 14 días (TABLA1). Todas las muestras positivas a Warthin-Starry o Giemsa fueron confirmados mediante inmunohistoquímica (Figura 5).



**Figura 4.** Determinación del índice de daño histológico (IDH). Tejido gástrico de ratones infectados con *H. pylori* y con solución salina fisiológica (SSF), se determinó la inflamación, daño epitelial, a los 1, 7, 14, 90 y 180 días post-infección, el IDH se generó empleando los criterios descritos en la metodología. Prueba de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). A) IDH de la cepa CGa, B) IDH de la cepa UPH, del grupo control, a los 90 días no se obtuvieron muestras evaluables histopatológicamente. \*Se encontraron diferencias estadísticamente significativas a los 180 días en la cepa UPH.



**Tabla 1.** Determinación de *H. pylori* en biopsias gástricas de ratón, mediante la técnica de inmunohistoquímica.

	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>90</b>	<b>180</b>	<b>N</b>	<b>Muertos</b>	<b>%</b>
	<b>Día</b>	<b>Días</b>	<b>Días</b>	<b>Días</b>	<b>Días</b>	<b>Total</b>		<b>infección</b>
Hp CGa	0/8	1/8	2/7	1/6	2/7	36	4	16.7
Control	0/3	1/3	0/3	1/3	0/4	16	4	12.5
Hp UPH	1/6	1/6	3/6	1/6	2/6	25	5	32.0
Control	0/3	0/3	1/3	0/3	1/3	10	5	20.0

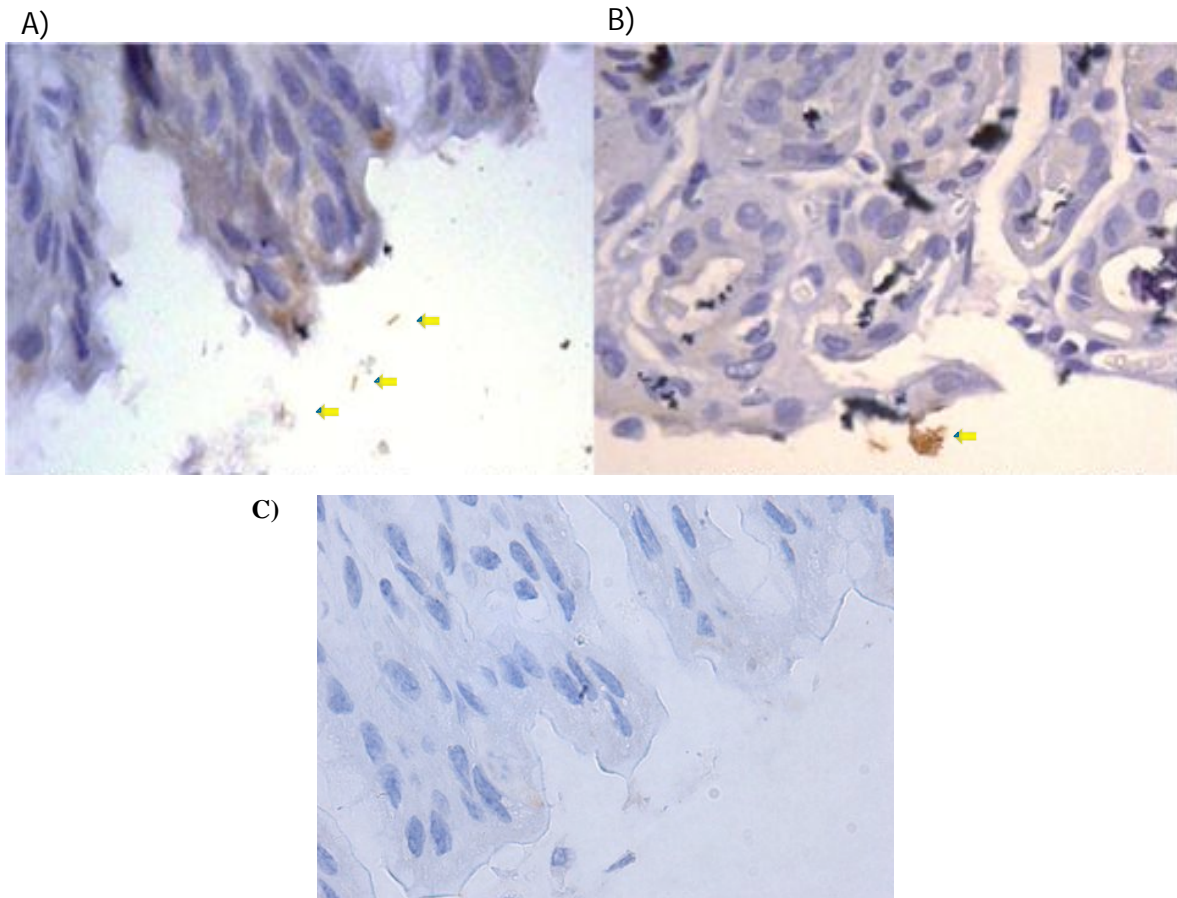
## 6.6 PCR-Hibridación

Con la cuarta parte de la biopsia gástrica se determinó la presencia de *H. pylori* mediante la técnica de PCR-Hibridación utilizando como blanco el gen *16S rRNA*, tal como se describe en la metodología. Todas las biopsias gástricas de ratones infectados y sin infección fueron procesadas mediante este procedimiento, el cual se estandarizó para detectar hasta 0.018 pg de ADN genómico (que corresponde un genoma relativo de *H. pylori*).

De un total de 40 ratones infectados con la cepa CGa, cuatro murieron a causa del procedimiento de inoculación, de los treinta y seis restantes que llegaron a término, se detectaron un total de doce biopsias gástricas positivas a *H. pylori* durante los 1, 7, 14 y 180 días. Para los veinte ratones inoculados con solución salina fisiológica (SSF), cuatro murieron a causa del procedimiento de inoculación, del resto se detectaron seis biopsias positivas a los 1, 14 y 180 días. En el caso del grupo infectado con la cepa CGa se obtuvo el 33.3% de positividad a la prueba de PCR-Hibridación y para el grupo inoculado con SSF de 37.5% (Tabla 2).

En el grupo infectado con la cepa UPH, de treinta ratones inoculados, murieron cinco a causas de manipulación. De los veinticinco que llegaron a termino dieciocho fueron positivos a la detección de *H. pylori* a los 1, 7, 14, 90 y 180 días, en contraste, las biopsias

del grupo inoculado con SSF en total se encontraron positivas a los 1, 14, 90 y 180 días a excepción de los siete días, de un total de quince ratones inoculados murieron cinco a causa del procedimiento. Para la cepa UPH el porcentaje de positividad fue del 72% y para los animales inoculados con SSF del 80% (Tabla 2).



**Figura 5.** Inmunohistoquímicas mediante el sistema de capilaridad (Biotina-Estreptavidina-Peroxidasa). Dilución 1:50 de Anticuerpo anti-*H. pylori* y dilución 1:200 del anticuerpo anti-conejo hecho en cabra y acoplado a biotina. De manera representativa en las fotografías a 40X, se señala con flechas amarillas la reacción positiva (bacterias en color dorado) para la cepa. A) *H. pylori* CGa, B) *H. pylori* UPH, en contraste, en las biopsias de ratones sin infección no se observó reacción C) Biopsia de ratón sin infección, De cada estómago se realizaron quince cortes seriados de 1  $\mu$ m, de estos se eligieron dos o tres cortes de cada estómago para detectar a *H. pylori* a los 1, 7, 14, 90 y 180 días.

**Tabla 2.** Resultados de la prueba PCR-Hibridación del gen *16S rRNA* en biopsias de ratones de 6-8 semanas infectados con la cepa CGa y de 12-14 semanas infectados con la cepa UPH.

	<b>1</b> <b>Día</b>	<b>7</b> <b>Días</b>	<b>14</b> <b>Días</b>	<b>90</b> <b>Días</b>	<b>180</b> <b>Días</b>	<b>N</b> <b>Total</b>	<b>Muertos</b>	<b>%</b> <b>infección</b>
Hp CGa	2/8	4/8	3/8	0/8	3/8	36	4	33.3
Control	2/4	0/4	2/4	0/4	2/4	16	4	37.5
Hp UPH	2/6	4/6	4/6	4/6	4/6	25	5	72.0
Control	3/3	0/3	1/3	2/3	2/3	10	5	80.0

### 6.7 Inoculación en Embrión de Pollo

Posteriormente, se inocularon embriones de pollo a los 7 y 9 días de edad con las cepas de *H. pylori* (CGa, UPH y GC) y SSF estéril. A los cinco días post-inoculación se sacrificaron los embriones, se recuperaron los sacos vitelinos y se sembraron en medio Casman para obtener en cultivo puro cada una de las cepas inoculadas. Todos los embriones fueron evaluados macroscópicamente para detectar congestión, hemorragia, cambios en la coloración y daño en los tejidos del embrión, sin embargo, no se detectaron cambios macroscópicos significativos al contrastar con el grupo inoculado con SSF estéril, (Figura 6).

Las diferencias observadas se detectaron al momento de realizar el cultivo microbiológico, donde los cultivos recuperados a partir de saco vitelino crecieron en menor tiempo y con mayor cantidad. Una vez recuperadas las cepas en cultivo puro procedente del embrión de pollo, se confirmó su pureza realizando pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa y ureasa) y tinción de Gram.

### 6.8 Esquema de infección dosis triple, cultivo microbiológico y determinación de pH

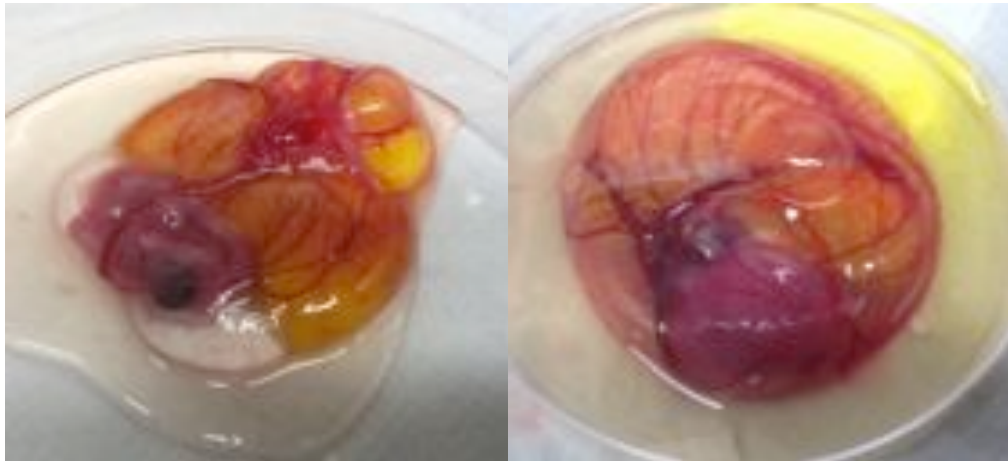
A partir de las cepas recuperadas de saco vitelino de los embriones de pollo infectados, se probó el esquema de infección con tres inoculaciones (dosis triple) en ratones de 6-8

semanas de edad tal como se detalla en la metodología, utilizando diferentes tiempos de sacrificio (2, 4, 6, y 12 semanas), con este esquema se decidió utilizar únicamente la cepa de *H. pylori* proveniente de gastritis crónica (GC), la cual no se evaluó con el esquema dosis única.

Siguiendo la estrategia planteada, con el esquema de dosis triple los ratones fueron inoculados con la cepa GC y sacrificados a las 2, 4, 6, 12 y 24 semanas, sin embargo, con base en las estrategias antes mencionadas, en ninguno de los tiempos evaluados se logró recuperar en cultivo microbiológico la cepa *H. pylori* GC. Al realizar las determinaciones de pH gástrico (Tabla 3), se observa que en la fase inicial de infección (2 y 4 semanas) el pH del grupo infectado tiende a ser mayor a 3.6 al comparar con el grupo control, por el contrario, a las 6 semanas el grupo infectado tiende a presentar un pH menor a 3.0 que el grupo control, sin embargo es necesario mencionar que el número de animales procesados es reducido. Los ratones de 12 y 24 semanas no lograron ser evaluados por que fueron sacrificados por el personal del bioterio sin previo aviso.

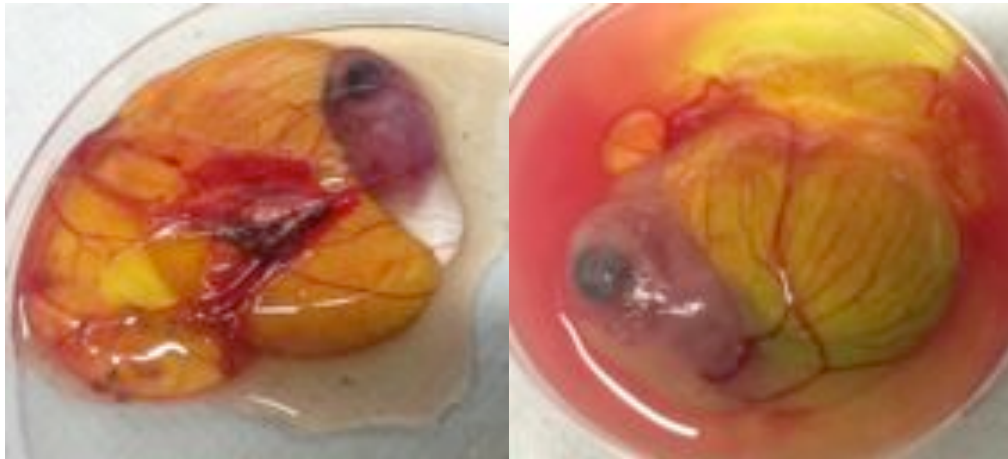
#### **6.9 Evaluación Histopatológica del esquema de infección dosis triple cepa GC**

Posteriormente, con las biopsias gástricas incluidas en parafina de los grupos infectados con el esquema dosis triple, tanto con SSF y la cepa GC, se realizó la evaluación histopatológica con base en la clasificación de Sydney. Todas las biopsias fueron evaluadas histopatológicamente a las 2, 4, 6 y 12 semanas.



A) Sin Infección (SSF)

B) Cepa CGa



C) Cepa UPH

D) Cepa GC

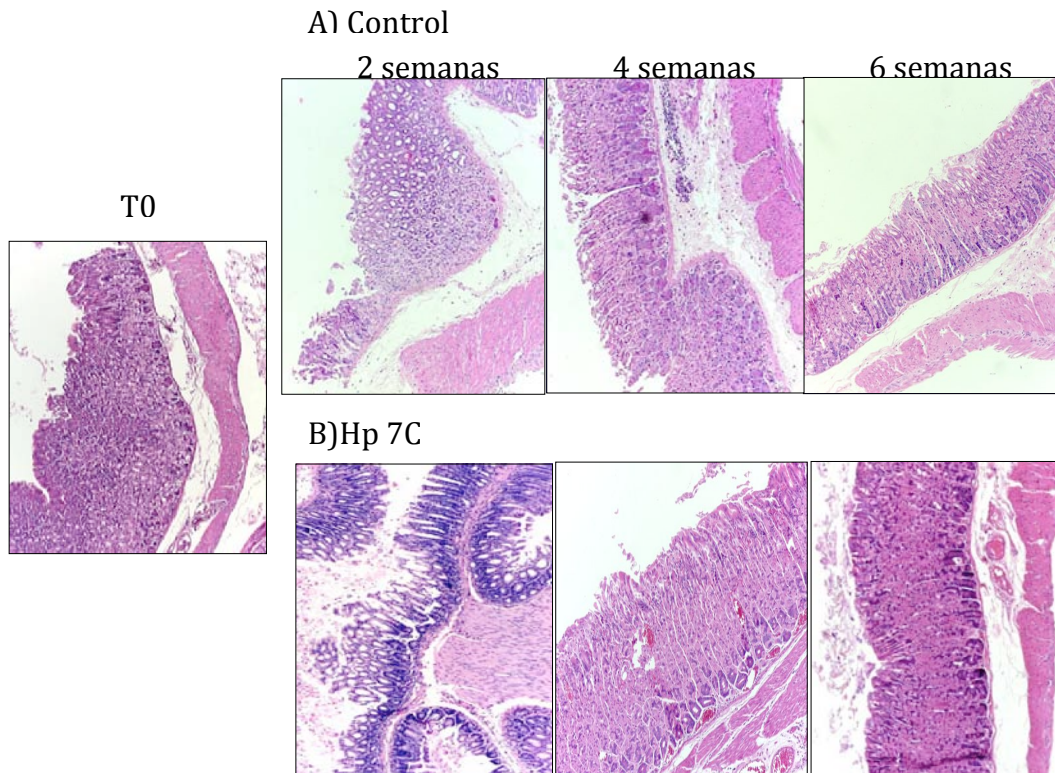
**Figura 6.** Foto representativa de embriones de pollo libres de patógenos específicos (SPF) infectados a los siete y nueve días de edad vía saco vitelino, con una dosis de  $1.2 \times 10^8$  UFC. No se observa ningún cambio patológico significativo A) Control, embriones inoculados con solución salina fisiológica (SSF) n=10, B) Embriones inoculados con la cepa CGa n=10, C) Embriones inoculados con la cepa UPH n=10 y D) Embriones inoculados con la cepa GC 7C n=10. Posterior al sacrificio, se recuperó y sembró el saco vitelino en agar Casman con y sin antibiótico, diariamente a partir del sembrado se revisaron los cultivos. A cada cultivo se les realizaron pruebas para confirmar su pureza. En los embriones control no se observó ningún crecimiento.

Los animales infectados con la cepa GC desarrollaron gastritis erosiva, congestión, focos de hemorragia, infiltrado inflamatorio linfocitario leve-moderado y reactividad epitelial a las 2, 4 y 6 semanas, en contraste, los ratones del grupo control desarrollaron erosión e infiltrado inflamatorio linfocitario leve. Un ratón fue sacrificado al momento de la inoculación para su evaluación histopatológica antes del procedimiento de infección, en este se encontró gastritis erosiva leve. (Figura 7). El índice de daño histopatológico no se obtuvo debido a los pocos datos obtenidos en los grupos evaluados.

<b>Tabla 3.</b> Determinación de pH en los ratones con dosis triple ( <i>H. pylori</i> GC).		
Tiempo/Grupo	Hp GC	Control
2 semanas	5.28	3.67
4 semanas	2.6	3.6
	4.74	
	6.53	
6 semanas	2.9	4.69
	2.86	
	3.48	
	2.91	

### 6.9 Inmunohistoquímica y PCR-Hibridación

Nuevamente realizando quince cortes seriados, se realizaron las tinciones de Giemsa, Warthin-Starry e IHQ para determinar la presencia de *H. pylori* en las biopsias gástricas, encontrando muestras positivas a las 4 y 6 semanas en el grupo infectado con la cepa GC, en contraste ninguna de las biopsias obtenidas del grupo control fueron positivas. Finalmente, las biopsias procesadas mediante la técnica de PCR-Hibridación mostraron que ambos grupos resultaron positivos a los 2, 4 y 6 semanas. Estableciendo un porcentaje de infección del 80% para el grupo infectado con la cepa GC y del 100% para el grupo control (Tabla 4).



**Figura 7.** Evaluación histopatológica de la mucosa gástrica de ratón previo a la infección y a las 2, 4, y 6 semanas post-inoculación. En las fotos (40X) se muestra A) Mucosa gástrica de ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad inoculados con solución salina fisiológica (SSF), mucosa gástrica sin daño epitelial e infiltrado inflamatorio leve, B) Mucosa gástrica de ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad inoculados con Hp 7C, nótese la congestión y la mucosa gástrica erosiva. No se obtuvieron biopsias de ratones de 12 y 24 semanas.

## 7.0 Evaluación de ratones sin manipulación

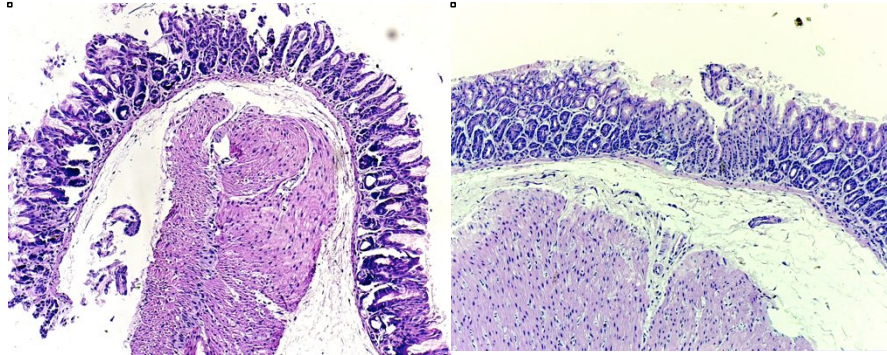
Para tratar de dilucidar estos resultados, se procedió a trabajar los mismos protocolos en animales sin manipulación, es decir a partir de que se obtuvieron los animales del bioterio, se colocaron en sus cajas con alimento y agua ad libitum sin realizar el procedimiento de inoculación, al sacrificarlos a los 1, 7, 14, 90 y 180 días sin realizar la cirugía de ligadura de píloro, se obtuvieron las biopsias las cuales se procesaron para su análisis histopatológico y molecular.

**Tabla 4.** Resultados de la prueba PCR- Hibridación del gen *16S rRNA* de *H. pylori* e IHQ de biopsias gástricas de ratones de 6-8 semanas infectados con la cepa GC utilizando el esquema de dosis triple.

	2 semanas	4 semanas	6 semanas	N Total	Muertos*	% infección
PCR-Hibridación						
Control	1/1	1/1	1/1	3	2	100
GC	1/1	3/3	2/4	8	12	80
IHQ						
Control	0/1	0/1	0/1	3	2	100
GC	0/1	1/3	2/4	8	12	80
Nota: *Los animales de los tiempos 12 y 24 no se lograron evaluar debido a que fueron sacrificados antes del tiempo de evaluación. El porcentaje de infección se obtuvo con base en el número de animales procesados.						

Las biopsias de los ratones Balb/c de 6-8 semanas sin manipular se evaluaron histopatológicamente a los 1, 7, 14, 90 y 180 días, las biopsias analizadas a los 1, 7 y 14 no presentaron ningún cambio histopatológico aparente (SHAP), sin embargo, a los 90 y 180 días se observaron lesiones focales leves de tipo erosivo y reactividad epitelial (Figura 8). Continuando con la estrategia de análisis, los quince cortes seriados fueron evaluados con la tinción de Giemsa, Warthin-Starry e inmunohistoquímica, sin embargo ninguno de los cortes evaluados resultó positivo.





**Figura 8.** Fotos representativas de la evaluación histopatológica de la mucosa gástrica de ratón a los, 90 y 180 días sin manipulación. A). Mucosa gástrica de ratones Balb/c de 6-8 semanas no manipulados, nótese lesiones de tipo erosivo y reactividad epitelial a los 90 y B) 180 días. En los ratones de 1, 7 y 14 días no se encontraron cambios histopatológicos aparentes (fotos no mostradas)

Por último, las biopsias gástricas de los ratones sin manipulación fueron evaluadas con la técnica de PCR-Hibridación, las biopsias analizadas fueron positivas a los 1, 14, 90 y 180 días, con excepción a los 7 días. El porcentaje de animales positivos a esta prueba fue de 62% (Tabla 5).

<b>Tabla 5.</b> Resultados de la prueba PCR-Hibridación del gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> en biopsias de ratones de 6-8 semanas sin manipulación.									
<b>Día</b>		<b>1</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>90</b>	<b>180</b>	<b>N Total</b>	<b>Muertos</b>	<b>% infección</b>
Ratones	sin	2/2	0/2	1/2	1/1	1/1	8	0	62.5
	manipular								

## 7 DISCUSIÓN

Los modelos animales son herramientas importantes para el estudio de enfermedades que afectan a los seres humanos, sin embargo, existen restricciones biológicas del organismo o del hospedero, como es el caso de *H. pylori*, ya que difícilmente se logra adaptar a especies animales [42-45]. Uno de los factores de virulencia más estudiados en *H. pylori* es la isla de patogenicidad *cag*, esta codifica para un sistema de secreción tipo IV, el cual introduce directamente a la célula la proteína asociada a la citotoxina (CagA). Esta proteína afecta la polaridad celular, proliferación y diferenciación, dichos efectos están relacionados con los estadios más graves de la enfermedad [7,21,22,26].

El presente trabajo, se establecieron las condiciones de infección en un modelo murino para cada una de las cepas de *H. pylori* (*cagA* positivas), obtenidas de casos clínicos en México, como cáncer gástrico (Hp 29CaP), úlcera péptica hemorrágica (Hp 62A9) y gastritis crónica (Hp 7C), con la finalidad de reproducir cada una de las entidades clínicas en el ratón.

Actualmente, se han tratado de establecer varios modelos animales de infección para las cepas de *H. pylori*, hoy en día se cuenta con la cepa Sydney (SS1), que fue la primera en ser adaptada a ratón y tiene la capacidad de colonizar claramente la mucosa gástrica, así como de persistir crónicamente [33]. Sin embargo, recientemente se describió que los genes del sistema de secreción tipo IV de la cepa SS1 no son funcionales para la translocación de CagA [45].

Existe evidencia de estudios clínicos donde la infección aguda por *H. pylori* se asocia con hipoclorhidria, sin atrofia de células parietales y a los pocos días o semanas se recuperan los niveles normales de secreción ácida [46]. De la misma forma la infección aguda en gerbos infectados con *H. pylori* causa hipoclorhidria y gastritis pero sin atrofia [47]. En el caso de la cepa Hp CGa (cáncer gástrico) inoculada en ratones Balb/c de 6-8 semanas se determinó el pH gástrico a los distintos tiempos post-inoculación. Contrario a lo esperado, en el ratón se encontró un pH menor a 4.0 en el grupo experimental que en el grupo control.

Sin embargo, esto puede ser debido al bajo nivel de colonización (Tabla 2), lo que no permite detectar estas diferencias. También podría influir el tipo de respuesta inmune de la cepa de ratón utilizada, ya que ratones Balb/c tienden a montar predominantemente una respuesta Th2 con mayor colonización, pero menor daño histopatológico y para el caso de los C57BL/6 quienes desarrollan una respuesta inmune característica Th1, la cual cursa como gastritis crónica y con el tiempo puede evolucionar hacia cáncer gástrico [48,49].

Para el caso de la cepa Hp UPH aislada de úlcera péptica hemorrágica se utilizaron ratones de entre 10 y 12 semanas de edad. Debido a que el bioterio se encontraba en una etapa de repoblación (por la introducción de un pie de cría del bioterio de Charles Rivers), se utilizaron ratones de mayor edad en el modelo de infección. Cuando se realizó la determinación de pH gástrico se esperaba que la cepa inoculada incrementará la secreción de ácido a los distintos tiempos post-inoculación, sin embargo, no se observó tendencia ni diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control, ni al analizarlo con el grupo Hp 29CaP. La secreción de ácido gástrico para el grupo experimental inoculado con la cepa 62A9 y el grupo control se mantuvo constante y muy similar en ambos grupos. Desafortunadamente no se logró determinar el área de colonización para tratar de explicar estos datos en cuanto a secreción ácida.

Evaluar una cepa aislada de cáncer en ratones C57BL/6 podría aportar datos muy importantes en cuanto a la secreción de ácido así como el tipo de lesión que puede ser inducida por la cepa de *H. pylori* en esta cepa de ratón.

A la evaluación histopatológica en animales infectados con la cepa Hp 29CaP se diagnosticó gastritis erosiva en 13 de los animales experimentales y cuatro de los animales control, además cinco ratones se diagnosticaron con gastritis ulcerativa, tres del grupo experimental y dos del grupo control. Como se mencionó anteriormente se podría utilizar ratones C57BL/6 para tratar de reproducir lesiones precancerosas en el modelo. Sin embargo, por los bajos niveles de colonización observados del 33% en animales del grupo experimental (Tabla 2), se podría utilizar un esquema de infección dosis triple, para incrementar el número de animales infectados, esto quizá marque una diferencia al

momento de evaluar inflamación y daño epitelial. Si bien la cepa Hp 29CaP no muestra diferencias significativas se observa que en la mayoría de los tiempos el índice de daño histológico es mayor en el grupo de animales infectados que el control. Además, si bien es cierto que el porcentaje de infección fue del 33% y que se requieren mayores niveles de colonización, así como, recuperar la cepa en cultivo puro [50,], se demostró la capacidad de la cepa para persistir crónicamente durante seis meses, como se muestra en la inmunohistoquímica.

En el caso de la cepa Hp 62A9 proveniente de un paciente con UPH, se encontraron principalmente lesiones de tipo ulcerativo, tanto en animales del grupo control como experimental, esto llamó la atención ya que para esta cepa los porcentajes de infección fueron del 80% para controles y 72% para experimentales, si bien los niveles de infección fueron más altos y aparentemente se reprodujo la patología del caso clínico del cual obtuvo esta cepa, esto podría relacionarse con lo publicado por Freire de Melo [51], donde se demuestra que la respuesta inmune contra *H. pylori* varía de acuerdo a la edad de infección y el área de colonización, donde el perfil de citocinas con un efecto antitumoral disminuye con el envejecimiento especialmente en sujetos de mayor edad, ellos mencionan que el tipo de respuesta podría ser un factor determinante para el desenlace de la enfermedad. Esto mismo podría suceder en ratones infectados con *H. pylori* puesto que los ratones infectados a las 10-12 semanas desarrollaron lesiones más graves que los animales más jóvenes.

De manera hipotética podría ser que una cepa de *H. pylori* adaptada a una población determinada, se introduce en una población distinta, si no es eliminada y logra persistir en el huésped esta podría, adaptarse de manera saprofita al nuevo huésped y permanecer sin ocasionarle daño, por el contrario si no se adapta de manera saprófita se desencadenarían daños patológicos en el individuo, por lo tanto la adaptación de *H. pylori* al modelo murino podría tomar dos caminos, una de ellas es que al colonizar el epitelio de un nuevo huésped este se vea afectado considerablemente al adaptarse al huésped podría volverse un organismo saprófita [45,48,50,52].

Cuando utilizamos la cepa Hp7C recuperada de embrión de pollo y utilizamos un esquema de infección dosis triple, tampoco se logró recuperar la cepa en cultivo puro, no se obtuvieron suficientes repeticiones para realizar una prueba estadística, sin embargo, a la evaluación histopatológica se diagnosticó congestión y gastritis erosiva en los animales infectados con la cepa Hp7C mientras que los no inoculados solo presentaron un infiltrado linfocitario leve. Los porcentajes de infección en animales infectados fue del 80%, sin embargo, se requiere un mayor número de repeticiones pues la muestra de ratones fue reducida.

Por otra parte, al detectar que *H. pylori* a la prueba de PCR-Hibridación se encontraba en tejido gástrico del grupo control y experimental en un porcentaje similar, comenzamos a evaluar cada etapa de trabajo, fue cuando evaluamos usos y costumbres del manejo dentro del bioterio. Si bien el alimento, las jaulas, el agua se esterilizaban antes y después de estar en contacto con los ratones, se utilizaba la misma ropa y guantes durante toda la jornada laboral, también algunas ocasiones se observó que gente ajena al bioterio se introducía dentro del área de trabajo. Además, se observó que cuando las jaulas con ratones de algún investigador quedaban vacías, el alimento y la cama (aserrín) se repartía a las jaulas con ratones. Otra deficiencia presente en el bioterio es el ruido al cual están sometidos los animales durante gran parte del día, esto provoca un estrés permanente en los animales. Esto nos llevó a pensar que había una transmisión a través de heces y alimento de los animales inoculados con *H. pylori*, lo que resulta acorde a los reportado por Luciano Artese, donde la transmisión oral-oral resulto más eficiente que la fecal-oral en modelo murino [53]. Con estos antecedentes nos planteamos la pregunta sobre si la contaminación del grupo control se debía a la transmisión vía oral-oral y fecal-oral por parte de las prácticas de manejo dentro del bioterio o si estos ya estaban infectados previamente con *Helicobacter* spp. [54,55]. Así como, las gastritis erosivas y ulcerativas estuvieran asociadas o favorecidas por el estrés al que los animales del bioterio estaban expuestos constantemente [56] así como la alimentación, ya que en el área de lesión frecuentemente se observó restos de alimento.

Para esclarecer estas preguntas, se tomó un grupo de ratones Balb/c del mismo bioterio los cuales fueron sacrificados a los mismos tiempos post-inoculación (1, 7, 14, 90 y 180 días) pero sin manipular (inocular) ningún ratón. Los resultados obtenidos nos mostraron que la cepa de ratón Balb/c ya estaba previamente infectada, por lo tanto nos dimos a la tarea de buscar mediante un análisis *in silico* las especies que podría estar identificando la prueba de PCR-Hibridación. El análisis mostró que la prueba de PCR-Hibridación podría amplificar con *Helicobacter acinonychis*, *Helicobacter bizzozeronii* y *Wolinella succinogenes*, sin embargo existen otras especies de *Helicobacter*. El primero descrito en grandes felinos como guepardos, leones y otros grandes felinos en los cuales se han reportado casos de gastritis severa. En el caso de *H. bizzozeronii* se ha aislado de gatos y perros domésticos en que causa gastritis y linfoma. Se ha planteado que este tipo de *Helicobacter* podría infectar estar infectando humanos [30,58]. Con respecto a *Wolinella succinogenes* se reporta que pertenece a la familia de las *Helicobacteraceae* y se encuentra como comensal del tracto gastrointestinal del ganado, aunque también se encuentra en la cavidad oral de perros y de humanos [20,57, 58].

Esto podría explicar el porque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al daño histopatológico ya que como ambos grupos se encuentran infectados las lesiones que se encuentran son similares ya que desarrollan la misma patología. Por otro lado, al no recuperar la cepa Hp 29CaP en cultivo puro no se puede afirmar que ésta sea la causante de la enfermedad, por lo que se sugiere evaluar otros medios y condiciones con la finalidad de recuperar en cultivo puro.

Esto explicaría porque aproximadamente el mismo porcentaje de animales resulta positivo a PCR-Hibridación sin embargo no podemos descartar una coinfección con otras especies o el tipo de microbiota que en asociación con las cepas inoculadas favoreciera el desarrollo de la infección. Sin embargo no deja de ser especulación por lo que se sugiere en este proyecto utilizar ratones libres de patógenos para la infección con *H. pylori* además se sugiere el utilizar ratones de distintas edades ya que como se menciona, la respuesta inmune varía de acuerdo a la etapa de infección con respecto a la cantidad de citocinas secretadas, siendo menor en los niños que en adultos [45,54]. Por lo tanto, en el supuesto de que la infección

con Hp 29CaP y Hp 62A9 en ratones de 6-8 y 10-12 semanas se logrará establecer podría ser un hallazgo interesante que dependiendo de la edad de infección estos desarrollen algún tipo de lesión por parte de *H. pylori* y sin descartar el impacto de la microbiota en el desenlace de la enfermedad.

## 8 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró establecer el modelo murino de infección para cepas de *H. pylori* provenientes de aislados clínicos de cáncer gástrico, úlcera péptica hemorrágica y gastritis crónica.

Se observaron lesiones de gastritis erosiva con la cepa proveniente de cáncer gástrico Hp29CaP, mientras que con la cepa proveniente de úlcera péptica hemorrágica Hp62A9, se observaron lesiones de gastritis ulcerativa.

Se observó la presencia de *H. pylori* en tejido gástrico de ratón con ambas las cepas Hp29CaP y Hp62A9, las cuales fueron capaces de persistir crónicamente, a diferencia de la cepa aislada de gastritis crónica Hp7C.

Se mostró que el desarrollo de lesiones histopatológicas en los ratones Balb/C convencionalmente inoculados con las distintas cepas de *H. pylori* es dependiente de la edad de estos en los ensayos de infección.



## 9 PROSPECTIVA

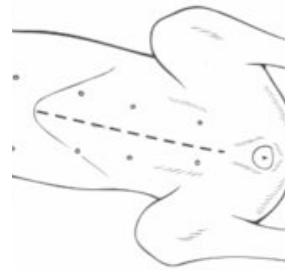
En el presente trabajo se plantean nuevas líneas de investigación en el estudio de la microbiota/microbioma y su interacción en el establecimiento de lesiones gástricas en el modelo murino, desde el punto de vista inmunológico como histopatológico.

En el estudio de *H. pylori* y las causales de patología gástrica se deben considerar los factores ambientales, la carga genética del hospedero y la carga genética de las cepas bacterianas, finalmente la interacción de estos factores son de los que dependerá el desenlace de la infección, por lo tanto, el análisis de resultados no deber dejar de lado el contexto multifactorial. Así mismo, resulta interesante el estudiar el modelo murino de infección para *H. pylori* a partir de aislados clínicos, donde se utilicen ratones de mayor edad. Aunado, con el uso de embriones de pollo para realizar un pase de la cepa a utilizar previo al ensayo de infección, ya que se observó que las cepas *H. pylori* crece en menor tiempo y en mayor cantidad.

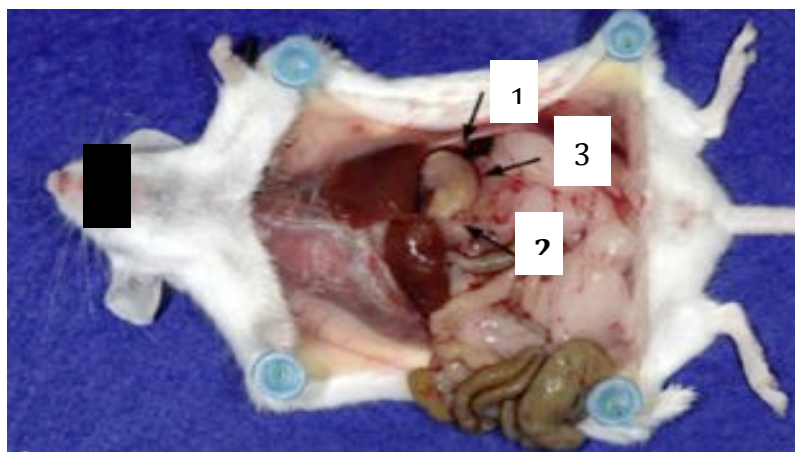
## 10 ANEXO 1

Representación esquemática de la región anatómica para realizar la ligadura de píloro, previamente, anestésiar a los ratones y esperar a que estén en plano quirúrgico IV, rasurar el área quirúrgica y poner solución antiséptica, realizar una incisión con bisturí de la punta del cartílago xifoides a la cicatriz umbilical (esquema A), separar musculo recto abdominal y realizar un ojal en peritoneo. Identificar el estómago (Esquema B, número 2) localizar el píloro (Esquema B, número 1), exponerlo y ligarlo con seda de 3-0, cuidando de no cortar la circulación ni rasgar el tejido gástrico. Regresar con mucho cuidado a su posición original el estómago, suturar asegurando de cerrar bien la herida.

A) Se realizó una incisión sobre la línea media



B) Representación esquemática de la localización de 1) píloro, 2) estómago y 3) curvatura mayor. Para realizar la ligadura de píloro

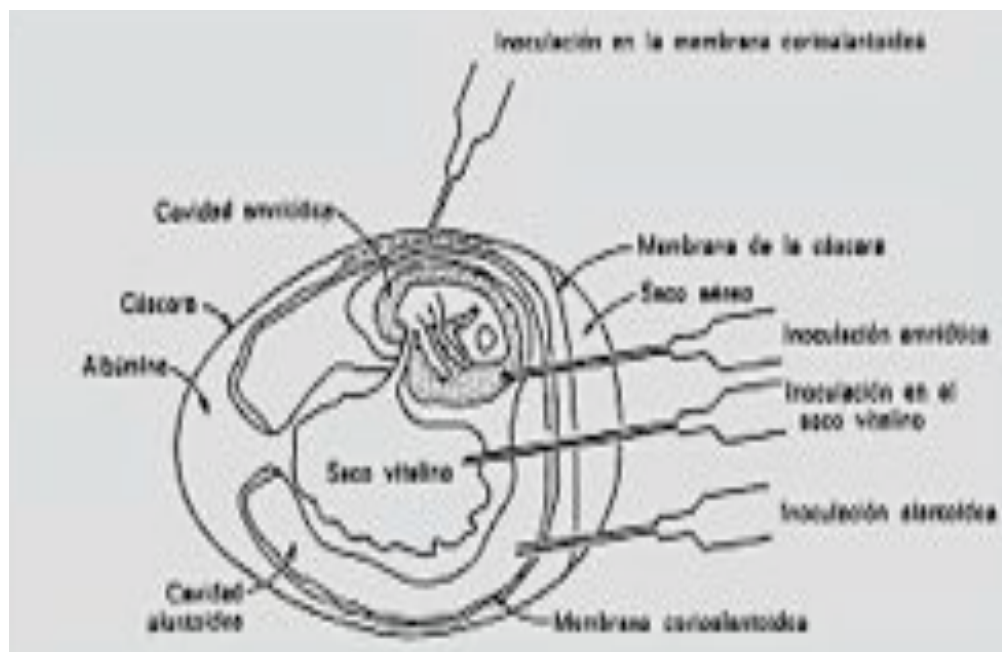


Región anatómica donde debe realizar la ligadura de píloro (foto tomada y modificada de S. Krueger *et al.*, / Pathology – Research and Practice 2011).

## 11 ANEXO 2

Representación esquemática de las vías de inoculación de embrión de pollo. Para inocular los embriones primero se revisa con ovoscopio que los embriones se encuentren viables (movilidad e irrigación), se marca la posición en la que se encuentra el embrión, así como, el contorno y la parte central del saco aéreo (Esquema 1, Vías de infección en embrión de pollo). Posteriormente, se desinfecta con solución yodada al 10% el área de inoculación (saco aéreo), se perfora el cascaron, en la marca del lado contrario a la posición del embrión y con una jeringa de insulina, con aguja del número 22G, se introduce completamente (en un ángulo de 90°) y se depositan 100 ul de un inóculo bacteriano ( $1.2 \times 10^8$  UFC/mL) en el saco vitelino. Se sella perfectamente la perforación y se regresa el embrión a la incubadora. Este procedimiento se realizó para todas las cepas de *H. pylori* y el control.

Esquema 1. vías de inoculación en embrión de pollo



Nota: Es de suma importancia localizar la posición exacta del embrión antes de inocular.

## 12 BIBLIOGRAFIA

1. Mégraud, A.L.a.F., *Helicobacter pylori: techniques for clinical diagnosis and basic research*, ed. W.B.S.C. Ltd.1996, Great Britain
2. Every, A.L., et al., *Localized suppression of inflammation at sites of Helicobacter pylori colonization*. Infect Immun, 2011. **79**(10): p. 4186-92.
3. Suerbaum, S. and C. Josenhans, *Helicobacter pylori evolution and phenotypic diversification in a changing host*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(6): p. 441-52.
4. Wroblewski, L.E., R.M. Peek, Jr., and K.T. Wilson, *Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk*. Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(4): p. 713-39.
5. Krueger, S., A. Roessner, and D. Kuester, *Murine models of H. pylori-induced gastritis and gastric adenocarcinoma*. Pathol Res Pract, 2011. **207**(10): p. 599-607.
6. Leonor, J.A., *Topografía de los genotipos de hpylori de vacA de H. pylori en suje con cáncer gástrico y controles*, in *Programa de Inmunología Molecular Microbiana2005*, Universidad Naciona Autónoma de México.
7. Karina, M.D.A., *Topografía de H. pylori y el gen asociado a la citotoxina cagA en sujetos con cáncer y dispepsia* in *Programa de Inmunología Molecular Microbiana2005*, Universidad Nacional Autónoma de México.
8. Carmina, J.R., *Identificación de genes H.pylori por PCR y microarreglos como marcadores de ulcera y cáncer gástrico*, in *Centro Medico Siglo XXI2011*, Universidad Nacional Autónoma de México: Posgrado en Ciencias Biológicas.
9. Hernandez-Hernandez Ldel, C., et al., *Relevance of Helicobacter pylori virulence factors for vaccine development*. Salud Publica Mex, 2009. **51 Suppl 3**: p. S447-54.
10. Brown, L.M., *Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission*. Epidemiol Rev, 2000. **22**(2): p. 283-97.
11. Smith, V.C. and R.M. Genta, *Role of Helicobacter pylori gastritis in gastric atrophy, intestinal metaplasia, and gastric neoplasia*. Microsc Res Tech, 2000. **48**(6): p. 313-20.
12. H M Malaty, D.Y.G., *Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of Helicobacter pylori infection*. Gut, 1994. **35**(6).

13. Javier Torres, Y.L.-H., Guillermo Perez-Perez, Alejandro Gomez, Margarita Camorlinga-Ponce, Roberto Cedillo-Rivera, Roberto Tapia-Conyer, and Onofre Muñoz, *A Community-Based Seroepidemiologic Study of Helicobacter pylori Infection in Mexico*. *Infectious Diseases*, 1998. **1089-94**.
14. Sachs, G. and D.R. Scott, *Helicobacter pylori: Eradication or Preservation*. *F1000 Med Rep*, 2012. **4**: p. 7.
15. Thomas, J.E., et al., *Isolation of Helicobacter pylori from human faeces*. *Lancet*, 1992. **340**(8829): p. 1194-5.
16. Young, K.A., et al., *Quantitative culture of Helicobacter pylori from gastric juice: the potential for transmission*. *J Med Microbiol*, 2000. **49**(4): p. 343-7.
17. Go, M.F., *Review article: natural history and epidemiology of Helicobacter pylori infection*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002. **16 Suppl 1**: p. 3-15.
18. Amieva, M.R. and E.M. El-Omar, *Host-bacterial interactions in Helicobacter pylori infection*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(1): p. 306-23.
19. Dorer, M.S., S. Talarico, and N.R. Salama, *Helicobacter pylori's unconventional role in health and disease*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(10): p. e1000544.
20. Kusters, J.G., A.H. van Vliet, and E.J. Kuipers, *Pathogenesis of Helicobacter pylori infection*. *Clin Microbiol Rev*, 2006. **19**(3): p. 449-90.
21. Lopez-Vidal, Y., et al., *High diversity of vacA and cagA Helicobacter pylori genotypes in patients with and without gastric cancer*. *PLoS One*, 2008. **3**(12): p. e3849.
22. Hatakeyama, M., *Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(9): p. 688-94.
23. Rugge, M., et al., *Gastric mucosal atrophy: interobserver consistency using new criteria for classification and grading*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002. **16**(7): p. 1249-59.
24. Pritchard, D.M. and S.M. Przemeck, *Review article: How useful are the rodent animal models of gastric adenocarcinoma?* *Aliment Pharmacol Ther*, 2004. **19**(8): p. 841-59.
25. Blaser, M.J. and J.C. Atherton, *Helicobacter pylori persistence: biology and disease*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(3): p. 321-33.

26. Backert, S., M. Clyne, and N. Tegtmeyer, *Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by Helicobacter pylori*. Cell Commun Signal, 2011. **9**: p. 28.
27. Magalhaes, A. and C.A. Reis, *Helicobacter pylori adhesion to gastric epithelial cells is mediated by glycan receptors*. Braz J Med Biol Res, 2010. **43**(7): p. 611-8.
28. Nilsson, C., et al., *Lipopolysaccharide diversity evolving in Helicobacter pylori communities through genetic modifications in fucosyltransferases*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3811.
29. Kodama, M., et al., *Animal models for the study of Helicobacter-induced gastric carcinoma*. J Infect Chemother, 2004. **10**(6): p. 316-25.
30. Harbour, S. and P. Sutton, *Immunogenicity and pathogenicity of Helicobacter infections of veterinary animals*. Vet Immunol Immunopathol, 2008. **122**(3-4): p. 191-203.
31. Shurman, D., M. Kamen, and H. Necheles, *The Shay mouse: production of gastric ulcers*. J Appl Physiol, 1957. **11**(2): p. 329-30.
32. Francisco, G.-V., *Herramientas Moleculares en el Laboratorio de Anatomía Patológica*,. ed. I.N.d. Pediatría, 2010.
33. Lee, A., et al., *A standardized mouse model of Helicobacter pylori infection: introducing the Sydney strain*. Gastroenterology, 1997. **112**(4): p. 1386-97.
34. Misiewicz, J.J., *The Sydney System: a new classification of gastritis. Introduction*. J Gastroenterol Hepatol, 1991. **6**(3): p. 207-8.
35. Price, A.B., *The Sydney System: histological division*. J Gastroenterol Hepatol, 1991. **6**(3): p. 209-22.
36. Goodwin, C.S., *The Sydney System: microbial gastritis*. J Gastroenterol Hepatol, 1991. **6**(3): p. 235-7.
37. Strickland, R.G., *The Sydney System: auto-immune gastritis*. J Gastroenterol Hepatol, 1991. **6**(3): p. 238-43.
38. Sipponen, P., M. Kekki, and M. Siurala, *The Sydney System: epidemiology and natural history of chronic gastritis*. J Gastroenterol Hepatol, 1991. **6**(3): p. 244-51.

39. Castillo-Rojas, G., et al., *Bleeding peptic ulcers and presence of Helicobacter pylori by various tests: a case-control study*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002. **14**(10): p. 1113-8.
40. Enroth, H. and L. Engstrand, *Egg passage of rodshaped and coccoid forms of Helicobacter pylori: preliminary studies*. Helicobacter, 1996. **1**(3): p. 183-6.
41. Ikemori, Y., et al., *Passage of chicken egg yolk antibody treated with hydroxypropyl methylcellulose phthalate in the gastrointestinal tract of calves*. J Vet Med Sci, 1996. **58**(4): p. 365-7.
42. Tytgat, G.N., *The Sydney System: endoscopic division. Endoscopic appearances in gastritis/duodenitis*. J Gastroenterol Hepatol, 1991. **6**(3): p. 223-34.
43. Day, A.S., et al., *Characterization of virulence factors of mouse-adapted Helicobacter pylori strain SS1 and effects on gastric hydrophobicity*. Dig Dis Sci, 2001. **46**(9): p. 1943-51
44. Dorer, M.S., et al., *Natural competence promotes Helicobacter pylori chronic infection*. Infect Immun, 2013. **81**(1): p. 209-15.
45. Zhang, S. and S.F. Moss, *Rodent models of Helicobacter infection, inflammation, and disease*. Methods Mol Biol, 2012. **921**: p. 89-98.
46. Takashima, M., et al., *Effects of Helicobacter pylori infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils*. Gut, 2001. **48**(6): p. 765-73.
47. Smolka, A.J. and S. Backert, *How Helicobacter pylori infection controls gastric acid secretion*. J Gastroenterol, 2012. **47**(6): p. 609-18.
48. Taylor, J.M., et al., *Effects of a Th1- versus a Th2-biased immune response in protection against Helicobacter pylori challenge in mice*. Microb Pathog, 2008. **44**(1): p. 20-7
49. Rogers, A.B., *Histologic scoring of gastritis and gastric cancer in mouse models*. Methods Mol Biol, 2012. **921**: p. 189-203.
50. Houghton, J.M., *Helicobacter species methods and protocols. Introduction*. Methods Mol Biol, 2012. **921**: p. 1-5.
51. Freire de Melo, F., et al., *Th1 immune response to H. pylori infection varies according to the age of the patients and influences the gastric inflammatory patterns*. Int J Med Microbiol, 2014. **304**(3-4): p. 300-6.
52. Rolig, A.S., et al., *The degree of Helicobacter pylori-triggered inflammation is manipulated by preinfection host microbiota*. Infect Immun, 2013. **81**(5): p. 1382-9.

53. Cellini, L., et al., *Transmission of Helicobacter pylori in an animal model*. Dig Dis Sci, 2001. **46**(1): p. 62-8.
54. Taylor, N.S., et al., *Enterohepatic Helicobacter species are prevalent in mice from commercial and academic institutions in Asia, Europe, and North America*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(7): p. 2166-72.
55. Lemke, L.B., et al., *Concurrent Helicobacter bilis infection in C57BL/6 mice attenuates proinflammatory H. pylori-induced gastric pathology*. Infect Immun, 2009. **77**(5): p. 2147-58.
56. Guo, G., et al., *Psychological stress enhances the colonization of the stomach by Helicobacter pylori in the BALB/c mouse*. Stress, 2009. **12**(6): p. 478-85.
57. Gupta, R.S., *Molecular signatures (unique proteins and conserved indels) that are specific for the epsilon proteobacteria (Campylobacterales)*. BMC Genomics, 2006. **7**: p. 167.
58. Craven, M., et al., *Evaluation of the Helicobacteraceae in the oral cavity of dogs*. Am J Vet Res, 2011. **72**(11): p. 1476-81.