



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN UN MODELO
MURINO DE INFECCIÓN CON *Helicobacter pylori*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

SANTIAGO GABRIEL PERALTA OLVERA

ASESOR:

Dr. GONZALO CASTILLO ROJAS

CO-ASESOR:

Dr. SAMUEL PONCE DE LEON ROSALES

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Andrés Romero Rojas

Vocal: MVZ. Ángel German Martínez Sosa

Secretario: Dr. Gonzalo Castillo Rojas

1° Suplente: Dr. Salvador Fonseca Coronado

2° Suplente: M. en C. Sandra Socorro Martínez

Sitio donde se desarrolló el tema: Programa de Inmunología Molecular Microbiana,
Facultad de Medicina, UNAM.

Asesor del tema: Dr. Gonzalo Castillo Rojas

Supervisor técnico: Dr. Samuel Ponce de León Rosales

Sustentante: Santiago Gabriel Peralta Olvera

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por haberme brindado los conocimientos necesarios para poder desarrollarme como futuro profesionalista.

A la Dra. Yolanda López Vidal por la oportunidad de unirme a su grupo de trabajo y poder realizar este proyecto.

Al Dr. Gonzalo Castillo Rojas por la confianza, el apoyo y continua supervisión brindada a lo largo del desarrollo del proyecto.

Al Dr. Samuel Ponce de León Rosales por su valioso apoyo brindado a lo largo del desarrollo del proyecto.

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 del Programa “Apoyo a Ayudantes de Investigador Nacional Nivel III o Emérito” durante el periodo del 25 de enero de 2015 al 25 de Abril de 2016, con ayuda del Dr. Samuel Ponce de León Rosales.

A la pQFB. Rosa Isabel Amieva Fernández por su apoyo en la parte microbiológica de este trabajo, además de todas las enseñanzas y apoyo recibido a lo largo del desarrollo de este trabajo. A la Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal por su apoyo y supervisión brindada en la elaboración de la técnica de citometría de flujo.

Al M. en C. Francisco Javier García Vázquez del Laboratorio de Patología del Instituto Nacional de Pediatría, a la Dra. Guillermina Baay y a la Dra. Sara Huerta Yépez de la Unidad de Investigación de Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez por su valiosa ayuda en histología e Inmunohistoquímica.

DEDICATORIAS

A mis padres Ricarda y Santiago, por su cariño y apoyo brindado siempre, porque gracias a ustedes he llegado hasta donde estoy, y sé que juntos lograremos muchas cosas más.

A mis hermanos, Nury y Ricardo, que a pesar de las diferencias que hemos tenido, siempre me han apoyado y por los consejos que me han dado para ser una mejor persona.

A mi abuelita Mode, a mis tíos, Faby, Luisa, Lupe, Toño, Paco y Ana, a mis primos por el apoyo incondicional que he tenido de cada uno de ellos, en especial a mi prima Gaby que me apoyo y resolvió muchas de mis dudas.

A mis amigos Yuno, Alexis, Eduardo y John, que son como mi familia, y han estado en momentos muy importantes para mí, y sé que lo seguirán haciendo por mucho tiempo más.

A mi amiga Ana que siempre ha estado para escucharme y darme consejos, porque sé que siempre puedo contar con ella.

A mis amigos Saul, Axel, Karla, Lloali, Ale, Jessica, Nieves, Ivan, Edgar, Gil por su amistad y apoyo a lo largo de estos años.

A mis amigos de la FESC, Rafa, Chris, Mau, Coco, que desde los primeros días hicieron menos pesada la carrera, a Adri y a Juanito que a pesar de que los conocí tiempo después también han sido parte importante.

A todos los compañeros y amigos del PIMM, Mari, Gaby, Kenia, Ivette, Paty, Karen, Steph, Rubén, Braulio, que desde el momento que llegue me hicieron parte del grupo, por su apoyo para realizar parte de mis experimentos y por hacer la estancia en el laboratorio más divertida.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Jurado Asignado	i
Agradecimientos	ii
Dedicatorias	iii
Índice General	iv
Resumen	v
Abreviaturas	vi
Introducción	1
Características de <i>Helicobacter pylori</i>	2
Epidemiología	3
Ruta de Transmisión	5
Factores de virulencia	6
Isla de Patogenicidad <i>cag</i> (<i>cag</i> -PAI)	11
Fisiopatología de la infección	13
Métodos de diagnóstico	14
Tratamiento	18
Respuesta Inmune contra <i>H. pylori</i> en humanos	19
Respuesta inmune contra <i>H. pylori</i> en modelo murino	20
Justificación	22
Hipótesis	23
Objetivos	24
Objetivo General	24
Objetivos Específicos	24
Metodología	25
Resultados	34
Discusión	44
Conclusiones	50
Perspectivas	51
Anexo I	52
Anexo II	54
Referencias	56

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria gramnegativa que coloniza la mucosa gástrica del humano, causa una de las infecciones más comunes en el ser humano, se estima que alrededor de 50% de la población mundial está infectada, esta infección se adquiere en la infancia y puede persistir a lo largo de la vida, el 80% de los infectados transcurren con una infección asintomática, el resto puede desarrollar gastritis crónica, úlcera péptica, linfoma tipo MALT o cáncer gástrico. Existen muchos factores que pueden influenciar el curso de la enfermedad, como lo son: características de la bacteria, factores ambientales y del hospedero, en los últimos años se ha estudiado el papel que juega la respuesta inmune del hospedero contra el patógeno. El objetivo de este trabajo fue determinar el tipo de respuesta inmune que se presenta ante la infección de un modelo murino con una cepa clínica de *H. pylori* y relacionarlo con el daño generado a nivel histológico. Los resultados obtenidos por la amplificación del gen *16S RNAr* de muestras de tejido gástrico muestran un porcentaje de infección que va del 40 al 60% en los animales de estudio. El análisis por citometría de flujo de la respuesta inmune, mostró un aumento en la respuesta Th17 comparado con el grupo control. El análisis histológico mostró un infiltrado inflamatorio leve en la mucosa gástrica de los animales infectados, acompañado de erosión de la mucosa. En conclusión, podemos decir que, a pesar de no contar con una cepa adaptada al ratón, el modelo de infección propuesto puede aportar información valiosa para comprender mejor el desarrollo de patologías causadas por la infección de *H. pylori*.

ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
AlpA, AlpB	Lipoproteínas asociadas a adhesina
APC's	Células Presentadoras de Antígeno
BabA	Adhesina de unión al antígeno ABO de grupo sanguíneo
cag-PAI	Isla de Patogenicidad cag
CagA	Proteína Asociada a la Citotoxina
CO ₂	Dióxido de Carbono
CD	Células dendríticas
DNA	Acido Desoxirribonucleico
H ₂ O	Agua
HopZ	Proteína de membrana externa
H&E	Tinción Hematoxilina-Eosina
IARC	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer
IBP's	Inhibidores de la Bomba de Protones
IL	Interleucina
IL-1β	Interleucina 1 beta
kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltones
Le ^b	Antígeno de Lewis B
Le ^x	Antígeno de Lewis X
MALT	Tejido Linfoide Asociado a Mucosas
μm	Micrómetros
μL	Microlitros
N ₂	Nitrógeno
NH ₃	Amoniaco
NF-κB	Factor de Transcripción nuclear kappa Beta
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
Ni ²⁺	Ion de Níquel
O ₂	Oxígeno
OpiA	Proteína inflamatoria de membrana externa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OMP's	Proteínas de Membrana Externa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
SabA	Adhesina de unión a ácido siálico
SST4	Sistema de Secreción Tipo 4
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante beta
Th1	Células Cooperadoras tipo 1
Th2	Células Cooperadoras tipo 2
Th17	Células Cooperadoras tipo 17
TLR	Receptores tipo Toll
Treg	Células Cooperadoras reguladoras
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UreA	Subunidad A de Ureasa
UreB	Subunidad B de Ureasa
VacA	Citotoxina vacuolizante

INTRODUCCIÓN

Organismos en forma de espiral se han observado en la mucosa gástrica desde hace más de 100 años. En 1975 Steer & Colin-Jones, asociaron la presencia de bacterias gramnegativas en la mucosa gástrica con gastritis. En 1983, los informes de Warren & Marshall, describieron la asociación entre la presencia de organismos en espiral en la mucosa gástrica y la gastritis antral en adultos. Estudios siguientes en adultos y niños, confirmaron esta asociación con la enfermedad de úlcera duodenal (Drumm, 1990).

Inicialmente esta bacteria fue referida como un organismo similar a *Campylobacter* debido a las similitudes morfológicas y llamado *Campylobacter jejuni*. Después de cultivarlo con éxito, en 1984, fue nombrado "*Campylobacter pyloridis*", pero más tarde fue cambiado por razones gramaticales a *Campylobacter pylori*. Posteriormente, fue designado dentro de un nuevo género, *Helicobacter*, ahora es llamado *Helicobacter pylori* (Drumm, 1990).

H. pylori es una bacteria gramnegativa, en espiral y microaerofílica que tiene la capacidad de colonizar la mucosa gástrica por años, su presencia está fuertemente asociada con la gastritis superficial, difusa y crónica del fondo y el antro gástrico, evidencias sugieren que la gastritis causada por *H. pylori* puede progresar a gastritis crónica atrófica, lesión precursora del carcinoma gástrico (Nomura et al., 1991).

H. pylori es la segunda causa de morbilidad a nivel mundial en seres humanos. Además, la infección por *H. pylori* tiene una relación causal con la gastritis crónica atrófica, cáncer gástrico y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). Con base a numerosos estudios epidemiológicos se ha demostrado que la infección por *H. pylori* se asocia con un mayor riesgo al desarrollo de adenocarcinoma gástrico, por esto la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) y la Organización mundial de la Salud (OMS) concluyeron

que es un carcinógeno de tipo 1, definido en seres humanos (Crew & Neugut, 2006; Kodama et al., 2005; Sugiyama & Asaka, 2004).

Características microbiológicas de *H. pylori*

H. pylori es una bacteria gramnegativa, mide de 2 a 4 μm de largo y de 0.5 a 1 μm de ancho. Sin embargo, usualmente se encuentra en forma de espiral, cuenta con un mechón de 2 a 6 flagelos de 3 μm de largo, los cuales le confieren un movimiento rápido en la mucosa que recubre a las células epiteliales gástricas (Kusters, van Vliet, & Kuipers, 2006).

También se han encontrado en formas cocoides, las cuales aparecen después de cultivar al microorganismo por tiempo prolongado *in vitro*, o a la exposición con antibióticos. Estas formas cocoides no pueden ser cultivadas *in vitro* y se piensa que sea una forma degenerativa del microorganismo, sin embargo, también se ha sugerido que represente un estado viable, no cultivable (Cover, 2012; Kusters et al., 2006).

H. pylori es una bacteria microaerofílica, con crecimiento óptimo entre 2 y 5% de O_2 y cerca del 5 a 10% de CO_2 , además de humedad elevada. Se han estandarizado condiciones microaerofílicas (5% O_2 , 85% N_2 y 10% CO_2) para el crecimiento de *H. pylori* (Cover, 2012; Kusters et al., 2006). El crecimiento de *H. pylori* es muy similar al método usado para especies de *Campylobacter*, esta crece a 37°C, con un pH de 5.5 a 8, donde el crecimiento óptimo se da a un pH neutro, el crecimiento se da entre 4 y 10 días a las condiciones ya mencionadas (Kusters et al., 2006). *H. pylori* puede ser aislado de muestras gástricas usando medios no selectivos, pero el uso de antibióticos es importante para el crecimiento selectivo de la bacteria. Por ejemplo, las combinaciones de vancomicina, polimixina, trimetoprim, bacitracina y anfotericina son incluidos en medios para el aislamiento del microorganismo. Los medios de aislamiento comúnmente utilizados son: agar

Brucella, agar Columbia, agar infusión cerebro-corazón o agar soya tripticaseína, suplementado con sangre de carnero o caballo (5-10%) (Cover, 2012).

Epidemiología

La infección por *H. pylori* es una de las infecciones crónicas más comunes entre los humanos, la cual afecta a más del 50% de la población a nivel mundial (De Falco et al., 2015; A. Y. Wang & Peura, 2011), la infección se presenta en personas de todas las edades, siendo los países en vías de desarrollo los que adquieren la infección a una edad más temprana, en comparación con los países industrializados (A. Y. Wang & Peura, 2011), la prevalencia de la infección varía según las regiones geográficas, edad, nivel socioeconómico, nivel educativo condiciones de vida y la gran mayoría de las infecciones se dan en los países en vías de desarrollo dónde hasta un 80% de los adultos de edad media puede estar infectado (De Falco et al., 2015).

Se han realizado diversos estudios en Europa y Latinoamérica en los cuales se ha encontrado una alta prevalencia de infección con *H. pylori*, estos estudios revelaron que en la población adulta, en Europa la prevalencia es de 79,2%, mientras que en seis países de América Latina es de 73 a 83%, incluidos México, Chile, Colombia, Costa Rica, Honduras y Nicaragua (Torres et al., 1998).



Figura 1. Seroprevalencia mundial de la infección con *Helicobacter pylori*. Los países desarrollados tienen una seroprevalencia menor con respecto a los países en vías de desarrollo (Parkin, 2004).

Estudios realizados en México a partir de muestras serológicas, revelaron que, a la edad de 1 año, el 20% de los niños están infectados, la seroprevalencia aumenta en la primera década de edad, a la edad de 10 años, 50% de los niños están infectados, a la edad de 25 años, más del 80% de los adultos están infectados, la seroprevalencia a edades más avanzadas se mantiene constante.

Un análisis realizado en México reveló el papel que juegan las variables socioeconómicas y demográficas en la seroprevalencia de la infección por *H. pylori*, como lo son el hacinamiento, nivel de educación y el nivel socioeconómico y cómo éstos se asocian con una seroprevalencia significativamente mayor en las primeras cuatro décadas de vida. El nivel socioeconómico y de hacinamiento se asociaron significativamente con la infección con *H. pylori* además se encontró una relación inversa entre el nivel de educación y el riesgo de infección. No se observó una relación entre la prevalencia de la infección y el tipo de población (rural y urbana) ni con el nivel de desarrollo de la región (Torres et al., 1998).

Ruta de Transmisión

Se ha propuesto que la infección con *H. pylori* se adquiere a edades tempranas, y ya que esta se presenta con mayor prevalencia en países en vías de desarrollo que en países industrializados, se ha asociado con el nivel sociocultural y económico de la población.

Este patrón de infección se asocia con mecanismos de transmisión directa o indirectamente relacionados con la higiene. La transmisión es de persona a persona y se han propuesto tres vías de transmisión: oral-oral, oro-gástrica y fecal-oral (Ferreira & Moss, 2014; Parsonnet, Shmueli, & Haggerty, 1999). Además existe otra hipótesis acerca de la transmisión de esta bacteria, esta propone como ruta de transmisión el agua contaminada con la bacteria (Aziz, Khalifa, & Sharaf, 2015).

Transmisión oral-oral, esta propuesta se dio por el hallazgo de *H. pylori* en la placa dental y la identificación de su genoma en saliva, una de las contradicciones de esta propuesta es que la identificación del genoma de *H. pylori* se da por PCR, y esta técnica no puede diferenciar entre el DNA de células viables o no viables (Parsonnet et al., 1999).

Transmisión oro-gástrica, esta hipótesis se apoya en la ocurrencia de algunos brotes asociados con el manejo y desinfección inadecuada de gastroscopios. El cual también se podría relacionar al vómito, estudios realizados en pacientes infectados con esta bacteria se logró aislar exitosamente a *H. pylori*, variando el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) pero encontrándose en casi un 90% de los casos (Parsonnet et al., 1999).

Transmisión fecal-oral, esta vía explica más fácilmente la marcada diferencia en la prevalencia de *H. pylori* en países en desarrollo comparada con países

desarrollados, además involucra otros aspectos como la higiene, los métodos de PCR han permitido su identificación en materia fecal, no obstante, estas técnicas han tenido limitaciones debido a los metabolitos presentes en la materia fecal, como algunos polisacáridos, lo que han llevado a resultados erráticos. Sin embargo, la identificación del genoma de esta bacteria en agua potable, tanto en países en desarrollo como en países industrializados, apoya la transmisión fecal de este agente (Stone, 1999).

Se ha sugerido la hipótesis que el agua es una ruta de transmisión de *H. pylori*, la cual está apoyada por estudios epidemiológicos en los cuales se observó una mayor prevalencia en la infección y una tasa de adquisición más rápida en países en vías de desarrollo, que en aquellos que no cuentan con una distribución de agua potable adecuada (Aziz et al., 2015).

Factores de virulencia

Existen diversos factores de la bacteria que contribuyen a la colonización de *H. pylori* en la mucosa gástrica y además intervienen en las múltiples patologías causadas por esta bacteria, tales como, la ureasa bacteriana, flagelos, adhesinas, toxinas, etc.

Un factor que ha demostrado ser esencial para la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* es contar con flagelos que le confieren motilidad a la bacteria, en mutantes no móviles que no presentan estas estructuras, se ha demostrado que son incapaces de establecer una infección persistente en modelos animales. *H. pylori* cuenta con dos a seis flagelos polares, los cuales, se extienden aproximadamente de 3-5 μm desde la superficie de la bacteria, el flagelo está constituido por dos principales proteínas, FlaA y FlaB, las cuales son indispensables para una buena movilidad de la bacteria (Dunne, Dolan, & Clyne, 2014). Los flagelos son organelos complejos que están compuestos por

aproximadamente 30 proteínas distintas, las cuales son necesarias para la expresión y el ensamblaje del flagelo (Zanotti & Cendron, 2014).

Para colonizar el tracto gastrointestinal, *H. pylori* tiene que sobrevivir al medio ácido en el lumen del estómago, para esto dedica varios genes en la síntesis de una enzima ureasa citosólica, esta enzima cataliza la hidrólisis de la urea en NH_3 y CO_2 . La ureasa se rige por un grupo de siete genes, incluyendo los genes que codifican para las subunidades UreA (26.5 kDa), UreB (60.3 kDa) y las proteínas accesorias que son responsables de la absorción de Ni^{2+} . La ureasa es una estructura dodecámerica, compuesta de seis subunidades de UreA y seis de UreB, dispuestas en forma de doble anillo de 13 nm de diámetro. La cantidad de ureasa producida por la bacteria varía con las condiciones de cultivo y puede alcanzar hasta un 10% de la proteína total de la bacteria (Montecucco & Rappuoli, 2001).

La adherencia de *H. pylori* al epitelio gástrico facilita la colonización inicial, la persistencia de la infección, y la entrada de otros factores de virulencia a la célula epitelial. Estas proteínas de membrana externa (OMP's, por sus siglas en inglés) son muy importantes para la colonización del epitelio gástrico (Maeda & Mentis, 2007), estudios han mostrado que aproximadamente 45 por ciento del genoma de *H. pylori* está previsto para codificar OMP's, la expresión de OMP's se ha asociado con enfermedades gastroduodenales y un aumento en el riesgo de desarrollo de cáncer gástrico (Maeda & Mentis, 2007; Wroblewski, Peek, & Wilson, 2010).

La adhesina de unión a antígeno de grupo sanguíneo (Kalali, 2014 #26) es una proteína de 78 kDa que está codificada en el gen *babA2*, esta se une al antígeno de Lewis b (Le^b) fucosilado en la membrana de las células epiteliales gástricas, la cual ha sido de las proteínas de membrana externa más estudiadas en *H. pylori*. Se ha propuesto que esta adhesina ha evolucionado para adaptarse a los patrones de glicosilación de la mucosa gástrica, para así poder colonizar a su

huésped y establecer una infección persistente. La presencia de babA2 es asociada con la úlcera duodenal y cáncer gástrico, cuando se encuentran en junto con la proteína asociada a la citotoxina (CagA) y la citotoxina vacuolizante (VacA), se asocia con un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad más grave (Maeda & Mentis, 2007).

Independientemente de la unión al grupo sanguíneo fucosilado a través de BabA, *H. pylori* se une a glucoesfingolípidos modificados con ácido siálico, particularmente al antígeno de Lewis sialilado “x” y “a” (sLe^x y sLe^a), a través de la adhesina de unión a ácido siálico (SabA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, sLe^x está ausente en la mucosa gástrica sana, por lo tanto, la adhesión mediada por SabA se convierte en un factor relevante en la persistencia de la infección, una vez establecida la colonización y el desarrollo de procesos inflamatorios en el estómago.

Se ha demostrado que la inflamación inducida por la infección con *H. pylori* conduce a una elevada expresión de la glucosiltransferasa β 3GnT5, la cual interviene como factor en la biosíntesis del antígeno sLe^x (Posselt, Backert, & Wessler, 2013).

HopZ es una proteína de 74 kDa que está involucrada en la adhesión entre *H. pylori* y líneas de células epiteliales gástricas, aunque aún no se describe exactamente su función, algunos estudios realizados con mutantes de HopZ se demostró que la bacteria pierde la capacidad de colonizar el estómago de ratones infectados (Kalali, Mejias-Luque, Javaheri, & Gerhard, 2014).

Otras proteínas involucradas en la adhesión de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas son las proteínas de adhesión AlpA y AlpB (*adherence associated lipoprotein*), estas están estrechamente relacionadas ya que se encuentran en el mismo operón dentro del genoma de *H. pylori* y son homólogas a las proteínas HopC y HopB, respectivamente. Sin embargo, aún no se tiene claro el papel que

juegan estas proteínas en la colonización de la bacteria, pero en estudios realizados en cobayos, se demostró que las cepas que son deficientes en esta dos proteínas son incapaces de colonizar el estómago de los animales (Dunne et al., 2014).

Si bien las adhesinas tienen un papel importante en el establecimiento de la infección, existen otras proteínas importantes en la patogénesis causada por *H. pylori*, la proteína inflamatoria de membrana externa (OpiA, por sus siglas en inglés), es una OMP proinflamatoria, también conocida como HopH ó OMP13, es una proteína de 35 kDa, en un principio se encontró que era capaz de aumentar la secreción de interleucina 8 (IL-8 o CXCL8) en líneas celulares de epitelio gástrico en conjunto con la isla de patogenicidad *cag* (*cag*-PAI) (Kalali et al., 2014). Yamaoka et al, descubrieron que estaba relacionada con los niveles de secreción de IL-8 en la mucosa gástrica, que esta proteína estaba presente en 97.5% de los pacientes con gastritis o úlcera duodenal cuando se comparaba con los pacientes con gastritis crónica (70%) (Roesler, Rabelo-Goncalves, & Zeitune, 2014).

Uno de los factores de virulencia mayormente estudiados es la proteína VacA, la cual, es uno de los principales factores de virulencia secretados por *H. pylori* y su nombre de citotoxina vacuolizante proviene de su capacidad de internalizarse en las células epiteliales gástricas y formar vacuolas.

El gen que codifica a *vacA* está presente en todas las cepas de *H. pylori* y este muestra una diversidad alélica en tres regiones principales (figura 2), la región señal (s), la intermedia (i) y la región media (m), es por esto que la actividad de la citotoxina varía entre cada cepa, puede haber diferentes combinaciones de dos alelos de cada región (s1, s2, i1, i2, m1, m2), lo que resulta en diferentes toxinas con diferentes capacidades para inducir la vacuolas en células epiteliales (Blaser & Atherton, 2004; Roesler et al., 2014).

VacA se expresa como una protoxina de alrededor de 140 kDa, que es sometida a un proceso proteolítico durante la secreción a través de un sistema de secreción tipo V, la forma madura de VacA es secretada como un monómero de 88 kDa, el cual está compuesto por dos dominios, un fragmento N-terminal de 33 kDa y un fragmento de 55 kDa, llamados p33 y p55, respectivamente; los cuales permanecen unidos de forma no covalente, que pueden representar dos subunidades distintas de VacA y que pueden presentar dos actividades distintas de la toxina (Boquet & Ricci, 2012; Kim & Blanke, 2012).

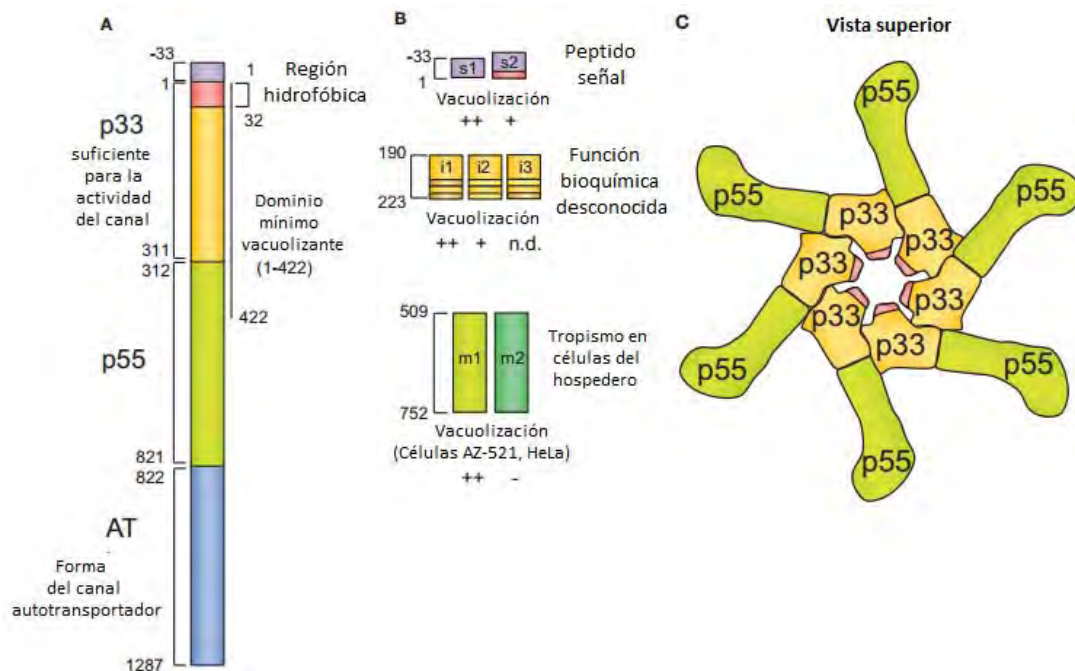


Figura 2. Estructura de VacA. **(A)** estructura esquemática de VacA, en colores se representa cada uno de los dominios. **(B)** Representación de los principales alelos situados en cada una de las regiones de VacA que le confieren su capacidad polimórfica. **(C)** Estructura propuesta del ensamblaje oligomérico de VacA, basado en la estructura cristalizada de la porción p55 e imágenes de microscopía electrónica de los oligómeros de VacA (Kim & Blanke, 2012).

Estudios epidemiológicos han proporcionado evidencia de una mayor asociación de la enfermedad en personas infectadas con cepas de *H. pylori* con el alelo s1 de VacA, el cual presenta una mayor actividad intracelular en ensayos *in vitro* en comparación con las cepas que presentan el alelo s2, además el alelo s1 está

relacionado con un mayor riesgo de padecer úlcera gástrica y cáncer gástrico (Kim & Blanke, 2012; Roesler et al., 2014).

Por otra parte, las cepas que contienen el alelo m1 están asociadas a una mayor formación de vacuolas y con respecto a la enfermedad, están relacionadas al desarrollo de lesiones como gastritis atrófica y metaplasia intestinal hasta llegar a cáncer gástrico, en comparación con las cepas con el alelo m2 (Kim & Blanke, 2012).

Las cepas VacA s1/m1 son capaces de generar vacuolas en las células epiteliales gástricas además aumentar el riesgo de padecer úlcera péptica y cáncer gástrico, mientras que las cepas VacA s2/m2 no son capaces de hacerlo, con respecto a la región i, las cepas s1/m2 tienen un alelo i1, tienen la capacidad de generar vacuolas, mientras que las cepas s1/m2 con un alelo i2 no tienen esta capacidad (Roesler et al., 2014).

Isla de patogenicidad *cag* (*cag*-PAI)

La mayoría de las cepas de *H. pylori* poseen la isla de patogenicidad *cag*, un fragmento genómico de aproximadamente 37-40 kb (figura 3), que contiene alrededor de 29-30 genes, estos codifican para diferentes componentes como el sistema de secreción tipo IV (SSTIV), entre otros (Montecucco & Rappuoli, 2001; Suerbaum & Josenhans, 2007; Suerbaum & Michetti, 2002). Uno de los genes que se encuentra en el extremo 5' es el gen asociado a la citotoxina (*cagA*) es un gen polimórfico que presenta diferentes números de secuencias repetidas en su región 3', cada una de estas regiones contiene motivos de Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA), existen cuatro diferentes motivos EPIYA-A, -B, -C y -D (Roesler et al., 2014), los cuales se diferencian por el número de repeticiones de estos aminoácidos, su posición y por las secuencias que están flanqueados.

Las cepas de *H. pylori* con un mayor número de motivos EPIYA-C son capaces de inducir niveles más altos de fosforilación en CagA y con esto cambios más significativos en el reordenamiento del citoesqueleto, procesos que están asociados a un mayor riesgo a desarrollar gastritis atrófica y cáncer gástrico (Maeda & Mentis, 2007).

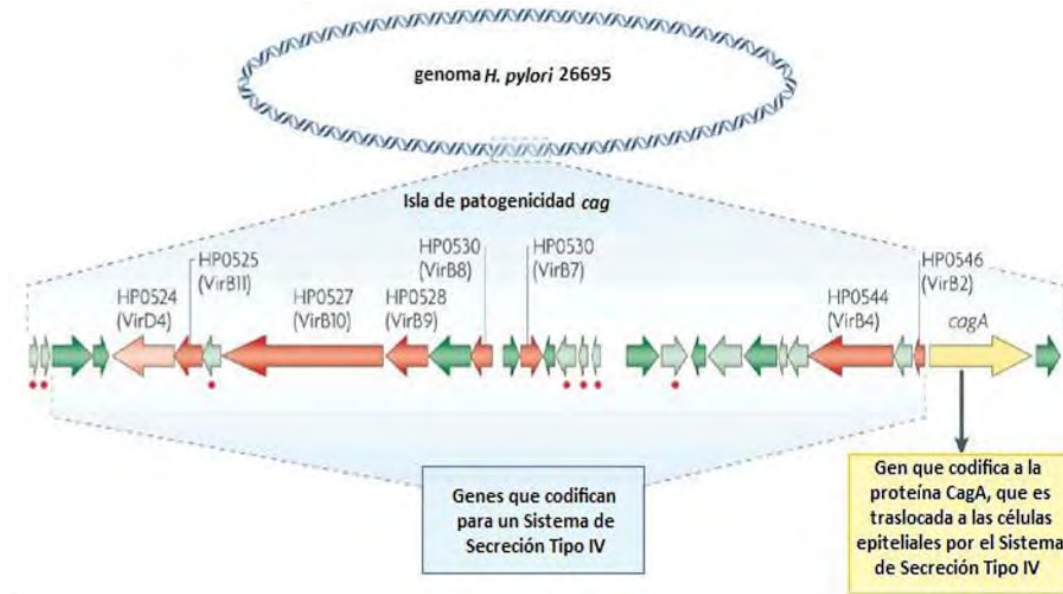


Figura 3. Estructura de la *cag*-PAI. Fragmento cromosómico de 40 kb, que codifica para aproximadamente 30 genes involucrados en el ensamble de SST4 y CagA. Los genes marcados en rojo presentan similitudes con el SST4 de *Agrobacterium tumefaciens*, los genes marcados en verde y rojo oscuro están relacionados con la inducción de secreción de IL-8 por células epiteliales gástricas. Los genes marcados con un punto rojo no son requeridos para la translocación de CagA, mientras que los que no están marcados son esenciales para este proceso (Suerbaum & Josenhans, 2007).

La proteína CagA es translocada a las células epiteliales a través del SSTIV, una vez dentro, CagA puede interactuar con diversas cinasas y al ser fosforilada puede desencadenar diferentes vías de señalización. La fosforilación de CagA en los motivos EPIYA-D y -C por la cinasa SHP-2 activa la vía de señalización de las MAPK/ERK, aumentando la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8 en las células epiteliales gástricas (Suzuki et al., 2015), por otra parte, si CagA es fosforilada en un motivo EPIYA-A activa a la cinasa CsK que a su vez

fosforila a Src, la cual es una cinasa implicada en la inhibición del crecimiento división y diferenciación celular, en contraste si CagA es fosforilado en un motivo EPIYA-B esta puede interactuar con la cinasa PI3K la cual puede activar la vía Akt, la cual está implicada en la proliferación celular o bien interactuar con la cinasa de adhesión focal (FAK, por su siglas en ingles), molécula implicada en el desarrollo del fenotipo “colibrí” en células epiteliales gástricas (Alzahrani et al., 2014; Dunne et al., 2014).

Fisiopatología de la infección

La infección por *H. pylori* se presenta inicialmente en la parte antral y con el paso del tiempo puede diseminarse al cuerpo del estómago, en pacientes con tratamiento antiácido la colonización predomina en el cuerpo gástrico, el curso clínico de la infección es muy variable (figura 4), y depende de muchos factores propios de la bacteria y del hospedero, la manera en la que se distribuye la gastritis puede influenciar el resultado de las diversas patologías causadas por *H. pylori*, como son úlcera péptica y gástrica, atrofia gástrica, linfoma tipo MALT o cáncer gástrico (Suerbaum & Michetti, 2002).

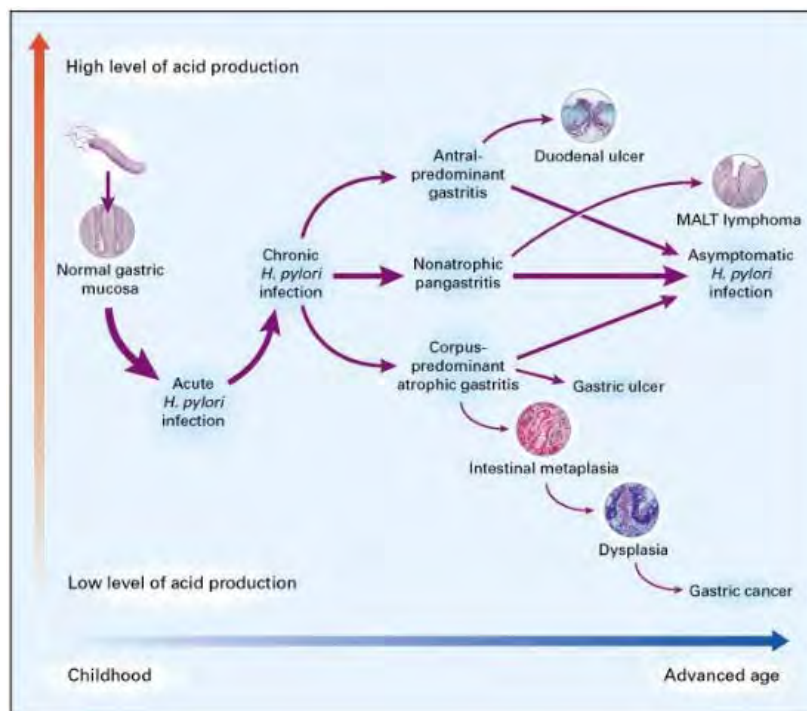


Figura 4. Historia natural de la infección por *H. pylori*. La infección por *H. pylori* puede desencadenar diferentes patologías dependiendo de las alteraciones en la mucosa y secreción de ácido conforme avanza el tiempo (Suerbaum & Michetti, 2002).

Con el paso del tiempo la infección crónica del estómago puede generar una gastritis atrófica, la cual dependiendo de la región del estómago en la que se localiza puede desarrollar diferentes patologías. Si existe una gastritis que predomina en la región antral del estómago, es más probable que se pueda desarrollar úlceras duodenales, en este caso los pacientes tienen un menor riesgo de padecer cáncer gástrico, por el contrario, si existe una gastritis multifocal predominante en la región del cuerpo del estómago, esta puede desarrollar una úlcera gástrica o bien una gastritis crónica atrófica, en este caso los pacientes tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico, por otra parte, si se presenta una gastritis no atrófica localizada en múltiples regiones del estómago, existe una mayor probabilidad de que la infección ocurra de manera asintomática o bien que se desarrolle en menor medida un linfoma tipo MALT (Correa & Piazzuelo, 2008; Suerbaum & Michetti, 2002).

El cáncer gástrico se desarrolla aproximadamente entre 1-3% de los pacientes infectados, el cáncer gástrico desarrollado por pacientes infectados con *H. pylori* representa el 63.4% de los casos de cáncer de estómago a nivel mundial, además la infección con *H. pylori* está asociado al desarrollo de linfoma tipo MALT, ya que la erradicación de la infección se traduce en la remisión completa del 60-80% de los pacientes con linfoma (Hagymasi & Tulassay, 2014).

Métodos de diagnóstico

El diagnóstico de la infección por *H. pylori* es una parte muy importante en el control de las enfermedades gastroduodenales, existen diferentes pruebas de diagnóstico invasivas y no invasivas que están disponibles para la detección de este microorganismo, cada una de estas tiene su utilidad y limitación. Aunque

ninguna puede ser considerada como un estándar de oro, varias técnicas se desarrollaron para dar resultados confiables (Y. K. Wang et al., 2015). La obtención de tejido gástrico o biopsia mediante una endoscopia, sigue siendo la forma de diagnóstico invasivo estándar para la identificación de *H. pylori*, además es posible establecer el daño histopatológico causado por la infección, el grado de inflamación o la presencia de úlcera péptica, linfoma MALT, metaplasia intestinal, displasia o neoplasia (Ferreira & Moss, 2014; Y. K. Wang et al., 2015).

La mayoría de las características de la mucosa gástrica y sus anormalidades no son lo suficientemente específicas para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, lo cual limita el diagnóstico preciso. Existen métodos basados en la endoscopia convencional que utilizan colorantes, la cromoendoscopia con rojo de fenol también se ha evaluado como método de diagnóstico para la infección de *H. pylori* basada en la actividad de la ureasa de *H. pylori*. Sin embargo, esta prueba cuenta con una sensibilidad y especificidad baja (Cho et al., 2008), por otra parte existen métodos endoscópicos novedosos que permiten visualizar estructuras microscópicas y morfología celular (Cho et al., 2008; Mentis, Lehours, & Megraud, 2015), esta endoscopia de aumento permite observar la macroestructura de la mucosa gástrica y patrones endoscópicos de alta resolución que permiten relacionar el cambio histopatológico con la infección con *H. pylori* (Mentis et al., 2015; Y. K. Wang et al., 2015).

Otro método considerado invasivo es la histología, la cual consiste en una toma de muestra de tejido para la búsqueda de *H. pylori* en la mucosa gástrica, este método es uno de los más utilizados y algunos autores lo proponen como el estándar de oro para el diagnóstico de la infección por este microorganismo, sin embargo, existen diferentes factores que pueden afectar la precisión de este método, como puede ser la localización, tamaño y número de biopsias tomadas, el consumo de inhibidores de la bomba de protones (IBP), así como, el consumo de antibióticos previo a la toma de muestra (Y. K. Wang et al., 2015).

La parte importante de la histología es la tinción del tejido gástrico para evidenciar la presencia de *H. pylori*, existen diversas tinciones para este fin tales como hematoxilina-eosina (H&E), Giemsa, Warthin-Starry o tinción con plata, inmunohistoquímica (IHQ), entre otras (Hartman & Owens, 2012; Mentis et al., 2015; Y. K. Wang et al., 2015), si bien la tinción de H&E es la primera elección en la clínica para evaluar el daño en la mucosa gástrica, esta no es la ideal para la detección del microorganismo, las tinciones como Giemsa y Warthin-Starry pueden ayudar a visualizar los bacilos en la mucosa gástrica pero estas no son tan específicas ya que se pueden observar microorganismos con la misma morfología y que no son necesariamente *H. pylori*, por lo tanto para la detección precisa de *H. pylori* se utiliza la IHQ, ya que esta tiene casi un 100% de especificidad (Hartman & Owens, 2012). Existen tinciones nuevas como lo es la Hibridación fluorescente *in situ* acoplada a ácidos nucleicos peptídicos (PNA-FISH), la cual tiene una sensibilidad de 97% y una especificidad de 100%, otras de las ventajas de esta técnica es que puede detectar formas cocoides y también se puede utilizar para la detección de *H. pylori* en muestras ambientales, con la única desventaja de necesitar un microscopio de fluorescencia y contar con la experiencia para poder interpretar las imágenes obtenidas.

Otra de las pruebas consideradas como invasiva es la prueba rápida de la ureasa o CLOtest (*Campylobacter Like Organism*, por sus siglas en ingles), la cual se basa en la capacidad de la enzima ureasa secretada por *H. pylori* la cual descompone la urea en dióxido de carbono y amoniaco, la biopsia gástrica tomada por endoscopia se coloca en un medio semisólido rico en urea y con un indicador de pH como el rojo de fenol, si la muestra contiene *H. pylori* la ureasa descompone la urea y el ión amonio provoca un aumento en el pH del medio, el cual se observa por un cambio de color de amarillo a rojo o violeta (Megraud & Lehours, 2007). Existen diversas pruebas comerciales de ureasa rápida, las cuales tienen una especificidad por encima del 95%, y una sensibilidad entre un 85 a 95%, esta puede variar dependiendo de la carga bacteriana en la muestra, ya que se requiere 1×10^5 bacterias para que la prueba sea exitosa, además la toma

de IBP's y antibióticos previos a la toma de muestra pueden afectar el resultado de la prueba (Megraud & Lehours, 2007; Y. K. Wang et al., 2015).

El cultivo microbiológico de *H. pylori* a partir de muestras de biopsia gástrica es un método comúnmente empleado para el diagnóstico de la infección, que en general tiene casi un 100% de especificidad, pero la sensibilidad varía entre un 85-95%. Ya que *H. pylori* es un microorganismo con requerimientos muy específicos para su crecimiento *in vitro*, se requiere un medio de transporte, medio de cultivo y condiciones ambientales especiales. Los medios de transporte para las muestras de biopsias gástricas pueden ser: Portagerm pylori o medio de transporte Stuart, para un máximo de 24 horas a 4°C, mientras que los medios de cultivo para el aislamiento pueden ser agar Skirrow, agar sangre Columbia, agar Brucella, agar infusión cerebro-corazón (BHI), agar soya tripticasa, entre otros, suplementados con suero de caballo o de oveja, y las condiciones ambientales son microaerófilas que varían entre 80-90% de N₂, 5%-10% de CO₂, 5% de O₂ a 35-37°C, durante al menos 5-7 días (Cover, 2012).

Los dos métodos de diagnóstico no invasivos utilizados en la clínica, es la serología y la prueba de urea en aliento; los métodos serológicos permiten evaluar el nivel de anticuerpos contra *H. pylori* presentes en sangre, orina y saliva, además se han empleado métodos de detección de antígenos de *H. pylori* en heces cuya correlación es excelente con respecto al hallazgo de la bacteria en una biopsia (Parsonnet et al., 1999).

La detección de antígenos contra *H. pylori* en muestras serológicas, utiliza diferentes proteínas antigénicas de la bacteria (CagA, VacA, Ureasa y diversas OMP's) para detectar los anticuerpos generados a través de pruebas como ELISA, estas pruebas son utilizadas comúnmente en estudios epidemiológicos ya que son fáciles de realizar y cuentan con una especificidad y sensibilidad de aproximadamente 95%.

Otro método no invasivo que se utiliza para el diagnóstico de infección por *H. pylori* es la prueba de antígenos del microorganismo en materia fecal, la cual se ha reportado que tiene una sensibilidad y especificidad de entre 92-94% y 94-97%, respectivamente (Mentis et al., 2015; Y. K. Wang et al., 2015).

Por último, un método que se deriva de una prueba invasiva para la obtención de una biopsia gástrica y la identificación de *H. pylori*, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual se basa en la amplificación de un segmento de DNA específico de la especie, la secuencia utilizada más comúnmente es el gen 16S *rRNA*, esta prueba cuenta con una sensibilidad y especificidad mayor a 95%, sin embargo, técnicas moleculares más recientes como la PCR en tiempo real (PCR-RT) cuentan con una mayor sensibilidad y son capaces de detectar cantidades menores de bacterias (Megraud & Lehours, 2007; Mentis et al., 2015).

Tratamiento

El desarrollo de terapias eficaces para tratar la infección de *H. pylori* ha progresado poco a poco con el tiempo, los primeros estudios terapéuticos ya se realizaban en 1984, algunos de estos estudios se realizaron utilizando terapias con amoxicilina, dictratobismuto tripotásico y metronidazol, sin embargo, resultaron en solo una mejora transitoria en la gastritis y la erradicación del microorganismo era dudosa (Malfertheiner, Link, & Selgrad, 2014).

El tratamiento dual con silicato de bismuto y antibióticos también fracasó, lo cual llevó al desarrollo de nuevas opciones terapéuticas que consisten en una terapia triple con una sal de bismuto, metronidazol y tetraciclina, la cual se convirtió en una terapia exitosa para la erradicación de *H. pylori* (Ferreira & Moss, 2014).

Con la introducción de los IBP en 1989, se abrió un nuevo campo terapéutico para la erradicación de *H. pylori*, la combinación de estos IBP con amoxicilina fue la primera estrategia farmacológica que demostró ser eficaz para la erradicación de

H. pylori, consiguiendo tasas de erradicación de hasta un 80% (Malfertheiner et al., 2014).

Una terapia triple que utiliza subcitrato de bismuto, amoxicilina y nifuratel ha demostrado una tasa de eficacia de un 86%, sin embargo existen terapias cuádruples que han obtenido un porcentaje superior de eficacia, por ejemplo, una terapia por un periodo de tiempo de 14 días que utiliza dicitrato de bismuto, esomeprazol (IBP), amoxicilina y levofloxacino obtuvo una tasa de éxito de 90%, mientras que una terapia de 10 días que utiliza dicitrato de bismuto, esomeprazol, levofloxacino y tetraciclina mostro una tasa de éxito de 95.5%, lo cual indica que este tipo de terapias cuádruples son las que tienen mejor oportunidad de erradicar la infección con *H. pylori* (Safavi, Sabourian, & Foroumadi, 2016).

Respuesta inmune en humanos

La colonización del estómago por *H. pylori* genera una respuesta inflamatoria y el reclutamiento de diferentes células como neutrófilos, linfocitos, macrófagos y células dendríticas en la mucosa gástrica. Los mecanismos moleculares por los cuales *H. pylori* provoca y mantiene la respuesta inmune local son complejos, pero hay pruebas de que las citocinas producidas por ambas respuestas innata y adaptativa, pueden conducir al desarrollo de úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma tipo MALT (Figueiredo, Marques, Costa Rdos, da Silva, & Alcantara-Neves, 2014).

El reconocimiento de *H. pylori* por el hospedero, se lleva a cabo por medio de receptores tipo Toll (TLR's, por sus siglas en inglés) que se expresan en células del sistema inmune innato, como son: las células presentadoras de antígeno y monocitos, entre otras; las cuales son capaces de secretar citocinas proinflamatorias y quimiocinas aumentando el grado de inflamación en la mucosa gástrica.

La respuesta del hospedero también es estimulada por el contacto de *H. pylori* con células del epitelio gástrico, las cuales son afectadas por los diversos factores de virulencia de la bacteria, que pueden causar muerte celular o disrupción de las uniones estrechas, generando con esto, la producción de citocinas y proinflamatorias y quimiocinas como: IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-8 y MCP-1, las cuales van a iniciar la respuesta inmune (Alzahrani et al., 2014).

Las células dendríticas que han estado en contacto con antígenos de *H. pylori* secretan citocinas como IL-12 e IL-23 las cuales tienen la capacidad de inducir la polarización de la respuesta de un linfocito CD4⁺ cooperador a un fenotipo Th1 o Th17. Sin embargo, algunos antígenos de *H. pylori* se ha demostrado que pueden inhibir la secreción de IL-12 e inducir un fenotipo tolerogénico en células dendríticas *in vitro*, lo cual puede favorecer la inducción de células Treg durante la infección con *H. pylori*. Por lo tanto, el equilibrio en la polarización de las células Th1, Th17 y Treg en mucosa gástrica es capaz de promover cronicidad de la infección y este equilibrio está relacionado con el tipo de patología que se puede presentar en la infección con *H. pylori* (Raghavan & Quiding-Jarbrink, 2012).

Sin embargo, el tipo de respuesta inmune no es el único factor que puede afectar el resultado de la infección, se ha demostrado que algunos polimorfismos pueden intervenir en el desarrollo de distintas enfermedades gástricas, por ejemplo, algunos polimorfismos en el gen *IL-1 β* y del receptor *IL-1RN* promueven el aumento en la secreción de IL-1 β y de la inflamación de la mucosa, además de aumentar el riesgo de presentar atrofia gástrica, metaplasia intestinal y adenocarcinoma gástrico. Existen diversos genes que presentan polimorfismos que están asociados a un mayor riesgo de presentar diversas patologías, como lo son el gen *TNF α* que está relacionado con un mayor riesgo de cáncer gástrico y el *IL-10* que está implicado en un mayor grado de colonización de la mucosa gástrica (Atherton, 2006).

Respuesta Inmune en modelo murino

En los modelos de infección murino se ha observado que la respuesta celular es una parte importante que va a determinar el grado de inflamación y la patología que se presenta, se ha observado que dependiendo del tipo de respuesta y las citocinas que predominan varia el efecto inflamatorio y el grado de colonización de la mucosa gástrica, por ejemplo, una respuesta de tipo Th1 que está caracterizada por la secreción de IFN γ , IL-2, entre otras citocinas proinflamatorias, favorece un aumento en la gravedad de la gastritis acompañado de una baja densidad bacteriana, mientras que las respuestas de tipo Th2 y Treg presentan un grado de gastritis menor acompañado de una alta densidad bacteriana (Robinson, Argent, & Atherton, 2007).

JUSTIFICACIÓN

- ❖ Debido a las diversas patologías asociadas a la infección por *H. pylori* y lo complicado que resulta el estudio de estas, es necesario establecer un modelo murino de infección, con el cual se puedan realizar estudios más detallados de las enfermedades causadas por ésta bacteria, además es importante conocer la correlación que existe entre el tipo de respuesta inmune que desencadena una cepa de *H. pylori*, aislada de un paciente con gastritis crónica y el tipo de lesión histopatológica que se presenta.

HIPÓTESIS

Ho. La infección con la cepa de *H. pylori* aislada de un paciente con gastritis crónica, inducirá en el modelo murino de infección una respuesta de tipo Th1, entonces, se observará en mucosa gástrica un infiltrado de células mononucleares y el subsecuente desarrollo de gastritis.

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar si existe una correlación entre el tipo de respuesta inmune que se produce tras la infección de la cepa de *H. pylori* y el tipo de lesión que se produce utilizando un modelo murino de infección.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar el perfil de citocinas y el tipo de células presentes en la mucosa gástrica tras la infección con *H. pylori* en el modelo de infección murino por citometría de flujo.
- ❖ Determinar la presencia de *H. pylori* en mucosa gástrica por inmunohistoquímica y la identificación de DNA bacteriano.
- ❖ Determinar el daño histológico en la mucosa gástrica a través de la clasificación Sídney.

METODOLOGÍA

Cultivo de *H. pylori*

La cepa Hp7C, aislada de un paciente con gastritis crónica y almacenada a -70°C, fue cultivada en agar Casman suplementado con 10% de suero de caballo, se incubó en condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂) a 37°C, durante 2 días (Montecucco & Rappuoli, 2001).

Características de los ratones

Para la evaluación de la respuesta inmune se usaron 48 ratones BALB/c, libres de patógenos específicos (SPF, *Specific-pathogen-free*), machos de 6 a 8 semanas de edad (obtenidos de bioterio general de la FES Iztacala), distribuidos como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución de los grupos de ratón para los ensayos de infección con la cepa *H. pylori* 7C.

Grupo de Estudio	Tiempo (días)	No. de ratones problema	No. de ratones grupo control
1	14	8	4
2	30	8	4
3	180	8	4
4	270	8	4

Preparación de inóculo bacteriano para los ensayos de infección

A partir del cultivo de *H. pylori* en placas de agar Casman, se tomó con un asa microbiológica desechable una cantidad de biomasa y se realiza una suspensión bacteriana en 8 mL de caldo de cultivo BHI, ajustar el inóculo con el tubo 4 del nefelómetro de Mc Farland (1.2×10^9 UFC/mL), se tomó 1 mL de la suspensión para medir la absorbancia en el espectrofotómetro a una λ 600 nm (Biomate 5 UV-Visible, Thermo Electron Corporation), se ajustó el inóculo a una densidad óptica

(D.O.) de 0.7. Si la suspensión se encontraba por debajo del valor establecido se agregó un poco más de inóculo bacteriano y si estaba por arriba del parámetro se diluyó con caldo BHI, esto hasta ajustar aproximadamente a 0.7.

Determinación de la Viabilidad de *H. pylori* mediante la cuantificación de ATP

Previo a realizar la infección de los ratones, se realizó la determinación de la viabilidad del inóculo bacteriano, mediante el uso del kit ATP Kit SL (Bio Thema Luminescent Assays). La cuantificación del número de bacterias se realizó a partir de una curva patrón incluida en el kit (ver anexo I).

Determinación de viabilidad bacteriana por conteo de unidades formadoras de colonias (UFC's)

Para la determinación de UFC's, se tomó una alícuota de 1 mL de la suspensión bacteriana ajustada previamente, esta se colocó en un tubo con 9 ml de caldo BHI (dilución 1:10), de esta se realizaron otras 6 diluciones seriadas 1:10. De los tubos 6 y 7, se tomaron 100 µL de la dilución y se sembraron en placas de agar Casman suplementado con 10% de suero de caballo. Se incubaron en microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂) a 37°C, durante 96 horas. Posteriormente, se realizó el conteo de colonias y se realizó el cálculo de las UFC's, considerando el factor de dilución.

Inoculación de ratones con la cepa de *H. pylori*

De la suspensión bacteriana en caldo BHI de *H. pylori* que se ajustó anteriormente, se inoculan a los ratones por vía orogástrica con aproximadamente 0.2 mL de la suspensión, los ratones tuvieron un día de ayuno y la inoculación se repitió dos veces en un intervalo de tres días.

Sacrificio y extracción de estómago

Se preparó el material para la extracción del estómago, extracción de DNA, cultivo bacteriano y citometría de flujo. El sacrificio de los ratones se realizó con 200 mg/Kg de Pentobarbital Sódico por vía intraperitoneal (Kusters et al.), 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 esperó que el ratón ya no respirara, se ingresó a la cavidad abdominal, se realizó un corte en la zona del esfínter pilórico, se separó el páncreas y se cortó el ligamento bazo-esplénico para finalizar con el corte en la zona del esfínter esofágico y la extracción del estómago.

Procesamiento del estómago

Se colocó el estómago en un recipiente con solución salina fisiológica estéril (SSF) y se realizó un corte en la parte superior del estómago para eliminar la porción escamosa (fondo gástrico), se realizó un corte en la parte inferior del estómago para eliminar la parte del píloro y un fragmento del antro, una vez realizado esto, se realizó un corte a lo largo de la curvatura menor del estómago, para así tener completamente extendido el estómago (Rogers, 2012). Se dividió el estómago en dos partes iguales, haciendo un corte longitudinal por la curvatura mayor, se tomó una mitad y se dividió en dos partes iguales, una cuarta parte del estómago se asignó para la extracción de DNA, otra cuarta parte está destinada para el cultivo bacteriano y la otra mitad para los ensayos de inmunohistoquímica o bien para el procesamiento para citometría de flujo, según el caso.

Aislamiento de *H. pylori* a partir de tejido gástrico

Para el cultivo bacteriano, se tomaron 50 μ L de solución salina fisiológica (SSF) estéril y se colocaron en un homogeneizador de vidrio junto con un cuarto del estómago y se disgregó el tejido mecánicamente, posteriormente se adicionaron

450 µL de SSF estéril, se tomaron 50 µL del homogeneizado y se depositaron en una placa de medio agar Casman suplementada con antibióticos (anfotericina B, 2 mg; trimetoprim, 5 mg; vancomicina, 10 mg para un litro de medio), posteriormente el inóculo se extiende circularmente en el medio. Colocaron las placas a 37°C en condiciones microaerofilia durante 9 días. La identificación se realizó mediante tinción de Gram modificada, determinación de catalasa, oxidasa, e identificación por PCR punto final del gen *16S RNAr* (Parsonnet et al., 1999).

Extracción de DNA bacteriano

De la cuarta parte del estómago destinada a la extracción de DNA, esta se homogenizó en 500 µL de SSF estéril, la extracción de DNA se realizó con el kit, QIAamp DNA mini kit (QUIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante. Al término de la extracción el DNA se conservaron a -20°C. La cuantificación de DNA se realizó mediante el equipo NanoDrop1000 (Thermo scientific), así como la determinación de la relación 260/280 y 230/260, las cuales fueron utilizadas para asegurar que la muestra no contenga proteínas o bien contaminación con ARN respectivamente.

Identificación de *H. pylori* mediante PCR semianidada del gen *16S RNAr*

Para la identificación de *H. pylori*, se utilizó un ensayo de PCR semianidada (Ho et al., 1991).

Tabla 3. Master mix utilizado para la primera amplificación del gen *16S RNAr*.

Reactivo	concentración	1 reacción/µL
H ₂ O		9.8
Buffer	10X	2.5
MgCl ₂	50 nM	1.0
Hp1	10 pmol	0.5
Hp3	10 pmol	0.5
dntp's	10 mM	0.5
Taq DNA Pol.	1 U/ µL	0.2

La mezcla anterior (15 μ L) se colocó en tubos eppendorf de 0.2 μ L con 10 μ L del DNA extraído anteriormente y se realizó la amplificación en el termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied BioSystem), utilizando las siguientes condiciones de amplificación: 95°C/5 min. para desnaturalizar por primera vez, 94°C/45 seg. para desnaturalizar, 60°C/45 seg. para alineamiento, 72°C/45 seg. para elongación y 72°C/7 min para disminuir la temperatura gradualmente y finalizar. Una vez terminada la reacción se tomaron 10 μ L del producto de PCR (pPCR) anterior y se colocan en un tubo eppendorf de 0.2 μ L con los siguientes reactivos.

Tabla 3. Master mix utilizado para la segunda amplificación del gen *16S RNAr*.

Reactivo	concentración	1 reacción/ μ L
H ₂ O		18.8
Buffer	10X	2.5
MgCl ₂	50 nM	1.0
Hp1	10 pmol	0.5
Hp2	10 pmol	0.5
dntp's	10 mM	0.5
Taq DNA Pol.	1 U/ μ L	0.2

Esta reacción de PCR se llevó a cabo en las mismas condiciones que la primera.

Electroforesis en gel de agarosa

Una vez obtenido el segundo producto de PCR (ppPCR) se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% (agarose MP, Roche Life Science) en TBE al 0.5X. Se colocó el marcador de peso molecular (100 pb) en el primer pozo seguido de las muestras y los controles positivo y negativo. Las condiciones de corrida fueron 100 V/cm de gel durante 90 min. El gel fue teñido con bromuro de etidio (BrEt 0.5 mg/ml) y visualizado en un transiluminador (High Performance UV Transilluminator, UVP).

Evaluación del perfil inmunológico por Citometría de flujo

A partir de la mitad de estómago, se colocaron dos trozos de organza en una caja petri estéril y en medio de estas el tejido gástrico, se agregaron 3 mL de medio RPMI adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB), con un émbolo de jeringa se disgregó suavemente el tejido hasta obtener una suspensión celular, se recolectó la suspensión en tubos eppendorf de 2 mL, se agregó 1 mL de medio RPMI para recuperar el mayor número de células posible, una vez efectuado esto, se realizaron dos lavados con medio RPMI, centrifugando a 1,600 rpm/5 min, se resuspendió el botón celular en 1 mL de medio RPMI, de esta suspensión celular se tomaron 90 μ L y se mezclaron con 10 μ L de azul de tripan para realizar el conteo y la viabilidad celular en la cámara de Neubauer, a partir del número de células viables obtenidas se realiza una suspensión celular ($\sim 10^5$ células viables) en 50 μ L de buffer de tinción (PBS 1X, FCS 1%, pH 7.4-7.6, filtrado), con la cantidad apropiada (0.5 μ L de cada uno) de Ab-fluorocromo (CD3⁺ y CD4⁺), y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se lavaron las células con 1 mL del buffer de tinción y centrifugo a 1,500 rpm, por 10 minutos y se continuo con el protocolo de tinción intracelular. Se resuspendio el botón celular en 1 mL de Fix/Perm (BD Biosciences), recién preparado. Se incubaron las muestras por 50 minutos protegidos de la luz, se agregaron 0.5 mL de Perm/Wash Buffer (BD Biosciences), directamente a las células fijadas y permeabilizadas. Se Resuspendieron suavemente hasta desagregar las células. Se centrifugaron las células a 1,500 rpm, a 4°C, por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante. En 50 μ L de Perm/Wash Buffer (BD Biosciences) agregar los anticuerpos para citocinas intracelulares (IFN e IL-6, IL-10 e IL-4, TGF- β e IL-17, TGF- β e IL-10). Se agitaron suavemente los tubos y se incubaron a temperatura ambiente por 50 minutos protegidos de la luz, las células se resuspendieron suavemente antes de lavar. Se lavaron las células con 0.5 mL de Perm/Wash y se centrifugaron las células a 1,500 rpm, durante 10 minutos. Se eliminó el Wash Buffer. Finalmente, se resuspendio el botón celular en 300 μ L de buffer de tinción. Se analizaron las células lo más pronto posible, o almacenaron a 4°C protegido de

la luz. Las muestras se corrieron en el citómetro de flujo Attune (Applied Biosystems) y los resultados de citometría fueron analizados con el programa Attune® Cytometric Software versión 1.2.5.

Procesamiento y evaluación de las biopsias gástricas de ratón para histopatología

El tejido gástrico fue colocado en una solución amortiguada con formol al 4%, posteriormente, se realizó una deshidratación del tejido mediante inmersiones en etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xilol, después de esto se colocó el tejido en un baño de parafina líquida por 5 min y se realizaron los bloques de cada tejido. Los cortes de tejido se realizaron de 3 micras con ayuda de un micrótomo (RM2125, Leica Biosystems). Los cortes realizados de cada una de las muestras de tejido fueron teñidos con Hematoxilina-eosina, para eso se desparafinaron las muestras colocándolas por 30 min a 45°C, una vez eliminando el exceso de parafina se rehidrató el tejido pasándolo por una serie de soluciones como xilol, xilol-etanol, etanol al 100%, 95%, 70% todas durante 1 min. y por último en agua, después de hidratar el tejido se colocó en hematoxilina durante 10 min., después de haber transcurrido este tiempo se realizan lavados con agua, alcohol ácido y agua (1 min. en cada solución), para eliminar el exceso de colorante, después se colocó en una solución de eosina durante 5 min., al terminar las laminillas se deshidrataron pasándolas por soluciones de alcohol 70, 95 y 100% por duplicado durante 1 min., finalmente las laminillas se colocaron en una solución de xilol durante 1 min. y se montaron con resina líquida (Merck). Las laminillas se escanearon en el equipo Aperio CS2 (Leica Biosystems), las imágenes fueron analizadas con el software Aperio ImageScope v12.3.0.5056 (Leica Biosystems).

Técnica de inmunohistoquímica

Para iniciar con la técnica, se desparafinó el tejido colocando las laminillas en una canastilla e incubándolas en un horno a 60°C, durante 30 min. Una vez concluido

el tiempo, el tejido se rehidrató, colocándolo en los siguientes baños, xilol, xilol, etanol-xilol, estos durante 8 min., después, se colocaron en soluciones etanol de concentraciones descendentes, 100%, 100%, 90%, 70% y agua destilada, cada uno durante 5 min. Una vez rehidratado el tejido, se realizó la recuperación antigénica, colocando las laminillas en un vaso coplin con una solución de citrato de sodio (0.01M, pH 6) a 90°C, durante 30 min., una vez concluido el tiempo, las laminillas se lavan 3 veces con PBS 1x durante 5 min., ya que existe una peroxidasa endógena en los tejidos que interfiere con la técnica, esta es eliminada colocando las muestras en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 min., una vez concluido, se lavaron con agua destilada y después con PBS 1X, cada uno de los lavados durante 5 min. Se montaron las laminillas en el sistema coverplate y se agregaron 100 µL del anticuerpo primario a una concentración 1:100 (Polyclonal rabbit Anti-*Helicobacter pylori*, Dako), se incubó a temperatura ambiente durante 45 min., una vez concluido el tiempo de incubación se lavaron las laminillas con PBS 1X, durante 5 min y se agregó 100 µL del sistema de detección por polímeros Match 2 (Goat anti-mouse-HRP secondary Antibody, BioCare Medical), y se incubó durante 45 min. a temperatura ambiente, una vez concluido el tiempo, se lavaron las laminillas con PBS 1X durante 5 min, para revelar las muestras se preparó 1 mL de cromógeno, tomando 50 µL de cromógeno DAB (immunodetector DAB Chromogen, Leica Biosystems) y 950 µL de buffer (immunodetector DAB Buffer, Leica Biosystems), y se agregaron aproximadamente 50 µL o lo necesario para cubrir por completo el tejido, la reacción se monitoreo al microscopio y se paró 5 min. después de agregar el cromógeno, las laminillas se lavaron con agua corriente y se contratiñeron colocándolas durante 5 segundos en hematoxilina, se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de colorante, finalmente se deshidrataron los tejidos para poder montar las laminillas, esto se realizó sumergiendo las lamillas en agua destilada etanol al 70%, 90%, 100%, 100%, etanol-xilol, xilol y xilol cada una durante 5 min, para montar las laminillas se colocó una gota de resina y un cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente.

Tinción de Warthin Starry

Los cortes de tejido se realizaron de 3 micras con ayuda de un micrótomo (RM2125, Leica Biosystems). Los cortes realizados de cada una de las muestras de tejido fueron utilizados para la tinción de Warthin Starry, para eso se desparafinaron las muestras colocándolas por 30 min a 45°C, una vez eliminado el exceso de parafina se rehidrató el tejido pasándolo por una serie de soluciones como xilol, xilol-etanol, etanol al 100%, 95%, 70% todas durante 1 min. y por último en agua, una vez hidratado el tejido se colocó en una solución de nitrato de plata al 1%, a 43°C por 30 min, minutos antes de concluir el tiempo de incubación se prepara la solución reveladora (6 mL de nitrato de plata 2%, 15 mL de solución de gelatina al 5% y 8 mL de hidroquinona 0.15%), se colocaron las laminillas en la solución reveladora hasta obtenerse la coloración café tabaco, una vez obtenida esta coloración, se lavaron inmediatamente con agua a 56°C y después con agua destilada a temperatura ambiente, una vez lavada se deshidrata pasándolas por soluciones de alcohol al 70, 95, 100%, xilol-etanol y xilol todas durante 1 min. y se montaron con resina líquida (Merck).

RESULTADOS

El proyecto constaba inicialmente de cuatro grupos de estudio con tiempos de infección de 15 días (Grupo 1), 30 días (Grupo 2), 180 días (Grupo 3) y 270 días (Grupo 4), cada grupo fue constituido con 8 ratones problema y 4 ratones control, sin embargo, con el paso del tiempo se produjeron decesos en los sujetos de estudio debido a canibalismo entre los ratones, en la tabla 4, se muestra el número de ratones por grupo y los ensayos que se le realizaron.

Tabla 4. Distribución de los grupos al final del estudio.

Grupo de Estudio	Tiempo (días)	No. de ratones problema	No. de ratones grupo control
1	14	8	4
2	30	8	3
3	180	7	4
4	270	7	3

Cultivo Bacteriano

El cultivo bacteriano se realizó con las biopsias tomadas de cada uno de los sujetos de estudio, el cual se realizó en medio Casman con antibióticos como se describe en la metodología, de estos cultivos no se lograron aislar colonias de *H. pylori* debido al crecimiento de bacterias propias de la mucosa gástrica de los animales.

Amplificación del gen 16S RNAr de *H. pylori*

La amplificación del gen 16S RNAr realizada por PCR punto final dio como resultado un producto de 109 pb, como se muestra en la figura 9, los resultados de la amplificación de cada uno de los grupos se representan en la tabla 5. En la cual se describe el número de muestras de ratones control e infectados, cuántos de

estos son positivos en cada grupo y de porcentaje de infección. Como se puede observar los porcentajes de infección obtenidos se encuentran entre 40-60%, lo cual es un resultado favorable ya que la cepa con la que se trabajó (7C) es una cepa clínica que no tiene ningún tipo de adaptación en modelos murinos, además se observa que no existe amplificación del 16S RNAr en los grupos control,



indicando que las precauciones tomadas para evitar la infección de estos grupos funcionaron.

Figura 9. Detección de *H. pylori* en los tejidos gástricos de los ratones. En los primeros carriles se observan el marcador de peso molecular (MPM) y los controles, positivo (C+) y negativo (C-) de la reacción, mientras que en los carriles 1-4 se encuentran las muestras de animales no infectados, en los carriles 5-12 se observan las muestras de los animales infectados con *H. pylori*, correspondientes al grupo 1 con 14 días de infección. Gel de agarosa al 2%, teñido con BrEt.

Porcentaje de identificación de *H. pylori* en mucosa gástrica por amplificación del gen 16S RNAr.

Tiempo de infección	14 días (Gpo 1)	30 días (Gpo 2)	6 meses (Gpo 3)	9 meses (Gpo 4)
Controles	0-4	0-3	0-4	0-3
Problemas	5-8	4-8	4-7	3-7
Porcentaje de	62%	50%	57%	42%

Citometría de Flujo

Con respecto a la evaluación de la respuesta inmunológica por medio de citometría de flujo se tomaron 4 ratones problema y 2 controles de cada uno de los grupos, y se procesaron las muestras de acuerdo a lo ya descrito en metodología, los resultados de citometría fueron analizados con el programa Attune® Cytometric Software versión 1.2.5 (ver Anexo II), y las gráficas se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism, Versión 5.0, el cual arrojó las gráficas presentadas a continuación.

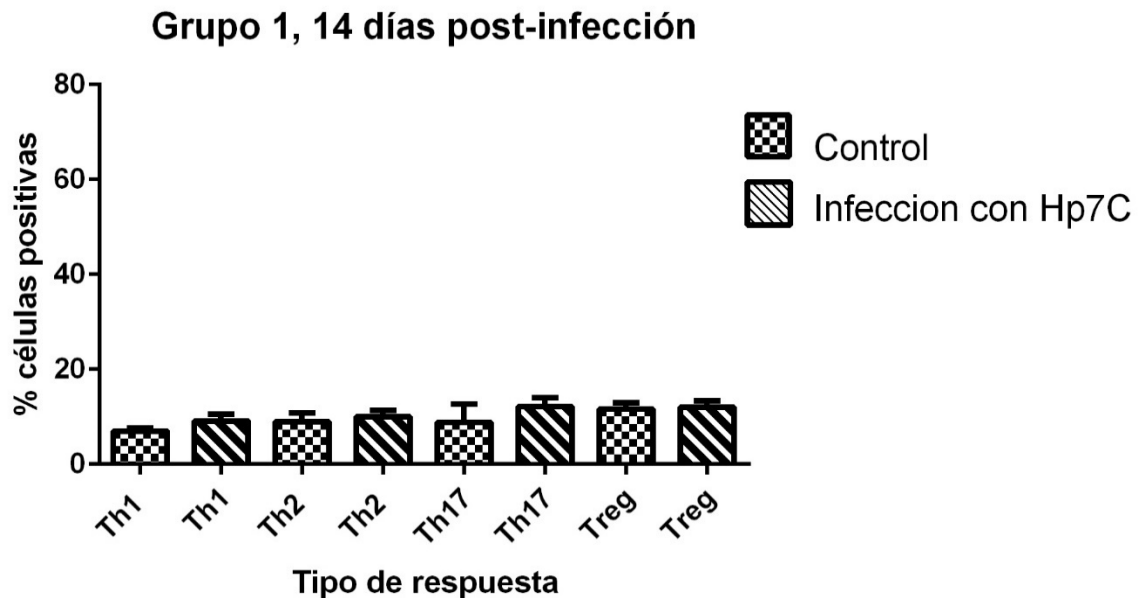


Figura 5. Evaluación de la respuesta inmune 14 días post-infección, comparando el grupo control sin infección (cuadrícula n=2) contra el grupo infectado (rayas, n=4), el porcentaje de células positivas está determinado a partir de la tinción intracelular de citocinas.

En el grupo 1 con 14 días post infección se puede observar que ninguna de las respuestas se encuentra aumentada, y que los resultados son similares entre los grupos control y los infectados con *H. pylori*, esto nos indicaría que en los primeros días la inmunidad adaptativa aun no comienza.

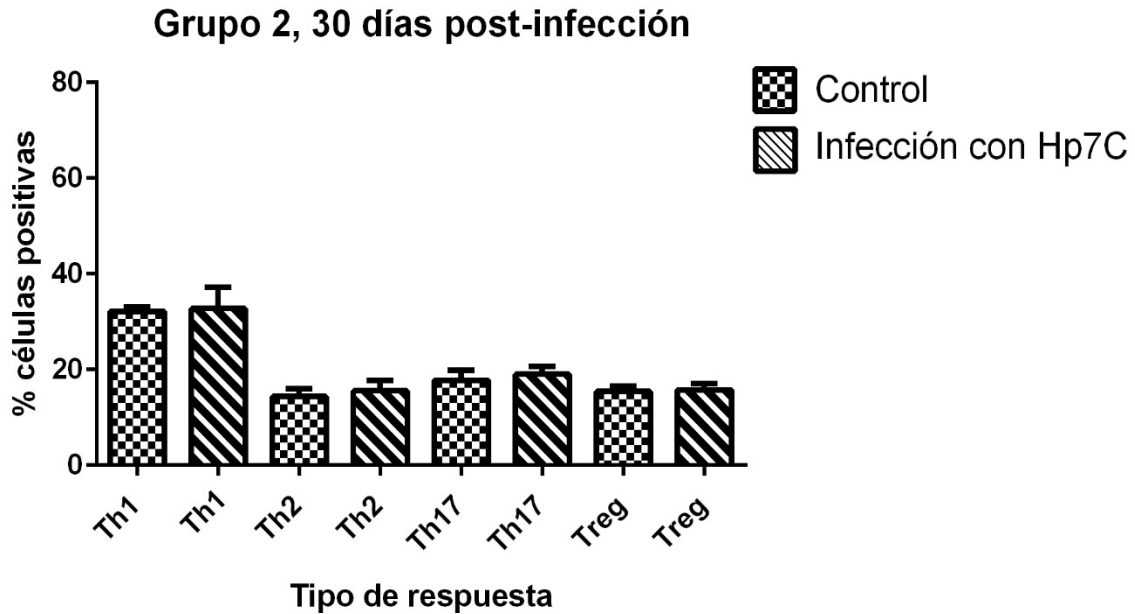


Figura 6. Evaluación de la respuesta inmune 30 días post-infección, comparando el grupo control sin infección (cuadricula, n=2) contra el grupo infectado (rayas, n=4), el porcentaje de células positivas está determinado a partir de la tinción intracelular de citocinas.

En el grupo 2, con 30 días post infección se puede observar como las respuestas tienden a aumentar, en este caso la respuesta Th1 se encuentra en mayor proporción con respecto a las otras respuestas, sin embargo, también se observa una tendencia al aumento en esta respuesta en los animales del grupo control, de igual manera las otras respuestas se encuentran en las mismas proporciones comparadas con su grupo control.

Con respecto a los resultados obtenidos en el grupo 3 con 180 días post infección (figura 7) se puede observar una disminución en la tendencia de la respuesta Th1 con respecto al grupo 2, sin embargo, los resultados del grupo con infección son muy dispersos en esta respuesta (Th1) teniendo valores similares a los obtenidos en el grupo control, por otra parte, se puede observar un aumento en la tendencia

de la respuesta Th17 en comparación con su grupo control, lo que nos podría indicar que esta respuesta está involucrada en infecciones crónicas con *H. pylori*.

Grupo 3, 180 días post-infección

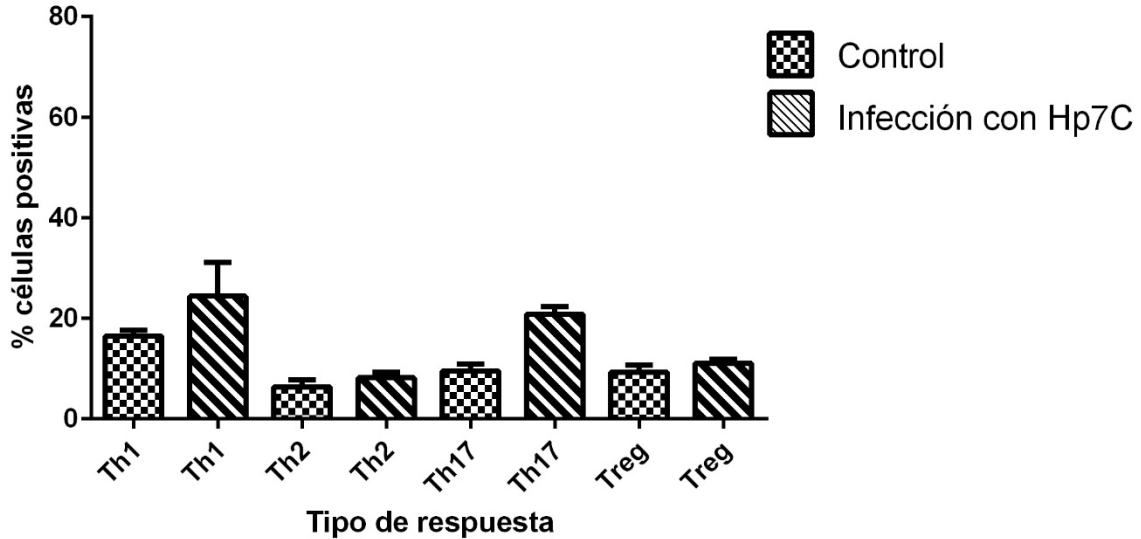


Figura 7. Evaluación de la respuesta inmune, comparando el grupo control sin infección (cuadrícula, n=2) contra el grupo infectado (rayas, n=4), el porcentaje de células positivas está determinado a partir de la tinción intracelular de citocinas.

Grupo 4, 270 días post-infección

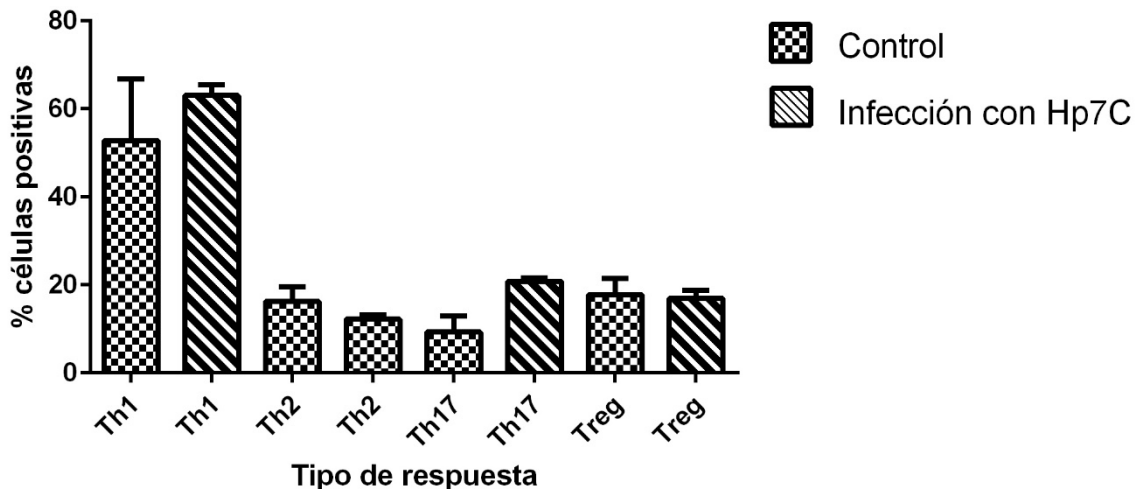


Figura 8. Evaluación de la respuesta inmune 270 días post-infección, comparando el grupo control sin infección (cuadrícula, n=2) contra el grupo infectado (rayas, n=4), el porcentaje de células positivas está determinado a partir de la tinción intracelular de citocinas.

En el grupo 4 con 270 días post infección se puede observar aumento en la tendencia de la respuesta Th1, pero de igual manera se observan resultados del grupo control muy dispersos que son similares a algunos obtenidos en el grupo con infección, mientras que en la respuesta de tipo Th17 se observa un comportamiento similar al grupo 3, en el cual los datos de los controles e infectados se encuentran más homogéneos dando resultados más confiables, en estos ensayos de citometría de flujo no se realizó análisis estadístico debido a que el número de eventos obtenidos no alcanza los diez mil, siendo este número el mínimo de eventos requerido para considerar estadísticamente significativo el resultado obtenido, si bien en los grupos 3 y 4 es donde se obtienen eventos superiores a los diez mil los datos no serían comparables con los grupos 1 y 2.

Evaluación de daño histológico

Con respecto a la evaluación del daño en la mucosa gástrica realizado con la técnica de H&E, se encontró un infiltrado inflamatorio moderado en los animales infectados con respecto a los controles, en la figura 10, se muestran las imágenes representativas de muestras de grupos control e infectados; de lado izquierdo se muestran los controles de los diferentes grupos (A:Gpo1, C:Gpo2, E:Gpo3, G Gpo4) y en la derecha se muestran los grupos con infección (B:Gpo1, D:Gpo2, F:Gpo3, H:Gpo4), en los cuales se observa un infiltrado inflamatorio leve y en algunos casos este va acompañado de erosión de la mucosa gástrica. Con flechas verdes se señalan los focos de infiltrado inflamatorio en la lámina propia de la mucosa gástrica (Fig. 10, B, F, H) y una zona de erosión de la mucosa gástrica (fig. 10 D).

En la mucosa gástrica se puede observar un aumento en el infiltrado inflamatorio en los ratones infectados con respecto al grupo control, sin embargo, este infiltrado va de leve a moderado, lo cual podría correlacionar con los resultados obtenidos en citometría de flujo ya que una respuesta de tipo Th17, si bien es

proinflamatoria, esta no genera el mismo grado de inflamación que una respuesta Th1.

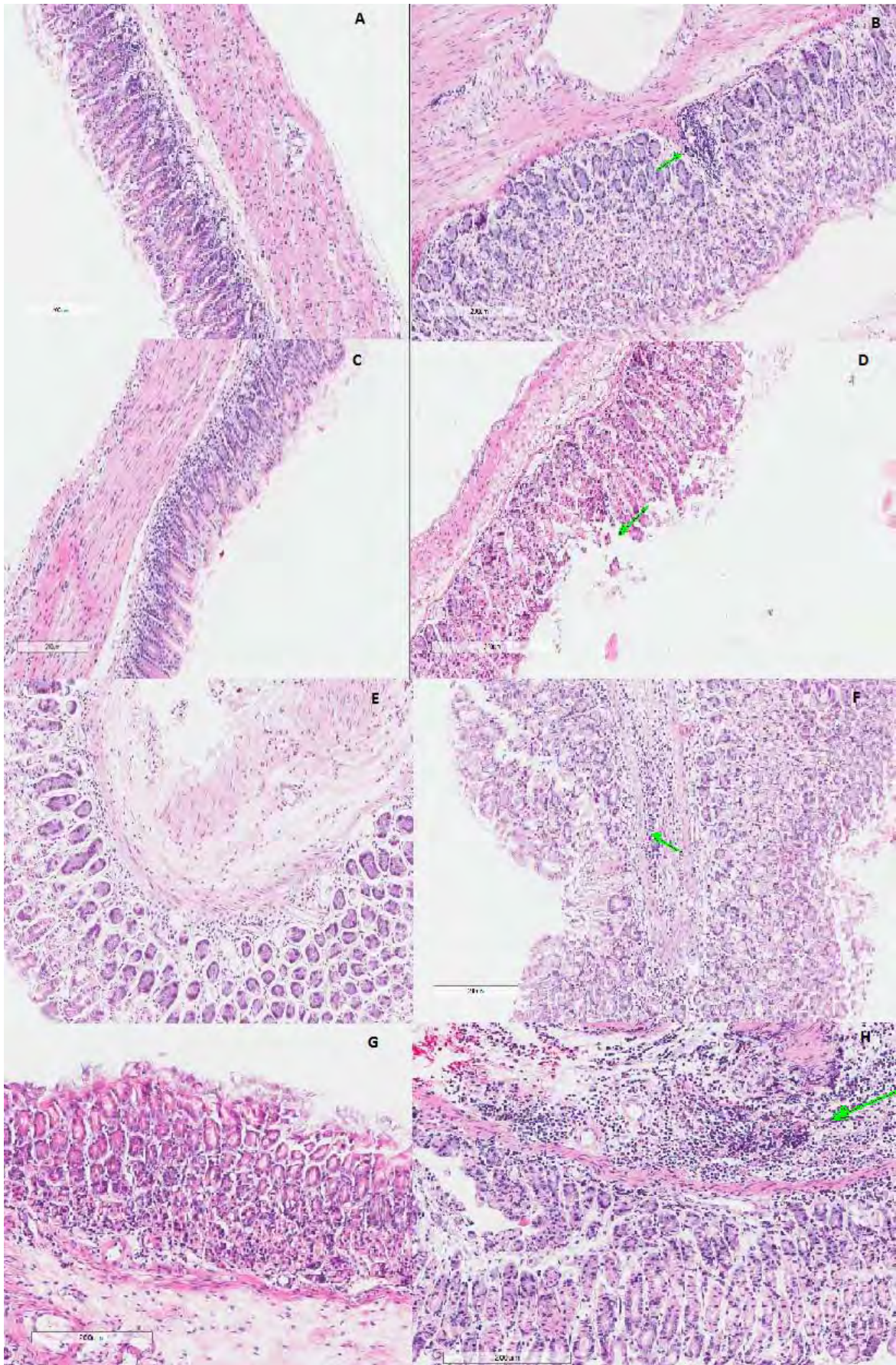


Figura 10. Técnica de H&E de tejido gástrico de ratón sano (izquierda) e infectados (derecha). A. control. B, F y H se muestran zonas de infiltrado inflamatorio, mientras que en la región señalada de la figura D, se muestra una zona de erosión de la mucosa gástrica.

Tinción de Warthin Starry

La tinción de wartin starry o tinción de plata se usa como apoyo en el diagnóstico e identificación presuntiva de *H. pylori* en humanos, sin embargo, esta tinción no es específica ya que puede reconocer otras morfologías bacterianas similares, en los cortes obtenidos de los animales de experimentación se puede observar una gran cantidad de bacterias con formas bacilares y con características morfológicas similares al de *H. pylori*, en la figura 11, podemos observar el control positivo que corresponde a una biopsia gástrica de humano (figura 11A), así como, el control negativo (figura 11B), y en las imágenes restantes se tiene una imagen representativa de cada uno de los grupos tratados.

Identificación de *H. pylori* mediante inmunohistoquímica

Mediante la técnica de inmunohistoquímica no se observó la presencia de la bacteria en el tejido gástrico de los ratones infectados, aun así, no es un resultado definitivo, ya que la identificación por PCR punto final si fue positiva en un 50% de los animales, esto puede deberse a la baja densidad bacteriana colonizante y al hecho de que *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica en parches irregulares, además no se realizaron cortes sucesivos de todo el estómago, debido al tamaño del mismo, ya que esto implicaría un gran número de muestras por tejido, en la figura 12 se muestra un control positivo para *H. pylori*, lo cual nos indica que el procedimiento se realizó de manera correcta y que no se trata de falsos negativos.

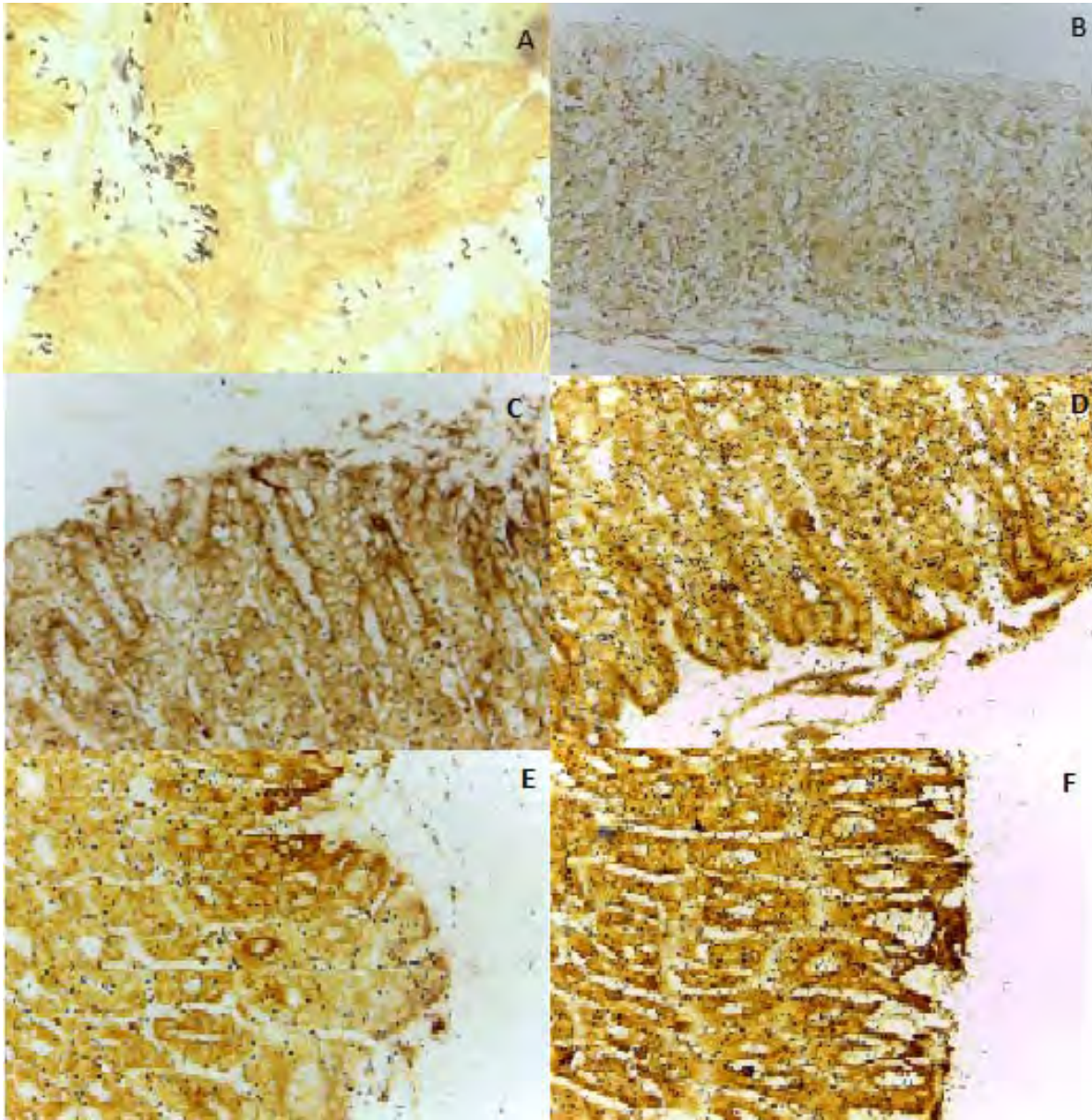


Figura 11. Tinción de Warthin Starry de tejido gástrico de ratón. **A.** se muestra el control positivo que corresponde a una biopsia de tejido gástrico humano en la cual se pueden observar teñidas de color negro las bacterias en forma de bacilo que corresponden a *H. pylori*. **B.** se muestra el control negativo de un tejido de ratón sin infección con *H. pylori*, en el cual se observan bacilos con las mismas características de *H. pylori*. **C y D.** se muestran una imagen representativa del grupo 1 y 2, respectivamente, en las cuales se logran observar bacterias que tienen características similares a *H. pylori*. **E y F,** de igual manera se muestran imágenes de los grupos 3 y 4, respectivamente, en las cuales se observan bacterias con características morfológicas similares a *H. pylori*.

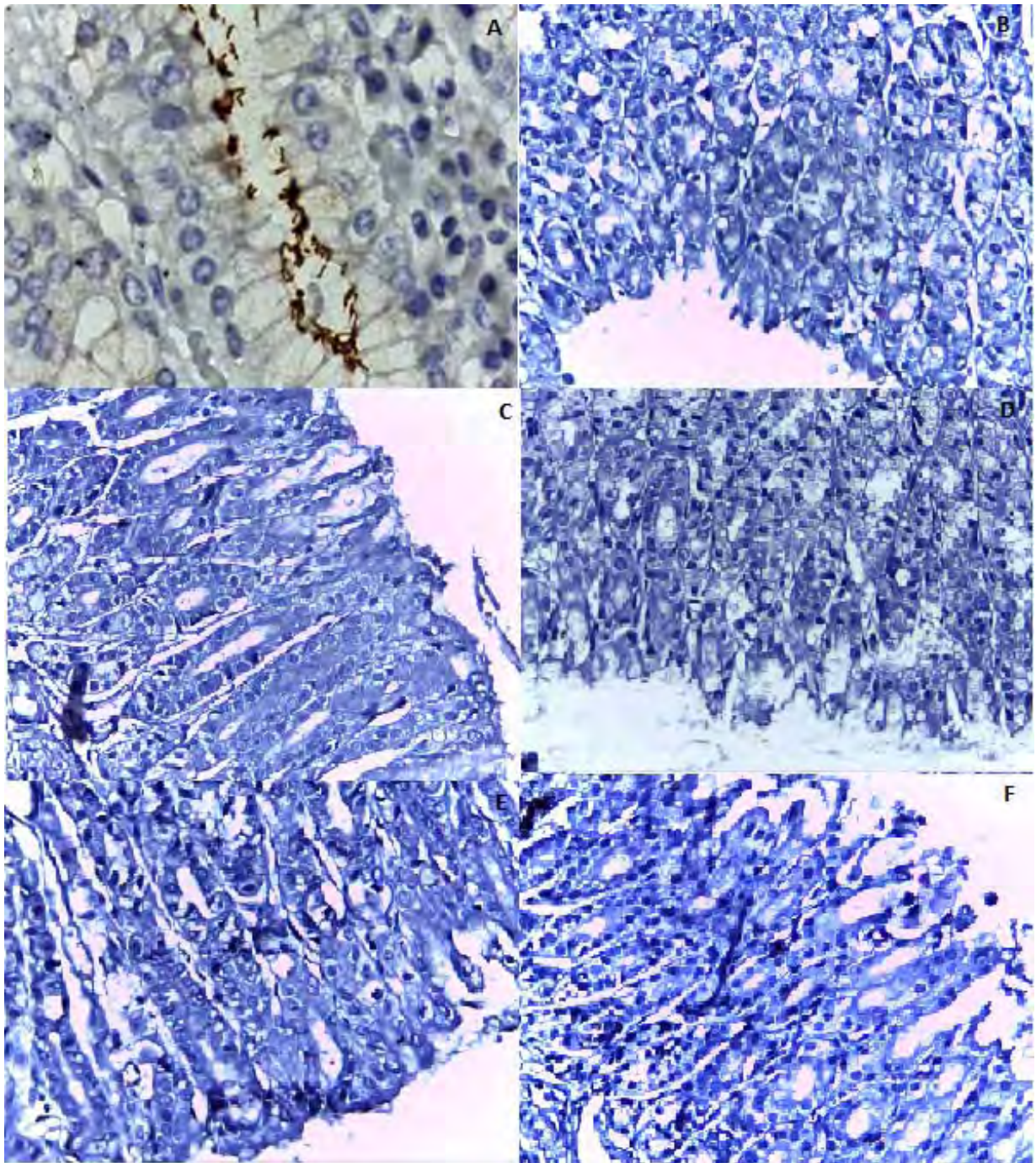


Figura 12. Técnica de IHQ de tejido gástrico de ratón. **A.** se muestra el control positivo que corresponde a una biopsia de tejido gástrico humano en la cual se pueden observar teñidas de color café las bacterias en forma de bacilo que corresponden a *H. pylori*. **B.** se muestra el control negativo de un tejido de ratón sin infección con *H. pylori*. **C y D.** se muestran una imagen representativa del grupo 1 y 2, respectivamente, en las cuales no se logran observar bacterias que correspondan a *H. pylori*. **E y F,** de igual manera se muestran imágenes de los grupos 3 y 4, respectivamente, en las cuales no se logra observar una reacción positiva para *H. pylori*.

DISCUSIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria capaz de colonizar la mucosa gástrica y cuyo único reservorio conocido hasta el momento es el ser humano (Amieva & El-Omar, 2008), a pesar de esto se han obtenido cepas de *H. pylori* las cuales se han adaptado al modelo murino, las cuales tienen un porcentaje de recuperación cercano al 100% (Thompson et al., 2004), en nuestro caso se trata de una cepa clínica que fue aislada de una biopsia gástrica de un paciente con gastritis crónica (Gonzalo et al., 2009), la cual no se ha sometido a ningún pase en ratones para ser adaptada.

En el modelo murino de infección que se utilizó, la cepa empleada no se ha logrado aislar a partir de las biopsias gástricas de ratón, esto en parte, a la contaminación bacteriana de las muestras que es bastante considerable, a pesar de utilizar medios suplementados con antibióticos y de eliminar la parte no glandular del estómago de los animales. Se ha reportado que el crecimiento de otras poblaciones bacterianas que se encuentran en el estómago pueden inhibir el crecimiento *in vitro* de *H. pylori* (Lopez-Brea, Alarcon, Domingo, & Diaz-Reganon, 2008). Una de las alternativas para evitar la contaminación acompañante es el uso de medios de cultivo selectivos para el crecimiento de *H. pylori*, estos medios pueden estar suplementados con una variedad de antimicrobianos como vancomicina, anfotericina B, polimixina B, trimetoprim-sulfametoxazol y cefsulodina, además de estar suplementado con urea, los cuales han demostrado ser altamente selectivo para el crecimiento de *H. pylori* (Stevenson, Lucia, & Acuff, 2000).

Además del cultivo microbiológico de las muestras gástricas para el aislamiento de *H. pylori*, también se realizó la búsqueda del microorganismo por métodos moleculares, mediante la amplificación del gen *16S RNAr* por PCR, con lo cual se logró evidenciar la presencia de la bacteria entre el 40 y el 60% de los animales de experimentación, lo cual apoya la teoría de que el crecimiento de *H. pylori* se ve

inhibido por otras poblaciones bacterianas, ya que al realizar la identificación por métodos moleculares que son más sensibles y específicos que el cultivo bacteriano, se puede observar que el porcentaje de infección disminuye a medida que pasa el tiempo, lo cual indicaría que los animales son capaces de eliminar la infección por sí mismos, lo cual es algo comprensible ya que *H. pylori* es una especie que infecta únicamente a humanos y que esta cepa clínica no ha sido adaptada al ratón. Con respecto, al grupo control no se encontró ninguna muestra positiva a la amplificación por PCR.

Con respecto a la determinación de la respuesta inmune mediante la citometría de flujo, se puede observar como en el tiempo 1, las 4 respuestas evaluadas se encuentran en las mismas proporciones y a medida que transcurre el tiempo se nota un ligero aumento de la respuesta Th1 y Th17, en el tiempo 2 se puede observar un aumento en la respuesta Th1 lo cual indica el inicio de la inmunidad adaptativa, lo cual también se observa en experimentos realizados por Holly M. Scott en 2008, en los cuales se observa el aumento de los linfocitos T CD4⁺ alrededor del día 20 pos infección (Algood, Gallo-Romero, Wilson, Peek, & Cover, 2007), en nuestros resultados se observa el aumento de esta misma respuesta en los animales sin infección, lo cual puede deberse a la manipulación continua de los animales y el estrés que este les genera en el grupo 3 con 180 días de infección se logra apreciar una tendencia que aumenta en las respuestas Th1 y Th17 en la cual la respuesta de tipo Th17 es más representativa, que la dispersión de los datos es menor a los de la respuesta Th1 en la cual algunos valores de los controles son similares a los obtenidos en el grupo de infectados, de igual manera en el grupo 4 con 270 días de infección se observa una tendencia similar con un aumento en la respuesta Th17.

De acuerdo con datos obtenidos en el trabajo realizado por Matsushima y cols., en 1999, el aumento en la inflamación del tejido gástrico se puede deber al estrés generado por la manipulación de los animales, en este trabajo se compara el grado de infiltrado inflamatorio generado por estrés en los animales y el grado

generado por la infección de *H. felis*, el cual es un patógeno de ratones que causa la misma enfermedad que *H. pylori* en humanos, en los resultados se observa que el aumento en la expresión del gen de *IL1 β* es semejante en ambos grupos de estudio (Matsushima et al., 1999), como ya se sabe esta interleucina está implicada en la generación de inflamación ya que es un factor quimiotáctico para células mononucleares y en la respuesta de tipo Th1.

Por otra parte, en el trabajo realizado por Cheng y cols., se observó un aumento en citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, TNF α , IL-12 entre otras en sangre de ratones sometidos a estrés las cuales pueden polarizar hacia una respuesta de tipo Th1 (Cheng, Jope, & Beurel, 2015). La inflamación de la mucosa gástrica de los animales utilizados como control en nuestro trabajo, puede deberse al estrés generado por la manipulación además del estrés que se genera por la interacción entre los mismos animales, ya que al trabajar con ratones machos se pueden generar peleas entre ellos las cuales pueden llegar a ocasionar lesiones de gravedad, aumentando el estrés en los animales, siendo los animales del grupo 3 y 4 los más afectados ya que permanecieron juntos por 6 y 9 meses.

Las diferencias en la respuesta de tipo Th17 entre controles e infectados se puede atribuir a la infección con *H. pylori* ya que algunos autores proponen que las infecciones crónicas causadas por este microorganismo pueden generar este tipo de respuesta, en la cual no se genera un gran daño en la mucosa gástrica y la densidad bacteriana es moderada. En un trabajo realizado por Shiomi y cols., en 2008, se demuestra como el incremento de la IL-17 juega un papel importante en la infección de ratones con *H. pylori*, los cuales a partir de los primeros dos meses de infección presentan un incremento significativo de esta citocina la cual se mantiene hasta los 12 meses pos infección (Shiomi et al., 2008).

Estudios recientes han demostrado que la IL-17 además de participar en inflamación crónica moderada, puede contribuir en la eliminación de *H. pylori* ya que se ha observado un sinergismo entre esta citocina y la IL-22, la cual, estimula

a células epiteliales gástricas para producir péptidos antimicrobianos, esto se observó al cocultivar una línea celular de células epiteliales gástricas (AGS) con *H. pylori* y estimularlas con IL-17 e IL-22, lo cual resultó en una disminución de la carga bacteriana y la producción de péptidos antimicrobianos como lipocalina, defensinas β 1, β 3 y β 4, además una alta producción de IL-8, también se observó en un modelo de ratón deficiente en el gen de IL-22 $-/-$, que en estos ratones la densidad bacteriana es mayor que en los ratones silvestres (Dixon, Radin, Piazuolo, Contreras, & Algood, 2016), con estos resultados se podría explicar la baja carga bacteriana detectada por PCR en punto final en nuestro trabajo.

En los últimos años se ha propuesto un sinergismo entre la respuesta Th1 y Th17 en infecciones crónicas con *H. pylori*, en un trabajo realizado por Quan-Ming zod, se observó que con el incremento de células Th17 se observa una mayor producción de IL-6, TGF β , IL-23 e IL-12 por macrófagos derivados de bazo de ratones infectados, siendo estas dos últimas citocinas parte importante en la polarización de las respuestas Th17 y Th1, respectivamente (Shi et al., 2010), además en otros trabajos se ha observado como otra citocina producida por células Th17 que es la IL-21 juega un papel importante en infecciones crónicas, ya que esta citocina regula de manera positiva la fosforilación de STAT1 y la expresión del gen de T-bet, y de igual manera la fosforilación de STAT3 y la expresión del gen de ROR γ t, factores importantes en la polarización de las respuestas Th1 y Th17, respectivamente (Carbo et al., 2014), si bien en nuestros resultados no se tiene la certeza de que el aumento de la respuesta Th1 sea causa de la infección por *H. pylori*, la detección de células productoras de IL-17 puede indicar que también se está secretando IL-21 y por consiguiente que el aumento de la respuesta Th1 no solo sea por el estrés por el que pasaron los animales, ya que no todos los animales presentaban estos comportamientos agresivos, siendo los controles del grupo 4, los que peleaban de manera continua.

Con respecto a los resultados obtenidos en histología se puede observar con las tinciones de H&E un infiltrado inflamatorio que va de leve a moderado en los

ratones infectados que corresponden a los grupos con mayor tiempo de infección (grupo 3 y 4), lo cual podría correlacionar con la presencia de una respuesta de tipo Th17 la cual da como resultado un proceso inflamatorio moderado en comparación con una respuesta Th1.

Por otra parte, las tinciones de Warthin Starry revelaron la presencia de bacilos con características morfológicas similares a *H. pylori*, sin embargo, estos bacilos se observan en todos los cortes histológicos, incluyendo los controles sin infección. Estudios realizados en animales de laboratorio revelaron que existen otras especies de *Helicobacter* que pueden colonizar la mucosa gástrica del ratón, estas especies de *Helicobacter* pueden ser *H. rappini*, *H. rodentium* y *H. muridarum*, las cuales se encuentran en el estómago y en el intestino de murinos, además existen otros géneros bacterianos que están estrechamente relacionados con el género *Helicobacter*, tal es el caso de *Arcobacter* y *Campylobacter*, adicionalmente, existe una especie bacteriana que está muy emparentada con *H. pylori* y que es *Wolinella succinogenes*, la cual se encuentra colonizando la mucosa gástrica de los roedores (Mahler et al., 1998; Zenner, 1999), debido a estas similitudes morfológicas entre estos géneros y especies, es conocido que la tinción de Warthin Starry no es específica para la identificación de *H. pylori*, por lo que, es probable que lo que se observa en los cortes de tejido, sean especies de *Helicobacter* o cercanamente relacionadas a este género, sin descartar la presencia de *H. pylori*, que pudiera encontrarse en una densidad bacteriana baja, además de la presencia de microbiota presente en la mucosa gástrica de los animales, como se observó en los cultivos microbiológico de estas muestras, lo que explica el alto grado de contaminación que se obtiene al tratar de aislar a *H. pylori in vitro*. Resultados similares han sido observados por Suresh en el 2000 (Suresh, Fanta, Kriangkum, Jiang, & Taylor, 2000).

Adicionalmente, se realizaron tinciones de inmunohistoquímica para tratar de evidenciar la presencia de *H. pylori* en el tejido gástrico, sin embargo, no se observó la presencia del microorganismo en ninguno de los cortes realizados, lo

cual no quiere decir que no esté presente, ya que su presencia se demostró por métodos moleculares, el cual es un método más sensible, que la inmunohistoquímica, una de las posibles explicaciones es que debido al tamaño de la muestra de tejido y que solo se realizaron cortes por nivel y no cortes seriados se pudo haber tomado una zona en la cual no se encontraba colonizando *H. pylori*, además en algunas amplificaciones por PCR se observa una banda muy tenue lo cual nos podría indicar que la densidad bacterianas en las muestras es baja.

Por otra parte, se sabe que el grado de colonización de *H. pylori* puede variar dependiendo la cepa de la bacteria y la cepa de ratón utilizada. En un estudio realizado por Suresh et al., observaron diferentes porcentajes de colonización al variar la cepa de ratón y utilizando diferentes cepas clínicas y de referencia, en este mismo estudio se observaron los mismos hallazgos histológicos que nosotros encontramos, observándose microorganismos morfológicamente similares a *H. pylori* (Suresh et al., 2000).

CONCLUSIONES

El modelo murino de infección con la cepa de *H. pylori* aislada de un paciente con gastritis crónica mostró porcentaje de infección de entre 40 y 60% en los animales utilizados en el estudio.

Se observó una tendencia en el incremento de la respuesta Th17 en los grupos con mayor tiempo de infección, con respecto al grupo control.

El infiltrado inflamatorio en los animales infectados que va de un moderado a leve que podría correlacionar con un tipo de respuesta Th17 generado por la cepa de *H. pylori* empleada.

PERSPECTIVAS

Debido a la microbiota acompañante en las muestras de tejido gástrico de los ratones y que impidieron el poder aislar a *H. pylori* en los medios de cultivo utilizados, se propone el uso de medios de cultivos más selectivos para el crecimiento de este microorganismo, los cuales pueden estar suplementados con urea y una variedad de antibióticos que no afecten el crecimiento de *H. pylori*.

Con respecto a los resultados de la evaluación de la respuesta inmune, los datos obtenidos no son concluyentes, por lo que se propone realizar ensayos en donde se puedan medir factores de transcripción específicos de cada respuesta inmune por citometría de flujo, además de optimizar el tejido gástrico para obtener mayor número de eventos. Otra opción es la utilización de un panel completo de citocinas con la plataforma Luminex, para observar citocinas importantes en la polarización de las respuestas como son IL-12, IL-21, IL-23, etc. además de quimiocinas.

Anexo I

Determinación de la Viabilidad de *H. pylori* mediante la cuantificación de ATP

Las alícuotas de la solución amortiguadora TE se incubaron a 96-98°C por 10 min, de la suspensión de *H. pylori* realizada y ajustada a 0.7 de D.O. se toman 100 µL y se adicionan en las alícuotas de TE realizadas anteriormente, se incuban durante 6 min a 96-98°C, al mismo tiempo se realizó la curva patrón y controles positivo y negativo como se muestra en la tabla 6. Posteriormente, en una placa MaxiSorp de 96 pozos de fondo plano (Nunc, Denmark), se colocan 160 µL de los extractos obtenidos y de los controles positivos, negativos y curva patrón, se añaden 40 µL del reactivo de ATP a cada uno de los pozos y se incuba durante 5 min a Temperatura ambiente en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se lee la placa a 560 nm en un espectrofotómetro Magellan (GENios Plus, Tecan Austria GmbH, Groding, Austria), la determinación de la concentración de ATP es de acuerdo a la curva estándar, y posteriormente realizar la determinación del número de bacterias.

Tabla 6. Curva patrón para la cuantificación de ATP. Se colocan 7 tubos eppendorf de 1.5 mL y se realizar diluciones seriadas con los reactivos y el orden siguiente.

Dilución	Volumen de buffer TE (µL)	Origen y volumen de solución de ATP (µL)	Concentración final (pmol/µL)
A	1188	12 de stock de ATP	0.1
B	600	600 de A	0.05
C	600	600 de B	0.025
D	600	600 de C	0.0125
E	600	600 de D	0.00625
F	600	600 de E	0.003125
G	600	-----	0.0

Control (+): 100 µL de caldo BHI + 2.5 µL de stock de ATP en 500 µL de buffer TE. Control (-): 100 µL de caldo BHI en 500 µL de buffer TE.

Cuantificación del número de bacterias

A partir de las lecturas de unidades relativas de luminiscencia (RLU) y concentración de ATP de la curva realizada se obtiene la ecuación de la recta y con los resultados de cada una de las muestras se sustituye Y (URL) y se calcula X que corresponde a la concentración de ATP en pmol.

Ej. $Y=2445$ RLU a partir de la ecuación de la recta despejar X y sustituir Y.

$$X = \frac{Y - 178.8}{177029} = \frac{2445 - 178.8}{177029} = 0.0128$$

$$0.0128 \frac{\text{pmol}}{\mu\text{L}} X \frac{1 \text{ mol}}{1 \times 10^{12} \text{ pmol}} X \frac{1 \times 10^6 \mu\text{L}}{1 \text{ L}} = 1.28 \times 10^{-8} \text{ M}$$

$$\begin{array}{l} 1 \times 10^{-17} \text{ M} \text{ ————— } 5 \text{ bacterias} \\ 1.28 \times 10^{-8} \text{ M} \text{ ————— } X \end{array}$$

$$X = \frac{(1.28 \times 10^{-8}) (5 \text{ bacterias})}{(1 \times 10^{-17})} = 6.4 \times 10^8 \text{ Bacterias en } 100 \mu\text{L de suspensión.}$$

Anexo II

Determinación de perfil inmunológico por citometría de flujo

La estrategia a seguir para la identificación del tipo de respuesta fue, primero delimitar la población deseada colocándola en la región 1 (R1) la cual se tomó como referencia para construir otro histograma en el cual se colocó en el eje de las ordenadas (eje Y) el marcador CD3 y en el eje de las abscisas (eje X) el marcador CD4, tomando como positivo para estos dos marcadores los eventos superiores a 10^3 , con esto se obtienen eventos dobles positivos con los marcadores CD3 y CD4, lo cual nos indica que se habla de linfocitos, para determinar la producción de citocinas intracelulares, se construyó un nuevo histograma tomando como referencia la zona doble positiva del histograma anterior, en este nuevo histograma se colocó en el eje de las ordenadas IL-6 y en el eje de las abscisas IFN, de igual forma se toma como positivo a estas citocinas los eventos que sean superiores a 10^3 , finalmente se tomó como linfocitos productores de estas dos citocinas, los que se encuentran en la zona doble positiva de este último histograma, lo cual nos indicaría una respuesta de tipo Th1 (figura 13).

Esta estrategia se aplicó para realizar la comparación entre los ratones control y los ratones problema, evaluando cada una de las respuestas (Th1, Th2, Th17 y Treg), con esto se observaron las tendencias de cada una de las respuestas en la infección con *H. pylori*, con respecto al tiempo.

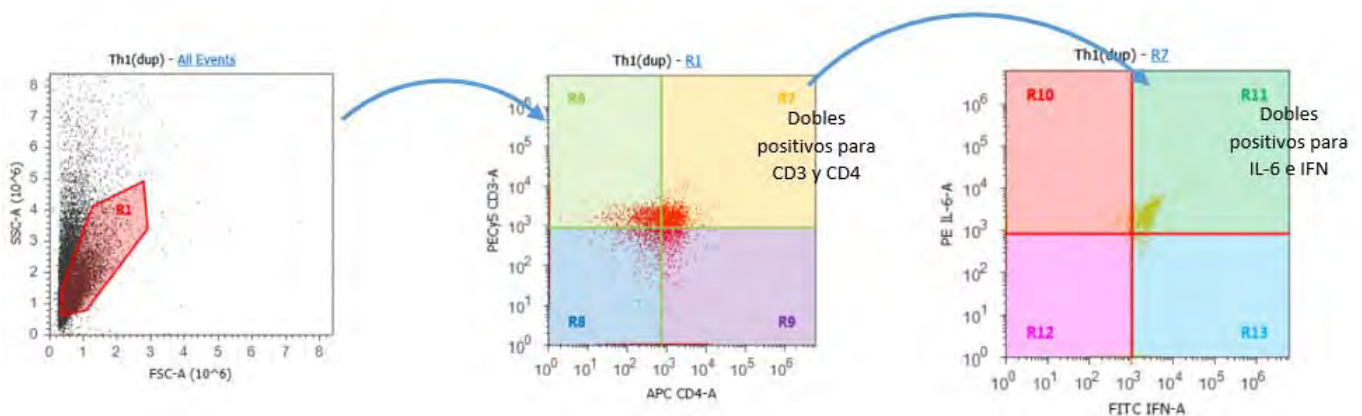


Figura 13. Estrategia de selección de eventos positivos para los marcadores CD3, CD4, IL-6 e IFN, indicando en este caso una respuesta de tipo Th1.

Las gráficas de comparación entre respuestas Th1, Th2, Th17 y Treg, por cada tiempo se construyeron a partir de los datos arrojados en cada corrida de citometria de flujo, tomando como 100% el número de eventos dobles positivos para los marcadores CD3 y CD4 para así cuantificar el número de eventos que corresponden a cada una de las respuestas evaluadas.

Referencias

- Algood, H. M., Gallo-Romero, J., Wilson, K. T., Peek, R. M., Jr., & Cover, T. L. (2007). Host response to *Helicobacter pylori* infection before initiation of the adaptive immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol*, *51*(3), 577-586. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00338.x
- Alzaharani, S., Lina, T. T., Gonzalez, J., Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., & Reyes, V. E. (2014). Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol*, *20*(36), 12767-12780. doi: 10.3748/wjg.v20.i36.12767
- Amieva, M. R., & El-Omar, E. M. (2008). Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, *134*(1), 306-323. doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.009
- Atherton, J. C. (2006). The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol*, *1*, 63-96. doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100125
- Aziz, R. K., Khalifa, M. M., & Sharaf, R. R. (2015). Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *J Adv Res*, *6*(4), 539-547. doi: 10.1016/j.jare.2013.07.007
- Blaser, M. J., & Atherton, J. C. (2004). *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*, *113*(3), 321-333. doi: 10.1172/JCI20925
- Boquet, P., & Ricci, V. (2012). Intoxication strategy of *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Trends Microbiol*, *20*(4), 165-174. doi: 10.1016/j.tim.2012.01.008
- Carbo, A., Olivares-Villagomez, D., Hontecillas, R., Bassaganya-Riera, J., Chaturvedi, R., Piazuelo, M. B., . . . Algood, H. M. (2014). Systems modeling of the role of interleukin-21 in the maintenance of effector CD4+ T cell responses during chronic *Helicobacter pylori* infection. *MBio*, *5*(4), e01243-01214. doi: 10.1128/mBio.01243-14
- Correa, P., & Piazuelo, M. B. (2008). Natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Liver Dis*, *40*(7), 490-496. doi: 10.1016/j.dld.2008.02.035
- Cover, T. L. (2012). Perspectives on methodology for in vitro culture of *Helicobacter pylori*. *Methods Mol Biol*, *921*, 11-15. doi: 10.1007/978-1-62703-005-2_3
- Crew, K. D., & Neugut, A. I. (2006). Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, *12*(3), 354-362.
- Cheng, Y., Jope, R. S., & Beurel, E. (2015). A pre-conditioning stress accelerates increases in mouse plasma inflammatory cytokines induced by stress. *BMC Neurosci*, *16*, 31. doi: 10.1186/s12868-015-0169-z
- Cho, Y. S., Chae, H. S., Jang, S. N., Kim, J. S., Son, H. S., Kim, H. K., . . . Chang, E. D. (2008). Comparison of the 13C-urea breath test and the endoscopic phenol red mucosal pH test in the quantification of *Helicobacter pylori* infection loading. *Korean J Intern Med*, *23*(3), 134-139. doi: 10.3904/kjim.2008.23.3.134
- De Falco, M., Lucariello, A., Iaquinto, S., Esposito, V., Guerra, G., & De Luca, A. (2015). Molecular Mechanisms of *Helicobacter pylori* Pathogenesis. *J Cell Physiol*, *230*(8), 1702-1707. doi: 10.1002/jcp.24933
- Dixon, B. R., Radin, J. N., Piazuelo, M. B., Contreras, D. C., & Algood, H. M. (2016). IL-17a and IL-22 Induce Expression of Antimicrobials in Gastrointestinal Epithelial Cells and May Contribute to Epithelial Cell Defense against *Helicobacter pylori*. *PLoS One*, *11*(2), e0148514. doi: 10.1371/journal.pone.0148514
- Drumm, B. (1990). *Helicobacter pylori*. *Arch Dis Child*, *65*(11), 1278-1282.
- Dunne, C., Dolan, B., & Clyne, M. (2014). Factors that mediate colonization of the human stomach by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*, *20*(19), 5610-5624. doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5610

- Ferreira, J., & Moss, S. F. (2014). Current Paradigm and Future Directions for Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 12(4), 373-384. doi: 10.1007/s11938-014-0027-6
- Figueiredo, C. A., Marques, C. R., Costa Rdos, S., da Silva, H. B., & Alcantara-Neves, N. M. (2014). Cytokines, cytokine gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: friend or foe? *World J Gastroenterol*, 20(18), 5235-5243. doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5235
- Gonzalo, C. R., Adriana, V. B., Guillermo, M. H., Xochitl, V. M., Ruben, A. G. G., & Yolanda, L. V. (2009). Comparative Proteomic Analysis of *Helicobacter pylori*-Expressed Proteins in Gastric Epithelial Cell Apoptosis. *Current Proteomics*, 6(3), 187-197.
- Hagymasi, K., & Tulassay, Z. (2014). *Helicobacter pylori* infection: new pathogenetic and clinical aspects. *World J Gastroenterol*, 20(21), 6386-6399. doi: 10.3748/wjg.v20.i21.6386
- Hartman, D. J., & Owens, S. R. (2012). Are routine ancillary stains required to diagnose *Helicobacter* infection in gastric biopsy specimens? An institutional quality assurance review. *Am J Clin Pathol*, 137(2), 255-260. doi: 10.1309/AJCPD8FFBJ5LSLTE
- Ho, S. A., Hoyle, J. A., Lewis, F. A., Secker, A. D., Cross, D., Mapstone, N. P., . . . et al. (1991). Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol*, 29(11), 2543-2549.
- Kalali, B., Mejias-Luque, R., Javaheri, A., & Gerhard, M. (2014). *H. pylori* virulence factors: influence on immune system and pathology. *Mediators Inflamm*, 2014, 426309. doi: 10.1155/2014/426309
- Kim, I. J., & Blanke, S. R. (2012). Remodeling the host environment: modulation of the gastric epithelium by the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA). *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 37. doi: 10.3389/fcimb.2012.00037
- Kodama, M., Murakami, K., Sato, R., Okimoto, T., Nishizono, A., & Fujioka, T. (2005). *Helicobacter pylori*-infected animal models are extremely suitable for the investigation of gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, 11(45), 7063-7071.
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*, 19(3), 449-490. doi: 10.1128/CMR.00054-05
- Lopez-Brea, M., Alarcon, T., Domingo, D., & Diaz-Reganon, J. (2008). Inhibitory effect of Gram-negative and Gram-positive microorganisms against *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*, 61(1), 139-142. doi: 10.1093/jac/dkm404
- Maeda, S., & Mentis, A. F. (2007). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 12 Suppl 1, 10-14. doi: 10.1111/j.1523-5378.2007.00529.x
- Mahler, M., Bedigian, H. G., Burgett, B. L., Bates, R. J., Hogan, M. E., & Sundberg, J. P. (1998). Comparison of four diagnostic methods for detection of *Helicobacter* species in laboratory mice. *Lab Anim Sci*, 48(1), 85-91.
- Malferteiner, P., Link, A., & Selgrad, M. (2014). *Helicobacter pylori*: perspectives and time trends. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11(10), 628-638. doi: 10.1038/nrgastro.2014.99
- Matsushima, Y., Kinoshita, Y., Watanabe, M., Hassan, S., Fukui, H., Maekawa, T., . . . Chiba, T. (1999). Augmentation of water-immersion stress- induced gastric mucosal lesions in BALB/c mice infected with *Helicobacter felis*. *Digestion*, 60(1), 34-40. doi: 7586
- Megraud, F., & Lehours, P. (2007). *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*, 20(2), 280-322. doi: 10.1128/CMR.00033-06
- Mentis, A., Lehours, P., & Megraud, F. (2015). Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 20 Suppl 1, 1-7. doi: 10.1111/hel.12250
- Montecucco, C., & Rappuoli, R. (2001). Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(6), 457-466. doi: 10.1038/35073084

- Nomura, A., Stemmermann, G. N., Chyou, P. H., Kato, I., Perez-Perez, G. I., & Blaser, M. J. (1991). *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med*, *325*(16), 1132-1136. doi: 10.1056/NEJM199110173251604
- Parkin, D. M. (2004). International variation. *Oncogene*, *23*(38), 6329-6340. doi: 10.1038/sj.onc.1207726
- Parsonnet, J., Shmueli, H., & Haggerty, T. (1999). Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA*, *282*(23), 2240-2245.
- Posselt, G., Backert, S., & Wessler, S. (2013). The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Commun Signal*, *11*, 77. doi: 10.1186/1478-811X-11-77
- Raghavan, S., & Quiding-Jarbrink, M. (2012). Immune modulation by regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-associated diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, *12*(1), 71-85.
- Robinson, K., Argent, R. H., & Atherton, J. C. (2007). The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, *21*(2), 237-259. doi: 10.1016/j.bpg.2007.01.001
- Roesler, B. M., Rabelo-Goncalves, E. M., & Zeitune, J. M. (2014). Virulence Factors of *Helicobacter pylori*: A Review. *Clin Med Insights Gastroenterol*, *7*, 9-17. doi: 10.4137/CGast.S13760
- Rogers, A. B. (2012). Histologic scoring of gastritis and gastric cancer in mouse models. *Methods Mol Biol*, *921*, 189-203. doi: 10.1007/978-1-62703-005-2_22
- Safavi, M., Sabourian, R., & Foroumadi, A. (2016). Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current and future insights. *World J Clin Cases*, *4*(1), 5-19. doi: 10.12998/wjcc.v4.i1.5
- Shi, Y., Liu, X. F., Zhuang, Y., Zhang, J. Y., Liu, T., Yin, Z., . . . Zou, Q. M. (2010). *Helicobacter pylori*-induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice. *J Immunol*, *184*(9), 5121-5129. doi: 10.4049/jimmunol.0901115
- Shiomi, S., Toriie, A., Imamura, S., Konishi, H., Mitsufuji, S., Iwakura, Y., . . . Kita, M. (2008). IL-17 is involved in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Helicobacter*, *13*(6), 518-524. doi: 10.1111/j.1523-5378.2008.00629.x
- Stevenson, T. H., Lucia, L. M., & Acuff, G. R. (2000). Development of a selective medium for isolation of *Helicobacter pylori* from cattle and beef samples. *Appl Environ Microbiol*, *66*(2), 723-727.
- Stone, M. A. (1999). Transmission of *Helicobacter pylori*. *Postgrad Med J*, *75*(882), 198-200.
- Suerbaum, S., & Josenhans, C. (2007). *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol*, *5*(6), 441-452. doi: 10.1038/nrmicro1658
- Suerbaum, S., & Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*, *347*(15), 1175-1186. doi: 10.1056/NEJMra020542
- Sugiyama, T., & Asaka, M. (2004). *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Med Electron Microsc*, *37*(3), 149-157. doi: 10.1007/s00795-004-0250-7
- Suresh, M. R., Fanta, M. B., Kriangkum, J., Jiang, Q., & Taylor, D. E. (2000). Colonization and immune responses in mice to *Helicobacter pylori* expressing different Lewis antigens. *J Pharm Pharm Sci*, *3*(2), 259-266.
- Suzuki, N., Murata-Kamiya, N., Yanagiya, K., Suda, W., Hattori, M., Kanda, H., . . . Hatakeyama, M. (2015). Mutual reinforcement of inflammation and carcinogenesis by the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. *Sci Rep*, *5*, 10024. doi: 10.1038/srep10024
- Thompson, L. J., Danon, S. J., Wilson, J. E., O'Rourke, J. L., Salama, N. R., Falkow, S., . . . Lee, A. (2004). Chronic *Helicobacter pylori* infection with Sydney strain 1 and a newly identified

- mouse-adapted strain (Sydney strain 2000) in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect Immun*, 72(8), 4668-4679. doi: 10.1128/IAI.72.8.4668-4679.2004
- Torres, J., Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G., Gomez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., . . . Munoz, O. (1998). A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis*, 178(4), 1089-1094.
- Wang, A. Y., & Peura, D. A. (2011). The prevalence and incidence of *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer disease and upper gastrointestinal bleeding throughout the world. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 21(4), 613-635. doi: 10.1016/j.giec.2011.07.011
- Wang, Y. K., Kuo, F. C., Liu, C. J., Wu, M. C., Shih, H. Y., Wang, S. S., . . . Wu, D. C. (2015). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol*, 21(40), 11221-11235. doi: 10.3748/wjg.v21.i40.11221
- Wroblewski, L. E., Peek, R. M., Jr., & Wilson, K. T. (2010). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*, 23(4), 713-739. doi: 10.1128/CMR.00011-10
- Zanotti, G., & Cendron, L. (2014). Structural and functional aspects of the *Helicobacter pylori* secretome. *World J Gastroenterol*, 20(6), 1402-1423. doi: 10.3748/wjg.v20.i6.1402
- Zenner, L. (1999). Pathology, diagnosis and epidemiology of the rodent *Helicobacter* infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 22(1), 41-61.