



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

---

**Prevalencia de *Helicobacter pylori*, *H. suis* y  
otras especies de Helicobacterias no-*Helicobacter pylori* en  
población dedicada a actividades agropecuarias y  
cerdos para consumo de Puerto Escondido, Oaxaca: Análisis del  
potencial zoonótico**

**TESIS**

Que para obtener el título de  
**Médico Veterinario Zootecnista**

Presenta  
**José Roberto López Santacruz**

Asesores de tesis  
**M. en C. Esp. Adriana Méndez Bernal**  
**Dr. Joaquín Manzo Merino**

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2022





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.

## **Dedicatoria**

A mi madre, a quien le agradezco cada instante de mi vida.

## Agradecimientos

A mis padres, por el apoyo incondicional y todo lo que me han dejado a lo largo de mi vida para convertirme en la persona que soy actualmente.

A mi hermana, por todo el apoyo, cariño y experiencias que me ha dado, así como por ser el ejemplo que deseo seguir.

A mis asesores, la M. en C. Esp. Adriana Méndez Bernal y al Dr. Joaquín Manzo Merino por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo. Por compartir su bastos conocimientos, experiencia y consejos que me motivaron a concluir este proyecto y me abrieron el panorama a un nuevo mundo de conocimiento.

A todos los miembros del Laboratorio de Agentes Biológicos y Cáncer y del Laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos del INCan por todas las enseñanzas, críticas constructivas y experiencias vividas.

A todos los académicos y alumnos del Departamento de Patología de la FMVZ – UNAM por el apoyo que me brindaron desde el servicio social, las enseñanzas y amistades que me dejaron.

A Sergio Ayala Díaz y el personal de la Unidad de Endoscopía del Grupo Médico y de Investigación Ángel del Mar S. C. de Puerto Escondido por la recolección de las muestras, así como al Dr. Leonardo Saúl Lino Silva del departamento de patología del INCan por su colaboración en los diagnósticos de las biopsias procedentes de pacientes humanos.

A la histotecnóloga Karen Janeth Guitareo Quintana por su gran apoyo en el procesamiento de las muestras.

A la Dra. Carolina Romo González del Laboratorio de Bacteriología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría y al Dr. Freddy Haesebrouck de la Universidad de Ghent, Bélgica por su atención e invaluable donación del DNA de *H. suis*.

A la Dra. María del Rosario Espinoza de la Facultad de Medicina – UNAM por su amable donación del DNA de *H. pylori*.

A los Biol. María del Pilar Ramos Godínez de la Unidad de Patología del INCan y Juan Carlos León Contreras del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por su amable apoyo en el procesamiento de las muestras para microscopía electrónica.

A Alberto Alfaro por el tiempo que hemos pasado y el apoyo incondicional.

A los miembros de mi jurado por sus valiosos comentarios y disposición.

A la UNAM por ser mi segundo hogar desde la preparatoria y por ser parte fundamental de mi formación académica y personal.

Este proyecto fue apoyado por el Instituto Nacional de Cancerología a través del proyecto: (017/048/IBI) (CEI/1227/17).

## Contenido

<i>Abreviaturas</i> .....	1
<i>Resumen</i> .....	3
<i>Lista de figuras</i> .....	5
<i>Lista de tablas</i> .....	6
1. <i>Introducción</i> .....	7
1.1 <i>Helicobacter</i> y salud pública.....	7
1.2 Género <i>Helicobacter</i> .....	9
1.3 Epidemiología .....	10
1.4 <i>Helicobacter pylori</i> .....	11
1.5 Especies de Helicobacterias no- <i>Helicobacter pylori</i> .....	13
1.6 <i>Helicobacter suis</i> .....	13
1.7 Patogenia.....	16
1.7.1 Proceso neoplásico inducido por <i>Helicobacter</i> : Cascada de Correa .....	18
1.8 Diagnóstico de la infección por <i>Helicobacter</i> .....	21
1.9 Tratamiento de la infección por <i>H. pylori</i> .....	22
2. <i>Antecedentes</i> .....	23
3. <i>Planteamiento del problema</i> .....	24
4. <i>Justificación</i> .....	25
5. <i>Pregunta de investigación</i> .....	25
6. <i>Hipótesis</i> .....	26
7. <i>Objetivos</i> .....	26
7.1 Objetivo general.....	26
7.2 Objetivos particulares .....	26
8. <i>Materiales y métodos</i> .....	27

8.1	Diseño del estudio .....	27
8.2	Tamaño de muestra.....	27
8.3	Población de estudio .....	28
8.4	Obtención de biopsias endoscópicas de pacientes humanos y fragmentos de tejido gástrico de cerdos.....	29
8.5	Análisis histopatológico .....	29
8.6	Tinciones especiales de impregnación argéntica (Warthin-Starry) .....	31
8.7	Detección molecular de bacterias del género <i>Helicobacter</i> .....	32
8.7.1	Extracción y purificación de DNA de las biopsias gástricas de humanos y muestras de tejido gástrico de cerdos.....	32
8.7.2	Amplificación de secuencias de <i>Helicobacter</i> mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).....	33
8.7.3	Electroforesis de los productos de PCR .....	36
8.8	Microscopía electrónica de transmisión .....	36
8.9	Análisis estadístico .....	37
9.	<i>Resultados</i> .....	38
9.1	Datos demográficos de la población .....	38
9.2	Análisis histopatológico .....	38
9.3	Tinciones especiales de impregnación argéntica (Warthin-Starry) .....	42
9.4	Detección molecular de <i>Helicobacter</i> .....	44
9.5	Resultados de asociación entre la infección y la presencia de lesiones histológicas .....	47
9.6	Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión. ....	48
10.	<i>Discusión</i> .....	51
11.	<i>Conclusiones</i> .....	59
12.	<i>Referencias</i> .....	60
13.	<i>Anexos</i> .....	67

## Abreviaturas

°C	Grados centígrados
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
C-Met	Tirosina-proteína cinasa Met
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
<i>et al.</i>	Y otros
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GC	Contenido de guanina y citosina
<i>H. baculiformis</i>	<i>Helicobacter baculiformis</i>
<i>H. bizzozeroni</i>	<i>Helicobacter bizzozeroni</i>
<i>H. cynogastricus</i>	<i>Helicobacter cynogastricus</i>
<i>H. felis</i>	<i>Helicobacter felis</i>
<i>H. heilmannii</i>	<i>Helicobacter heilmannii</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
hTERT	Telomerasa transcriptasa inversa
<i>H. salomonis</i>	<i>Helicobacter salomonis</i>
<i>H. suis</i>	<i>Helicobacter suis</i>
H&E	Hematoxilina y Eosina
IBP	Inhibidor de bomba de protones
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> , Sintetasa de óxido nítrico inducible
kDA	Kilodaltones
MALT	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue</i> , Tejido linfoide asociado a mucosas

MAPK	<i>Mitogen activated protein kinases</i> , Proteína cinasas activadas por mitógenos
MPM	Marcador de peso molecular
NHPH	<i>Non-Helicobacter pylori Helicobacters</i> , Especies no- <i>Helicobacter pylori</i>
OLGA	<i>Operative Link for Gastritis Assessment</i>
OLGIM	<i>Operative Link for Gastric Intestinal Metaplasia Assessment</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORFs	<i>Open Reading Frames</i> , Marcos de lectura abiertos
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> , Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrogeniones
PKC	<i>Protein kinase C</i> , Proteína cinasa C
PRU	Prueba rápida de ureasa
qPCR	<i>Quantitative Polimerase Chain Reaction</i> , Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ácido ribonucleico
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i> , Ácido ribonucleico ribosomal
siRNA	<i>Small interfering Ribonucleic Acid</i> , Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
SST4	Sistema de secreción tipo IV
T <sub>m</sub>	<i>Melting temperature</i> , Temperatura de alineamiento
tRNA	<i>Transference Ribonucleic Acid</i> , Ácido ribonucleico de transferencia
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VEGF	<i>Vascular endotelial growth factor</i> , Factor de crecimiento endotelial vascular
VNC	<i>Viable but Non Culturable</i> , Formas viables pero no cultivables

## Resumen

**LÓPEZ SANTACRUZ JOSÉ ROBERTO. Prevalencia de *Helicobacter pylori*, *H. suis* y otras especies de Helicobacterias no-*Helicobacter pylori* en población dedicada a actividades agropecuarias y cerdos para consumo de Puerto Escondido, Oaxaca: Análisis del potencial zoonótico. (Bajo la dirección de: M. en C. Esp. Adriana Méndez Bernal y Dr. Joaquín Manzo Merino).**

Más de 35 especies de *Helicobacter* causan enfermedades gastrointestinales en humanos y animales. La especie más estudiada es *Helicobacter pylori*. La prevalencia de la infección a nivel mundial es de 44.3%. Las especies no-*Helicobacter pylori* son especies de *Helicobacter* asociadas a enfermedad gástrica. De éstas, *H. suis* es la de mayor prevalencia en humanos con enfermedad gástrica. En cerdos, coloniza la zona glandular pilórica y fúndica del estómago, su prevalencia se encuentra entre el 8% y el 95%.

El presente estudio tuvo como objetivo conocer la prevalencia de estas especies en cerdos sacrificados para consumo y en pacientes con Enfermedad Gastrointestinal y estudiar las alteraciones histopatológicas y ultraestructurales que producen.

Se analizaron biopsias de antro y cuerpo gástrico de 37 pacientes humanos y de 35 cerdos las cuales se procesaron para estudio histopatológico (clasificadas usando el protocolo de Correa & Houghton y el de Park), prevalencia y estudio ultraestructural.

Los pacientes humanos cursaban con gastritis no-atrónica crónica no activa (60.8%), seguidos por gastritis atrófica (21.6%) y gastritis no-atrónica crónica activa (12.1%), además de metaplasia intestinal (5.4%). En cerdos, el hallazgo más prevalente fue el infiltrado inflamatorio linfoplasmocítico (48.7%), seguido de hiperplasia del tejido linfoide asociado a la mucosas (31.4%) y el edema en la submucosa (10%).

La tinción de Warthin-Starry indicó un 18.9% de positividad a organismos similares a *Helicobacter* (HLOs) en humanos, siendo negativa en el epitelio gástrico de los cerdos.

La presencia de *Helicobacter spp. H. pylori* y *H. suis* fue detectada por PCR en tiempo real en ambas poblaciones de estudio. El 94.59% de los pacientes humanos y el 100% de los cerdos fueron positivos a *Helicobacter*. Específicamente, *H. pylori* fue encontrado en el 45.71% de los humanos, mientras que este no fue detectado en las muestras de cerdos. *H. suis* fue detectado en el 68.5% de los cerdos, así como en 8.82% de los humanos incluidos.

Se realizó microscopía electrónica de transmisión a 4 muestras identificadas como positivas a la infección por *H. pylori*, encontrando a los microorganismos en contacto con las células epiteliales gástricas y dentro del citoplasma de macrófagos, así como alteraciones ultraestructurales como atrofia de microvellosidades, vacuolización del epitelio, pérdida de las uniones estrechas intercelulares y metaplasia intestinal.

En conclusión, existe una alta prevalencia de *H. pylori* y especies de helicobacterias no-*H. pylori* en humanos con alteraciones gastrointestinales y en cerdos sacrificados para consumo en Puerto Escondido, Oaxaca confirmando de esta manera el reservorio de este patógeno y su potencial zoonótico.

## Lista de figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Morfología de especies <i>Helicobacter</i>	9
<b>Figura 2.</b> Distribución geográfica de la infección por <i>H. pylori</i> .	11
<b>Figura 3.</b> Secuencia completa del genoma de <i>H. pylori</i> .	12
<b>Figura 4.</b> Anatomía del estómago de los cerdos.	14
<b>Figura 5.</b> Lesión inducida por <i>H. suis</i> en cerdo.	15
<b>Figura 6.</b> Patogenia de la infección por <i>Helicobacter</i> .	18
<b>Figura 7.</b> Histopatología de los componentes del proceso pre neoplásico.	19
<b>Figura 8.</b> Cambios histológicos en el epitelio gástrico.	40
<b>Figura 9.</b> Proceso inflamatorio crónico en sección gástrica humana.	40
<b>Figura 10.</b> Proceso inflamatorio crónico en secciones gástricas de cerdo.	42
<b>Figura 11.</b> Detección de bacilos mediante la tinción Warthin-Starry.	43
<b>Figura 12.</b> Detección de bacilos mediante la tinción Warthin-Starry.	43
<b>Figura 13.</b> Figuras representativas del proceso de estandarización de <i>primers</i> .	44
<b>Figura 14.</b> Gráfico de amplificación de reacción de qPCR.	45
<b>Figura 15.</b> Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación de qPCR.	46
<b>Figura 16.</b> Interacción ultraestructural de <i>H. pylori</i> con el hospedero.	49
<b>Figura 17.</b> Alteraciones ultraestructurales presentes en la mucosa gástrica de pacientes infectados con <i>H. pylori</i> .	50

## Lista de tablas

		Página
<b>Tabla 1.</b>	Estudios de prevalencia de <i>H. suis</i> .	15
<b>Tabla 2.</b>	Antecedentes del estudio.	24
<b>Tabla 3.</b>	Criterios de selección en la población de estudio.	28
<b>Tabla 4.</b>	Criterios para la clasificación de las biopsias gástricas de humanos.	30
<b>Tabla 5.</b>	Criterios para la clasificación de las secciones histológicas de estómago de cerdos.	31
<b>Tabla 6.</b>	Secuencia de <i>primers</i> para la detección de <i>Helicobacter</i> e integridad génica.	34
<b>Tabla 7.</b>	Mezcla de reacción ( <i>Master mix</i> ) de PCR	35
<b>Tabla 8.</b>	Mezcla de reacción ( <i>Master mix</i> ) de qPCR	35
<b>Tabla 9.</b>	Protocolos de amplificación para PCR por par de <i>primers</i> .	36
<b>Tabla 10.</b>	Datos demográficos de los pacientes.	38
<b>Tabla 11.</b>	Hallazgos histopatológicos presentes en las secciones histológicas de biopsias gástricas de pacientes humanos.	39
<b>Tabla 12.</b>	Clasificación de las lesiones histopatológicas en las secciones de estómago de pacientes humanos.	39
<b>Tabla 13.</b>	Hallazgos histopatológicos presentes en las secciones histológicas de fragmentos de tejido gástrico de cerdos.	41
<b>Tabla 14.</b>	Clasificación de las lesiones histopatológicas en las secciones de estómago de cerdos.	41
<b>Tabla 15.</b>	Prevalencia de <i>Helicobacter spp.</i> , <i>H. pylori</i> y <i>H. suis</i> en pacientes con Enfermedad Gastrointestinal	46
<b>Tabla 16.</b>	Prevalencia de <i>Helicobacter spp.</i> , <i>H. pylori</i> y <i>H. suis</i> en cerdos.	46
<b>Tabla 17.</b>	Resultados de asociación entre la infección y la presencia de lesiones histológicas.	47

## 1. Introducción

### 1.1 *Helicobacter* y salud pública

En el año 1984 se reportó por primera vez que la úlcera gástrica en humanos es causada por una infección bacteriana, identificando a *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) como el agente etiológico. Posteriormente, los estudios epidemiológicos y moleculares proporcionaron información sobre la asociación entre las bacterias pertenecientes al género *Helicobacter* con el desarrollo de diversas patologías en humanos y animales incluyendo gastritis, enfermedad de úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, del inglés *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*). El género *Helicobacter* se compone por más de 35 especies las cuales causan enfermedades gastrointestinales en humanos y animales cuya distribución filo-geográfica está asociada a las características de la población, como lo demuestran diversos estudios que sugieren que *H. pylori* evolucionó conjuntamente con su huésped durante al menos 100,000 años, dando como resultado una gran diversidad genética de la misma. Sin embargo, para otras especies de *Helicobacter*, hoy en día no existe información disponible acerca de la filogenia o bien, se desconoce su origen evolutivo (Haesebrouck *et al.* 2009; Flahou *et al.*, 2018).

La infección por *H. pylori* es una de las más comunes entre los seres humanos a nivel mundial. La tasa de prevalencia de *H. pylori* varía dependiendo del área geográfica, la edad y el estado socioeconómico analizado. Se ha reportado que la infección por *Helicobacter spp.* está presente hasta en un 70% en los países en vías de desarrollo a diferencia de los desarrollados, donde se ha reportado una prevalencia del 50% o menor (Hooi *et al.*, 2017). Aunque diversos registros implican su adquisición intrafamiliar, se ha postulado el papel de los animales como fuente de contagio, mismo que continúa siendo investigado (Elhariri *et al.*, 2017).

Diferentes modelos biológicos en animales de laboratorio han sido utilizados para estudiar el curso de la infección por *H. pylori*, así como para estudiar los procesos asociados con el desarrollo de las diferentes patologías producidas por la bacteria,

obteniendo resultados favorables para el análisis de las posibles vías zoonóticas para la transmisión de especies del género *Helicobacter* hacia los humanos (Mladenova-Hristova *et al.*, 2017; Watanabe *et al.*, 1998). Además de *H. pylori*, se han descrito otras especies del género *Helicobacter*, las cuales infectan primordialmente animales domésticos de producción y compañía con una prevalencia del 2 al 100%, mismas que colonizan el estómago de los individuos humanos que están en contacto con dichos animales, con una prevalencia general de 0.1 a 6.2% (Tomb *et al.*, 1997; Haesebrouck *et al.*, 2009; Øverby *et al.*, 2017). Estas incluyen especies de *Helicobacter* asociadas a perros, gatos, hurones, conejos, bovinos y cerdos, entre otros huéspedes (Haesebrouck *et al.*, 2009; Flahou *et al.*, 2018). Cabe resaltar que existe evidencia de que perros, gatos y especialmente los cerdos, son los hospederos de especies de *Helicobacter* con potencial zoonótico (Haesebrouck *et al.*, 2009; Flahou *et al.*, 2018).

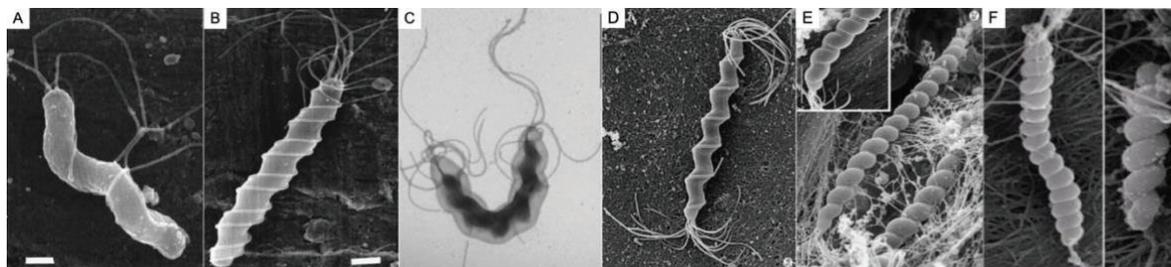
El aislamiento de bacterias del género *Helicobacter* en animales domésticos han abierto nuevas perspectivas respecto a su participación en la producción de enfermedades en humanos, así como para el desarrollo de técnicas de identificación aplicadas directamente a biopsias gástricas en humanos y animales para determinar la relación entre estas especies y la presentación de enfermedades específicas tanto en humanos como en animales. Estas técnicas permiten determinar si los patógenos que infectan animales se comparten con su contraparte, los patógenos humanos, determinar si pertenecen a la misma especie y relacionar su presencia en humanos con enfermedades gastrointestinales (Haesebrouck *et al.*, 2009).

Hasta ahora la especie más estudiada ha sido *H. pylori*, la cual causa enfermedad gástrica en humanos, quienes actúan como el mayor reservorio para la misma. Sin embargo, existe un grupo de bacterias del género *Helicobacter* conocidas como no-*Helicobacter pylori* o *non-Helicobacter pylori Helicobacters* (NHPH, por sus siglas en inglés), las cuales habitan en el estómago de animales domésticos y silvestres, representando un reservorio zoonótico potencial (Haesebrouck *et al.*, 2009; Mladenova-Hristova *et al.*, 2017). Dentro de los hospederos naturales del género

*Helicobacter* se encuentran los cerdos, primates no humanos como el macaco y el mandril, así como perros y gatos, entre otros (Haesebrouck *et al.*, 2009). La especie de helicobacteria no-*Helicobacter pylori* más estudiada ha sido *Helicobacter suis* que frecuentemente se encuentra infectando a los cerdos, provocando alteraciones en la producción de ácido clorhídrico en la porción glandular del estómago. El desarrollo de úlceras en dicha porción es una patología común distribuida de forma mundial, con prevalencias por encima del 93% en el cerdo. Se ha hipotetizado que el tamaño de partícula en la dieta y agentes infecciosos como *H. suis* y *Fussobacterium gastrosuis* están involucrados; sin embargo, el mecanismo y patogénesis hasta la fecha no está completamente claro (De Witte *et al.*, 2018).

## 1.2 Género *Helicobacter*

Las bacterias del género *Helicobacter* son bacilos Gram negativos de forma helicoidal, micro-aerófilas (5% de O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> y 85% de N<sub>2</sub>), que presentan de cuatro a veinte flagelos distribuidos de forma monopolar o bipolar, lo que les permite tener gran movilidad en forma de sacacorchos para penetrar la capa de moco que recubre el epitelio del estómago, miden entre 2.5 a 7 micras de largo y de 0.3 a 1.2 micras de ancho (Figura 1 y Anexo 1). Estas bacterias requieren de medios suplementados para su crecimiento (Agar Brucella, Agar Columbia y Agar Casman, suplementados con 7% de sangre de carnero, sangre o suero de caballo, o en su defecto suero fetal bovino), crecen en un medio con un pH de 6.6 a 8.4 y a una temperatura de 37°C con un tiempo de incubación por lo general de 3 a 5 días (Haesebrouck *et al.*, 2009; Blaser & Atherton, 2004; Hooi *et al.*, 2017).



**Figura 1. Morfología de especies *Helicobacter*.** A) Fotomicrografía electrónica de barrido. Forma de "S" de *Helicobacter pylori* con 5 a 7 flagelos monopolares envainados (O'Rourke *et al.*, 2001). B) Fotomicrografía electrónica de barrido. Forma helicoidal de *Helicobacter felis* con fibras periplásmicas y flagelos bipolares envainados (O'Rourke *et al.*, 2001). C) Fotomicrografía electrónica de barrido. Forma helicoidal de *Helicobacter suis* con 4 a 6 flagelos bipolares, tinción negativa. (Baele *et al.*, 2008). D) Fotomicrografía electrónica de barrido. Forma helicoidal de *Helicobacter salomonis* con 10 a 23 flagelos bipolares (Stoffel *et al.*, 2000). E) Fotomicrografía electrónica de barrido. Forma helicoidal de *Helicobacter bizzozeronii* con 10 a 20 flagelos bipolares (Stoffel *et al.*, 2000). F) Fotomicrografía electrónica de barrido. Forma helicoidal de *Helicobacter heilmanii* con 10 a 20 flagelos bipolares (Une, 2003).

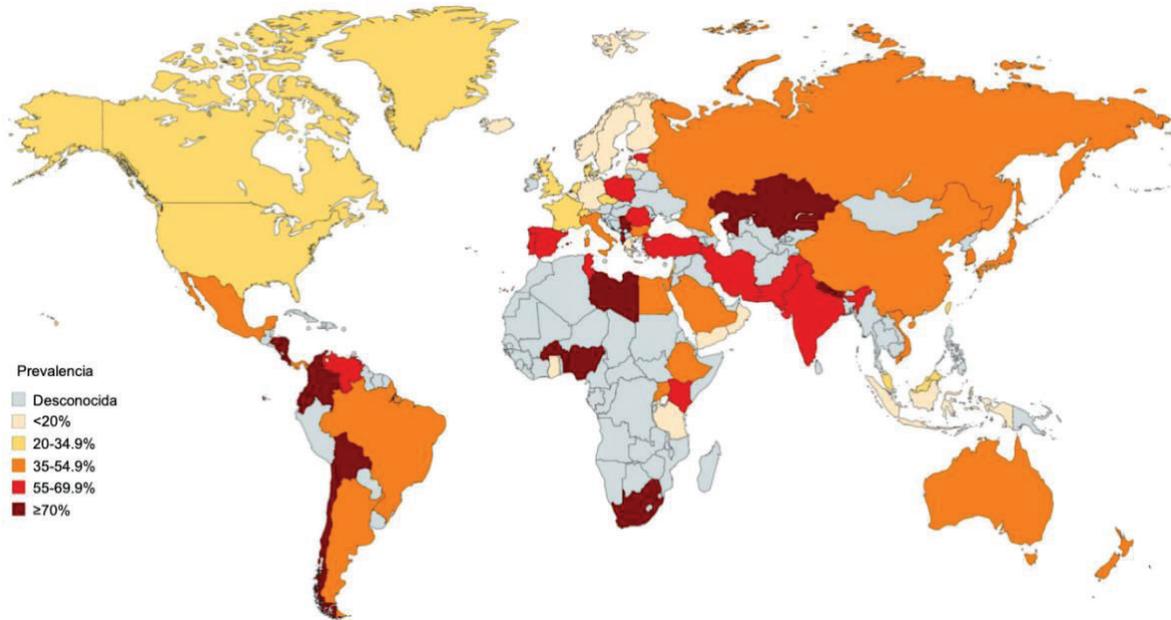
### 1.3 Epidemiología

Un metaanálisis desarrollado por Hooi y colaboradores (2017) evaluó la prevalencia de las infecciones por *Helicobacter pylori* a nivel global, concluyendo que la infección por este patógeno continúa siendo un problema importante de salud pública en todo el mundo. En dicho análisis se estimó que aproximadamente 4.4 millones de personas en todo el mundo son positivas para la infección por *H. pylori*. Así mismo se demostró que existe una amplia variación en la prevalencia de *H. pylori* entre continentes y países. La prevalencia es más alta en África (79.1%), América Latina y el Caribe (63.4%) y Asia (54.7%). En contraste, dicha prevalencia es más baja en América del Norte (37.1%) y Oceanía (24.4%) (Figura 2). Adicionalmente, se determinó una disminución de la prevalencia de *H. pylori* en los países altamente industrializados del mundo occidental a comienzos del siglo XXI. Sin embargo, la prevalencia se ha mantenido en un nivel alto en los países en desarrollo y en aquellos recientemente industrializados (Hooi *et al.*, 2017).

Por otra parte, el estudio realizado por Zamani y colaboradores (2018) indica que existe una prevalencia general de *H. pylori* del 44.3% en todo el mundo. Esta tasa osciló entre 50.8% en países en desarrollo en comparación con 34.7% en países desarrollados. La tasa global de infección por *H. pylori* es de 42.7% en mujeres en comparación con un 46.3% en hombres. La prevalencia existente en población mayor de 18 años es significativamente más alta que en niños (48.6% vs 32.6%, respectivamente) (Zamani *et al.*, 2018).

En México, la prevalencia de la infección por *H. pylori* fue analizada en niños y adultos jóvenes, encontrando que después de los 10 años el 50% de los niños analizados por estudios serológicos fueron positivos a la infección, misma que alcanzó el 70% en los individuos de 20 años (Torres *et al.*, 1998). Posteriormente se encontró que la prevalencia descendió cerca de un 10% en adultos jóvenes y hasta en un 15% en niños entre los 11 y 14 años en un lapso de 10 años. Aunque el descenso puede atribuirse a múltiples factores, se asume que en ese lapso pudo

haber una mejoría en las condiciones socioeconómicas en México. Sin embargo, es importante reconocer que estos resultados pueden variar en las diversas regiones geográficas de nuestro país (Bosques *et al.*, 2018).



**Figura 2. Distribución geográfica de la infección por *H. pylori*.** Representación gráfica de la prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en el mundo. Los países más afectados por *H. pylori* son aquellos con un índice bajo de desarrollo. Adaptado de Zamani *et al.*, 2018.

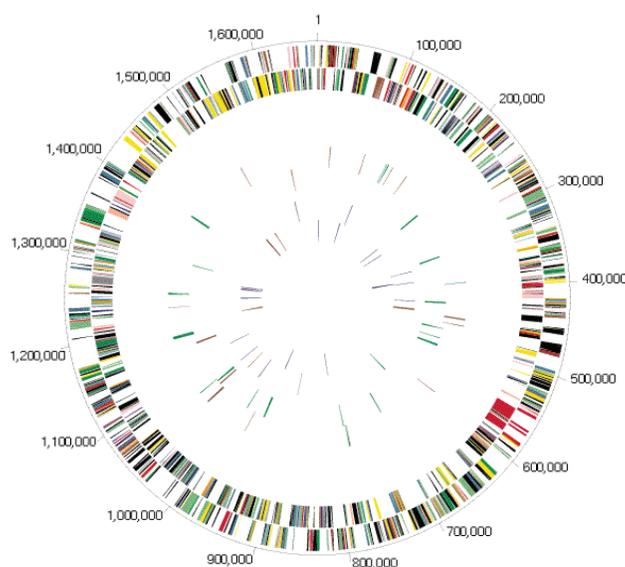
### 1.4 *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* es un microorganismo considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como carcinógeno tipo I, debido a su capacidad de producir gastritis crónica activa, gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia, adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal y linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a mucosas o linfoma tipo MALT. De estas patologías la más significativa en términos de mortalidad es el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal (De la Torre-Bravo *et al.*, 2010; García & García-González 2015; Xie *et al.*, 2017).

En la mayoría de los casos, la infección por *Helicobacter pylori* se establece durante la infancia y es adquirida por vía oral. En contraste, la mayoría de los pacientes diagnosticados con cáncer gástrico tienen una edad de alrededor de 50 años (Hatakeyama, 2014). Lo que sugiere que la tumorigénesis gástrica es un proceso gradual y de larga evolución que podría ser influenciado por diversos factores

ambientales, sociales, genéticos y epigenéticos (Camargo, 2017). Por otra parte, diversos metaanálisis recientes indican que el riesgo relativo de desarrollar cáncer gástrico es de 2 a 3 veces mayor para las personas infectadas con *Helicobacter pylori* que para aquellos negativos a la infección (Burkitt *et al.*, 2017).

El genoma de *Helicobacter pylori* (cepa 26695) consiste en un cromosoma circular con un tamaño de 1,667,867 pares de bases (pb), con una composición de GC del 39% (Figura 3) (Tomb *et al.*, 1997). Así mismo, presenta 1,495 marcos abiertos de lectura (ORFs, del inglés *Open Reading Frame*), que representan el 91% de su genoma. Aunado a ello posee dos copias del gen RNAr 16S y la presencia de la isla de patogenicidad cagPAI completa, la cual codifica la citotoxina asociada al gen A (CagA). Además, cuenta con genes que codifican para diversos factores de virulencia importantes, entre ellos: *vacA*, *babA*, *oipA*, *dupA* y *sabA* (Villaguala *et al.* 2016). De manera particular, al gen de la citotoxina vacuolizante (VacA) presenta diferentes alelos dentro del genoma bacteriano (Cervantes-García 2016). Además, se han identificado treinta y seis tipos de tRNA y dos conjuntos separados de genes de RNA ribosómico (RNAr) 23S-5S y 16S, junto con un gen único para el gen que codifica el RNA ribosomal 5S (Tomb *et al.*, 1997).



**Figura 3. Secuencia completa del genoma de *H. pylori*.**

Círculo concéntrico externo: regiones de codificación pronosticadas en la cadena positiva. Segundo círculo concéntrico: regiones de codificación predichas en la cadena negativa. Tercer y cuarto círculo: elementos IS (rojo) y otras repeticiones (verde) en el filamento más y menos, respectivamente. Quinto y sexto círculo concéntrico: tRNAs (azul), rRNAs (rojo) y siRNAs (verde) en las cadenas positiva y negativa, respectivamente (Tomb *et al.*, 1997).

## **1.5 Especies de Helicobacterias no-*Helicobacter pylori***

Las especies no-*Helicobacter pylori* *Helicobacters* o helicobacterias no-*Helicobacter pylori*, son especies del género *Helicobacter* diferentes a *H. pylori* asociadas a enfermedad gástrica en humanos y animales, capaces de producir gastritis crónica, adenocarcinoma gástrico, linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT). A la fecha se han reportado 5 especies de helicobacterias no-*Helicobacter pylori* en tejido gástrico en humanos mediante estudios moleculares, las cuales son *H. suis*, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* y *H. heilmannii*. Estas especies se consideran patógenos zoonóticos que habitan en el estómago de diferentes animales incluyendo cerdos, perros y gatos (Anexo 1). Aunque el mecanismo de contagio aún no ha sido esclarecido por completo, el contacto directo con animales y la ingestión de carne de cerdo contaminada constituyen dos mecanismos probables de contagio (Øverby *et al.*, 2017). Así mismo, estas especies provocan los mismos cambios inflamatorios que aquellos propiciados por *H. pylori* y de la misma forma están asociados al desarrollo de úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) (Haesebrouck *et al.*, 2009; Biernat *et al.*, 2016).

Las especies de *Helicobacter* que infectan a caninos y felinos domésticos más comúnmente son *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* y *H. heilmannii*. Recientemente se ha aislado del estómago de perros a *H. cynogastricus* y a *H. baculiformis* del estómago de gatos, conformando así un grupo de cepas de helicobacterias no-*Helicobacter pylori* con alto potencial zoonótico debido a la alta convivencia con estos animales (Haesebrouck *et al.*, 2009; Flahou *et al.*, 2018).

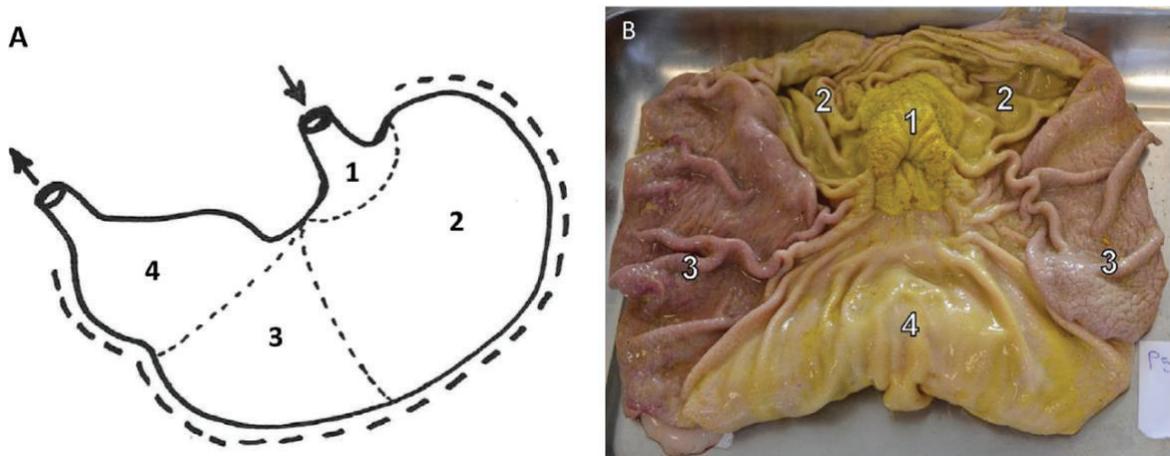
## **1.6 *Helicobacter suis***

La presencia de una bacteria con morfología espiral Gram negativa colonizando el estómago de cerdos fue descrita por primera vez en 1990, misma que fue llamada *Gastrospirillum suis*. Después de analizar el tejido gástrico de cerdos, así como la secuencia del gen 16S rRNA de dicha bacteria se demostró que esta pertenece al género *Helicobacter*. Las secuencias del gen 16S rRNA obtenidas del tejido gástrico

de diferentes cerdos mostraron una similitud del 99.7% indicando que estas bacterias constituyen un solo taxón, descrito como "*Candidatus Helicobacter suis*" (Baele *et al.*, 2008).

*Helicobacter suis* (*H. suis*) es una bacteria zoonótica que ha sido reportada como patógeno en el macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*), en el macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), en el mandril (*Mandrillus sphinx*), en humanos (*Homo sapiens*) y en su hospedador natural el cerdo (*Sus scrofa domesticus*) (Haesebrouck *et al.*, 2009; Flahou *et al.*, 2018). *H. suis* es una de las especies de helicobacterias no-*Helicobacter pylori* detectadas con mayor frecuencia en humanos con enfermedad gástrica donde los factores predisponentes al contagio son el contacto cercano con cerdos o el consumo de carne de cerdo cruda o poco cocida (Omotosho *et al.*, 2018).

*H. suis* coloniza principalmente la zona glandular pilórica y fúndica del estómago de los cerdos (Figura 4), lo cual induce inflamación y un decremento en la ganancia de peso diaria. Así mismo, se ha planteado la hipótesis de que la alteración en la producción de ácido clorhídrico en la región glandular del estómago está asociada con la infección crónica por esta bacteria y que dicho patógeno desempeña un papel importante en la patogénesis de la úlcera gástrica porcina (De Witte *et al.*, 2017).



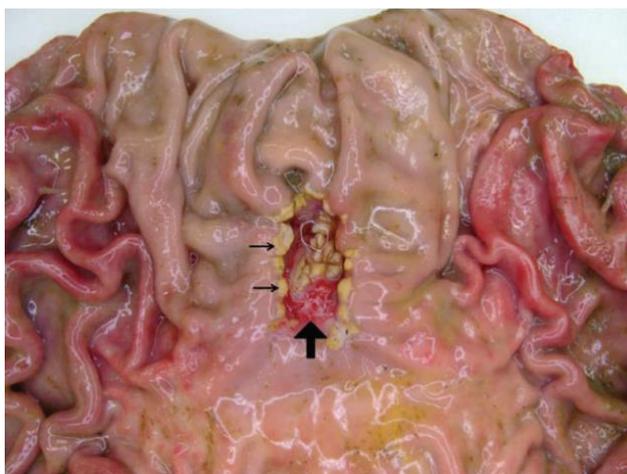
**Figura 4. Anatomía del estómago del cerdo.** A) Diagrama del estómago sin disección. Las flechas indican la entrada del esófago en el estómago y el inicio del duodeno, la curvatura mayor se encuentra indicada por la línea punteada de mayor tamaño. B) Estómago disecado a través de la curvatura mayor, donde se pueden apreciar las distintas regiones que lo conforman. 1: *Pars esophagea*, 2: *Cardias*, 3: *Fondo*, 4: *Píloro* (De Witte *et al.*, 2018).

A nivel global las tasas de prevalencia de las infecciones gástricas por miembros del género *Helicobacter* en cerdos en edad de sacrificio (de 10 semanas en adelante) oscilan entre el 8% y el 95% que van en función de la edad de los cerdos analizados (Tabla 1). (Mendes *et al.*, 1991; Grasso *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2000; Hallemans *et al.*, 2015).

**Tabla 1.** Estudios de prevalencia de *H. suis*

Autor	Año	País	Edad de los cerdos	Prevalencia
Mendes <i>et al.</i>	1991	Brasil	6 meses (Antro pilórico) 6 meses (Fondo)	10.8% 5%
Grasso <i>et al.</i>	1996	Italia	7.2 meses	12.9%
Park <i>et al.</i>	2000	Corea del Sur	5 meses 4 semanas	8% 2%
Hellemans <i>et al.</i>	2007	Bélgica	4 – 12 semanas 13 – 26 semanas >26 semanas	22% 84% 90%

En contraste a otras especies animales, incluida la humana, los cerdos comúnmente no desarrollan úlceras en el antro pilórico, en su lugar las desarrollan en la *pars esophagea* (Figura 5), debido a que la infección con *H. suis* puede provocar secreción excesiva de ácido gástrico, llevando al aumento de contacto de la porción no glandular del estómago con el ácido clorhídrico (Haesebrouck *et al.*, 2009).



**Figura 5.** Lesión inducida por *H. suis* en cerdo. Estómago de cerdo disecado que exhibe una zona extensa de hiperqueratosis, presentada comúnmente como un engrosamiento en la mucosa, teñido por bilis (flechas delgadas). Esto puede evolucionar a hendiduras, erosiones y formación de úlceras (flecha grande) (Haesebrouck *et al.*, 2009).

## 1.7 Patogenia

La infección con *Helicobacter sp.* se adquiere por vía oral, misma que desciende por el tubo digestivo, gracias a sus flagelos y su morfología helicoidal se transporta hasta la superficie de la capa de moco que recubre las células epiteliales de la mucosa gástrica (Cervantes-García, 2016).

Las bacterias del género *Helicobacter* se desarrollan en un ambiente con pH de 6.0 - 7.0 y mueren o no se desarrollan en ambientes cuyo pH oscila entre 1.0 - 2.0, como el presente en la luz gástrica. El moco gástrico es relativamente impermeable al ácido y tiene una gran capacidad amortiguadora. El moco del lado luminal tiene un pH ácido (1.0 a 2.0), mientras que en el lado epitelial el pH es de casi 7.4, es por ello que las bacterias del género *Helicobacter* se establecen en la capa mucosa cerca de la superficie epitelial donde el pH es fisiológico (Blaser & Atherton, 2004). Las bacterias del género *Helicobacter* poseen factores de virulencia asociados con la colonización (Anexo 2) como adhesinas que favorecen su adherencia a las células foveolares superficiales (Figura 6).

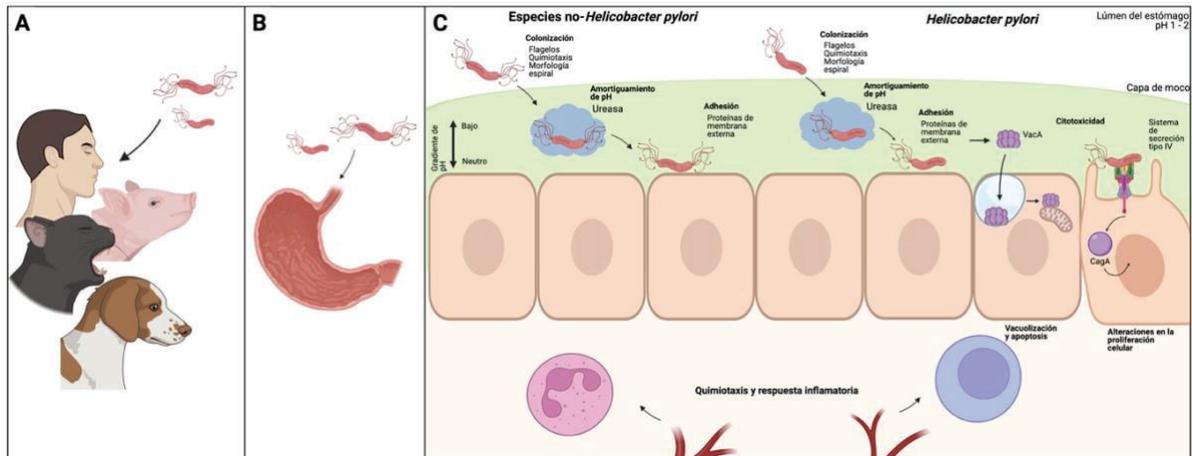
Uno de los mecanismos de patogenicidad de *Helicobacter* es la producción de una proteasa que degrada el complejo lípido-gluco-protéico de la capa de moco que cubre a las células epiteliales gástricas, el cual les confiere continuidad y protección (Cervantes-García, 2016). Aunado a ello, las cepas gástricas de *Helicobacter* producen una enzima llamada ureasa con un peso molecular de 550 kDa formada por dos subunidades UreA y UreB cuya actividad está sujeta al pH alrededor de la bacteria ya que la ureasa hidroliza la urea en dióxido de carbono y amonio (lo que le permite a la bacteria amortiguar el pH del microambiente y sobrevivir) (Cervantes-García, 2016). El amonio es responsable de la destrucción de la mucosa, permitiendo que el ácido penetre hacia capas más profundas (Figura 6) (Torres y Torres, 2016).

Adicionalmente, la ureasa posee actividad quimiotáctica para leucocitos y promueve la formación de especies reactivas de oxígeno por parte de los neutrófilos; sin

embargo, el sistema antioxidante de *Helicobacter*, conformado por diversas enzimas como catalasa y oxidasa, confieren protección a dichos compuestos (Anexos 2 y 3).

Por otra parte, *H. pylori* provoca citotoxicidad a nivel de la mucosa gástrica debido a factores de virulencia que únicamente se encuentran presentes en esta especie, los cuales son un sistema de secreción tipo IV (SST4) codificado por la isla de patogenicidad Cag-PAI, que facilita la inyección de proteínas con actividad citopática como CagA (Anexo 2) así como peptidoglicanos, las cuales inducen alteraciones en la proliferación celular consecuentemente alterando la secreción de ácido. La citotoxina vacuolizante VacA se une gracias a su estructura hexamérica a la membrana citoplasmática y a las membranas mitocondriales, produciendo liberación de citocromo C, que en consecuencia aumenta la permeabilidad de las células, creando canales de membrana y produciendo de esta manera la vacuolización del epitelio (Figura 6) (Cervantes-García, 2016).

Adicionalmente, *H. pylori* posee fosfolipasas que hidrolizan las membranas celulares, lo cual conlleva a la liberación de lisolecitinas, las cuales constituyen un factor ulcerogénico. También posee lipopolisacáridos, peptidoglicanos, tetrapéptidos, entre otros patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que estimulan una gran variedad de receptores extra e intracelulares como el Nod 1, los cuales ejercen un importante efecto quimiotáctico sobre los eosinófilos y neutrófilos, facilitando su reclutamiento y proliferación. Una vez activas, provocan la liberación de citocinas produciendo una respuesta inflamatoria amplificante, la cual lesiona aún más la mucosa mediante la liberación de mediadores inflamatorios (Figura 6) (Cervantes-García, 2016).



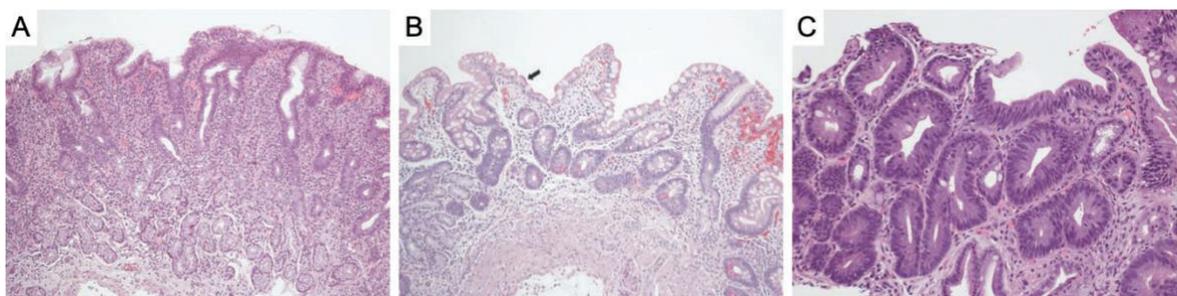
**Figura 6. Patogenia de la infección por *Helicobacter*** A) La infección se establece por vía oral. B) Gracias a sus características morfológicas la bacteria contrarresta el peristaltismo y se establece en la capa de moco del estómago. C) Una vez en el estómago, las bacterias del género *Helicobacter* se establecen en la porción epitelial la capa de moco que recubre las células epiteliales, posteriormente comienzan la liberación de proteínas de membrana externa que están asociadas a la colonización como la ureasa, catalasa y proteínas de adhesión. En el caso particular de *H. pylori* posee otros factores de virulencia asociados a citotoxicidad que carecen el resto de las bacterias de este género: VacA, que se une a la membrana citoplasmática de las células epiteliales generando poros que posteriormente provocan la vacuolización y la isla de la patogenicidad Cag-PAI que codifica un sistema de secreción tipo IV por el cual se inyecta a las células epiteliales la oncoproteína CagA, que posteriormente desencadena alteraciones en la proliferación celular. El proceso inflamatorio es provocado por el daño en el epitelio así como por la quimiotaxis hacia los leucocitos. Adaptado de Salama *et al.*, 2013, Creado con BioRender.

### 1.7.1 Proceso neoplásico inducido por *Helicobacter*: Cascada de Correa

Los componentes básicos en el proceso pre neoplásico gástrico asociado a la infección por *H. pylori* fueron descritos por Correa en 2006, quien describió una secuencia de lesiones histológicas que conllevan al establecimiento neoplásico que incluyen: 1) Gástritis no-atrónica crónica activa, caracterizada por la infiltración difusa de leucocitos en la mucosa gástrica, sin pérdida glandular; 2) Gastritis atrófica multifocal, donde existe pérdida glandular (atrofia), aparentemente por los efectos directos de productos bacterianos y por citocinas en el medio cercano a la mucosa gástrica, dicha pérdida de tejido posteriormente será reemplazada con tejido fibroso, lo cual en conjunto permite la introducción de células troncales responsables de los subsecuentes cambios en el tejido que conllevan al desarrollo neoplásico; 3) Metaplasia intestinal, donde las glándulas gástricas originales y el epitelio foveolar son reemplazados por células que poseen un fenotipo intestinal, alternadas con

células caliciformes llenas de mucina, esta metaplasia en los estadios avanzados adquiere las características morfológicas del intestino grueso; 4) Displasia, caracterizada por cambios atípicos en la morfología nuclear y la arquitectura tisular, los núcleos se alargan, son hipercromáticos, de forma irregular y pierden su polaridad (Figura 7). La arquitectura tisular es irregular, formando frecuentemente paquetes de estructuras tubulares (adenomas) con lúmenes irregulares que pueden convertirse en carcinomas invasivos si atraviesan la membrana basal, con progresiones de 60 a 85% a carcinomas invasivos en distintos estudios (Correa & Houghton, 2007).

Dentro de esta secuencia de cambios en el epitelio se encuentran diferentes alteraciones genéticas y moleculares características del cáncer gástrico asociado a *Helicobacter* como la inestabilidad génica, metilación del DNA, mutaciones en la proteína p53 y activación de la telomerasa. La presencia de la telomerasa transcriptasa inversa (hTERT) confieren inmortalidad a las células. En etapas avanzadas del cáncer gástrico frecuentemente se observa amplificación y sobreexpresión de la tirosina-proteína cinasa Met (C-Met), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y genes reguladores de la ciclina E, así como la sobreexpresión de factores de crecimiento y angiogénicos que parecen favorecer la progresión y metástasis de la neoplasia (Serrano *et al.*, 2004).



**Figura 7. Fotomicrografías de los componentes del proceso pre neoplásico.** Fotomicrografías de estómago. A) Gastritis no atrófica. Mucosa gástrica antral con infiltrado leucocítico mononuclear generalizado, con glándulas preservadas. B) Gastritis atrófica multifocal con metaplasia intestinal completa. Metaplasia con enterocitos eosinofílicos con borde de cepillo bien definido (Flecha negra) y en células caliciformes en intervalos regulares. C) Displasia gástrica de bajo grado. Presencia de glándulas irregulares alineadas por células epiteliales alargadas, hipercromáticas, con núcleos pseudoestratificados y mitosis frecuentes (Correa & Houghton, 2007). Tinción H&E

La isla de patogenicidad CagPAI, uno de los factores de virulencia más importantes del patógeno, codifica un Sistema de Secreción Tipo IV que inyecta la proteína CagA a las células epiteliales gástricas, la cual actúa como una molécula de señalización, al ser fosforilada por el sistema tirosin cinasa Src y Abl debido a su interacción con diversos componentes que poseen homología de SRC, proteínas con dominios SH2, SHP-2 tirosina fosfatasa, la tirosina cinasa SRC terminal C (SCK) y la proteína adaptadora Crk lo que resulta en la reorganización del citoesqueleto y elongación celular. Además, CagA estimula la cascada de señalización de la vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) lo que genera proliferación celular anormal y movilización de las células epiteliales gástricas. Una vez fosforilada CagA se une a Crk lo que conduce a la reorganización del citoesqueleto, ruptura de las uniones estrechas de las células epiteliales y del tejido dañado, mientras que CagA no fosforilada interactúa con otras proteínas estructurales como Zonula occludens 1 (ZO-1), el receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos, cadherina/ $\beta$ -catenina, la proteína adaptadora GRB-5 y la cinasa PAR-1. Dichas interacciones rompen las uniones celulares estrechas y adherentes e inducen pérdida de la polaridad celular así como respuestas mitogénicas y pro-inflamatorias. Eventos río abajo incluyen la transcripción de genes involucrados en la diferenciación intestinal como *cdX1* y *muc2* que causan transdiferenciación de las células epiteliales gástricas a tipo intestinal (Serrano *et al.*, 2004).

Una vez colonizada la mucosa gástrica, *H. pylori* induce la modulación de SHP2 como mecanismo para promover la carcinogénesis siendo un potente activador de NF- $\kappa$ B en las células epiteliales gástricas. Durante el proceso carcinogénico, se induce sobreexpresión de factores de crecimiento como el sistema COX-2 – prostaglandina y proteínas antiapoptóticas como survivina y Bcl2, lo cual deriva en la proliferación de células atróficas mutadas, aumenta la actividad angiogénica y reduce la actividad apoptótica (Serrano *et al.*, 2004). Además, produce la sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y aumenta la actividad de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) estado que correlaciona

con la presencia de cánceres poco diferenciados, mayor densidad microvascular, daño al DNA e inhibición de sus mecanismos de reparación (Serrano *et al.*, 2004).

Por otra parte *Helicobacter pylori* altera la regulación de las acciones de E-cadherina mediante señales celulares opuestas al funcionamiento normal de la proteína cinasa C (PKC); el consecuente aumento en la permeabilidad celular puede permitir a sus antígenos alcanzar la lámina propia gástrica y activar el sistema inmune de la mucosa (Serrano *et al.*, 2004).

### **1.8 Diagnóstico de la infección por *Helicobacter***

El diagnóstico clínico para infecciones por *Helicobacter* se obtiene mediante pruebas no invasivas como la prueba de aliento con urea marcada (PRU) y la determinación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos del *H. pylori* en las heces mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). En el caso de estudios epidemiológicos, la detección de anticuerpos anti-*H. pylori* en suero resulta útil para determinar la exposición al patógeno. Aunque la prueba de aliento con urea marcada posee una sensibilidad del 90 al 100% y una especificidad del 97 al 99% se pueden obtener falsos negativos causados por uso de antibióticos, gastritis atrófica, hemorragia digestiva y la presencia de otras bacterias productoras de ureasa, como *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, no evalúa el grado de gastritis o presencia de lesiones premalignas ni es capaz de discernir entre bacterias del género *Helicobacter* (Bosques *et al.*, 2018).

Para evaluar adecuadamente la gastritis, atrofia y/o metaplasia intestinal por *Helicobacter*, se deben obtener biopsias gástricas de acuerdo con el protocolo de Sydney actualizado mediante endoscopia, para su posterior análisis histopatológico y clasificación de acuerdo con las guías establecidas en el *Operative Link for Gastritis Assessment* y *Operative Link on Gastric Intestinal Metaplasia* (OLGA y OLGIM) del *OLGA International Group* (Bosques *et al.*, 2018). La decisión de realizar una endoscopia depende de la evaluación integral de cada paciente.

Por otra parte la detección de la infección identificando anticuerpos específicos en suero presenta la desventaja de que dichos anticuerpos séricos persisten aun cuando se haya erradicado la infección y por tanto la función de las pruebas basadas en la detección de anticuerpos en el diagnóstico de infección, detección de infección activa o bien para el seguimiento de pacientes posterior al tratamiento es limitada (Francis-Megraud *et al.*, 2014).

Debido a que las pruebas de aliento y anticuerpos séricos no son capaces de distinguir la infección por *H. pylori* de manera confiable, se ha propuesto que el diagnóstico de especies del género *Helicobacter* se lleve a cabo mediante el análisis de biopsias gástricas a través de exámenes histopatológicos, tinciones especiales de impregnación argéntica (Warthin-Starry), inmunohistoquímica, cultivo o bien técnicas moleculares (Adu-Aryee *et al.*, 2016; Chisolm & Owen, 2003). Las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten realizar la distinción entre las infecciones de bacterias del género *Helicobacter*, las cuales no son posibles de detectar mediante las pruebas diagnósticas clínicas convencionales.

### **1.9 Tratamiento de la infección por *H. pylori***

*Helicobacter pylori* en particular se encuentra en el estómago del 90 a 95% de los enfermos con úlcera duodenal y hasta en 70% de los que presentan úlcera gástrica. Las guías internacionales apoyan el tratamiento con fines de erradicación del patógeno, el cual está plenamente justificado en las situaciones en las que se ha demostrado una clara asociación de la enfermedad gástrica con *H. pylori* (Abdo-Francis *et al.*, 2007).

En efecto existen múltiples esquemas para tratar la infección por *Helicobacter* los cuales se han implementado bajo circunstancias específicas y personalizadas a cada paciente. Sin embargo, su efectividad se ha visto reducida debido al surgimiento de cepas resistentes, así como a un mal seguimiento del tratamiento.

Entre las diferentes terapias para el tratamiento de *H. pylori* están la terapia triple estándar, constituida por un inhibidor de la bomba de protones (IBP) y 2 de 3 antibióticos (amoxicilina y/o claritromicina y/o metronidazol/tinidazol), la terapia cuádruple con bismuto (IBP, bismuto, tetraciclina y metronidazol), la triple con levofloxacino (IBP, levofloxacino y amoxicilina), la terapia secuencial (IBP más amoxicilina seguido de IBP, claritromicina y metronidazol o tinidazol) y la terapia concomitante o cuádruple sin bismuto, constituida por IBP, claritromicina, amoxicilina y metronidazol (Sierra *et al.*, 2014; O'Connor *et al.*, 2016).

## 2. Antecedentes

El íntimo contacto del humano con los animales domésticos hospederos de las especies de *Helicobacter* con potencial zoonótico resultó en el desarrollo de diseños experimentales que evalúan la prevalencia de dichos patógenos, las patologías que estos producen y las posibles vías de contagio. Es así que en 2014 De Cooman *et al.*, comprobaron la presencia de *H. suis* en canales de cerdo en rastros, con una prevalencia de 4.3%. En 2015 Powers *et al.*, mencionan que un número de especies de helicobacterias no-*Helicobacter pylori* se comienzan a asociar en mayor medida a patologías gástricas, como gastritis y cáncer gástrico en humanos, hecho que fue comprobado en 2017 por Øverby *et al.*, al demostrar la infección por especies de helicobacterias no-*Helicobacter pylori* en pacientes con linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) en un 35% y úlcera duodenal en un 30%. Recientemente, Bahadori *et al.*, (2018) determinaron que en pacientes que presentan gastritis nodular y úlcera las infecciones por *H. pylori*, *H. suis* y *H. heilmannii* se encuentran en un 30.9%, 1.8% y 0.9% respectivamente, además de la existencia de un paciente con co-infección (*H. pylori* - *H. suis*). Finalmente Takigawa *et al.*, (2019) confirmaron que la infección por especies de helicobacterias no-*Helicobacter pylori* se encuentra presente en el 10% de los casos de linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a mucosas común, mientras que la infección por

*H. suis* se encontró en el 100% de los casos de linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a mucosas con aspecto de gastritis nodular (Tabla 2).

### 3. Planteamiento del problema

Adicional a *H. pylori* existe un grupo de bacterias patógenas zoonóticas asociadas a diversas enfermedades en humanos y animales; sin embargo, se desconoce su prevalencia actual en México, así como la relación que tienen en la presentación de alteraciones gástricas en la población mexicana, por lo que es preciso el estudio de éstas, así como determinar su efecto en el huésped y las enfermedades asociadas.

**Tabla 2.** Antecedentes del estudio

<b>Autor</b>	<b>Año</b>	<b>Aportación</b>
De Cooman <i>et al.</i>	2014	Presencia de <i>H. suis</i> en canales de cerdo, con una prevalencia general de 4.3%.
Powers <i>et al.</i>	2015	Además de <i>H. pylori</i> , las NHPH son patógenos potenciales para los humanos, ligados a gastritis y cáncer gástrico.
Øverby <i>et al.</i>	2017	La infección por NHPHs se encuentra relacionada a linfoma gástrico (35%) y úlcera duodenal (30%). En pacientes que presentan gastritis nodular y ulceración se
Bahadori <i>et al.</i>	2018	encontraron las infecciones por <i>H. pylori</i> , <i>H. suis</i> y <i>H. heilmannii</i> en un 30.9%, 1.8% y 0.9% respectivamente, además de la existencia de un paciente con co-infección ( <i>H. pylori</i> – <i>H. suis</i> ).
Takigawa <i>et al.</i>	2019	La infección por NHPHs se encuentra presente en el 10% de los casos de linfoma gástrico común, mientras que la infección por <i>H. suis</i> se encontró en el 100% de los casos de M-NGA.

#### **4. Justificación**

*Helicobacter pylori* es una de las especies del género *Helicobacter* más importante en términos de salud pública. Sin embargo, existen otras especies que han sido identificadas en patologías gastrointestinales en humanos y en animales de producción y compañía, colocando a esas especies como altamente zoonóticas. Por lo que su identificación en cerdos sacrificados para consumo humano y pacientes con indicación de endoscopia digestiva superior con diagnóstico clínico de enfermedad gastrointestinal en Puerto Escondido, Oaxaca, México, permitirá comprender la asociación de bacterias del género *Helicobacter* en infecciones gastrointestinales en humanos y cerdos ofreciendo una oportunidad de estudiar la relación existente entre estos patógenos, su efecto en el huésped y las enfermedades asociadas. Estos hallazgos permitirán estudiar los mecanismos patogénicos y las vías potenciales para la transmisión de *Helicobacter suis* y otras especies de helicobacterias no-*Helicobacter pylori* en población oaxaqueña dedicada a actividades agropecuarias así como en cerdos para consumo. Adicionalmente, los agentes infecciosos que se encuentran en animales domésticos y silvestres como reservorio y poseen un potencial zoonótico pueden producir brotes de enfermedades emergentes, generando un alto impacto en la salud pública, animal y económico, por lo que su estudio es necesario para conocer el panorama epidemiológico y desarrollar medidas de diagnóstico, prevención y control.

#### **5. Pregunta de investigación**

¿Cuál es la prevalencia de infección por *H. pylori*, *H. suis* y especies de helicobacterias no-*Helicobacter pylori* en cerdos para consumo humano y en la población oaxaqueña dedicada al manejo de los mismos? ¿Existe asociación entre la presencia de estas bacterias y la presencia de lesiones gástricas?

## 6. Hipótesis

La alta prevalencia de infección por *H. pylori*, *H. suis* y especies de helicobacterias no-*Helicobacter pylori* en cerdos para consumo humano y en la población oaxaqueña dedicada al manejo de los mismos, está asociada con la presencia de alteraciones macroscópicas y microscópicas en epitelio gástrico representando un potencial zoonótico.

## 7. Objetivos

### 7.1 Objetivo general

Determinar la prevalencia de *H. pylori*, *H. suis* y especies de helicobacterias no-*Helicobacter pylori* en mucosa gástrica de cerdos sacrificados para consumo humano y en población oaxaqueña expuesta al contagio directo o zoonótico del patógeno y asociar su presencia con lesiones gástricas en humanos.

### 7.2 Objetivos particulares

1. Clasificar las lesiones histopatológicas presentes en el tejido gástrico de los pacientes con enfermedad gastrointestinal y cerdos sacrificados para consumo.
2. Identificar la presencia de microorganismos compatibles con *Helicobacter* en mucosa gástrica de cerdos sacrificados para consumo humano y de pacientes con diagnóstico clínico de Enfermedad Gastrointestinal mediante la tinción de impregnación argéntica Warthin-Starry
3. Identificar la presencia de *H. pylori*, *H. suis* y especies de helicobacterias no-*Helicobacter pylori* en mucosa gástrica de cerdos sacrificados para consumo humano y de pacientes con diagnóstico clínico de Enfermedad Gastrointestinal mediante PCR en tiempo real.

4. Determinar la interacción ultraestructural entre el organismo y el patógeno mediante microscopía electrónica de transmisión.
5. Determinar la asociación entre las lesiones histopatológicas y la presencia de *H. pylori*, *H. suis* y especies de helicobacterias no-*Helicobacter pylori* en mucosa gástrica de cerdos sacrificados para consumo humano y de pacientes con el diagnóstico clínico de Enfermedad Gastrointestinal.

## **8. Materiales y métodos**

### **8.1 Diseño del estudio**

Se llevó a cabo un estudio descriptivo de corte transversal. La población estuvo conformada por pacientes con indicación de endoscopia digestiva superior con diagnóstico clínico de Enfermedad Gastrointestinal que se presentaron en la Unidad de Endoscopia del Grupo Médico y de Investigación Ángel del Mar S. C., de la ciudad de Puerto Escondido, Oaxaca, México. Por otro lado, la población animal estuvo constituida por cerdos sacrificados en los diferentes mataderos de la ciudad de Puerto Escondido, Oaxaca, México.

La ciudad de Puerto Escondido, Oaxaca, tiene un clima predominantemente cálido húmedo y presenta dos estaciones: secas y lluvias (Awo y Awl) bien diferenciadas, cuenta con una precipitación media anual entre 839.1 y 1587.1 mm y una temperatura de entre los 24 a los 27.2 °C (Serrano-Altamirano *et al.*, 2005).

### **8.2 Tamaño de muestra**

Se determinó el tamaño de la población de estudio para proporciones, mediante la siguiente fórmula:

$$n = \frac{(Z \alpha/2)^2 p(q)}{d^2}$$

En donde  $Z$  representa el grado de confianza (1.96),  $p$  representa la proporción esperada (0.9),  $q$  la probabilidad de fracaso (0.1) y  $d$  el error máximo admisible (0.1). Obteniendo un total de 35 muestras provenientes de humanos y 35 muestras provenientes de cerdos.

### 8.3 Población de estudio

Se incluyeron pacientes humanos que cumplieron con los criterios de selección y firmaran el consentimiento informado para la toma de biopsias gástricas y cerdos que cumplieron con los criterios de selección (Tabla 3).

**Tabla 3.** Criterios de selección en la población de estudio

Población	Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
Pacientes humanos	Pacientes con indicación de endoscopia digestiva superior con diagnóstico clínico de Enfermedad Gastrointestinal.	Pacientes no aptos para el procedimiento endoscópico tras la evaluación integral.	La muestra obtenida no cuenta con integridad de material génico.
	Residencia en Puerto Escondido, Oax. o en las zonas costeras aledañas.	Pacientes no aptos para el procedimiento de biopsia gástrica.	Material insuficiente.
	Tengan a su cargo animales domésticos de compañía o de producción.		
	Acudan a la unidad de Endoscopia del Grupo Médico y de Investigación Ángel del Mar S.C.		
Cerdos para consumo	Cerdos sacrificados en rastros municipales de Puerto Escondido, Oaxaca.	Cerdos criados en granjas intensivas.	La muestra obtenida no cuenta con integridad de material génico.
	Cerdos criados en traspatio o en granjas familiares.	Cerdos criados fuera de la región de la costa de Oaxaca.	Material insuficiente.

#### **8.4 Obtención de biopsias endoscópicas de pacientes humanos y fragmentos de tejido gástrico de cerdos**

Las muestras se obtuvieron en la Unidad de Endoscopia del Grupo Médico y de Investigación Ángel del Mar S. C de Puerto Escondido, Oaxaca, México.

A los sujetos incluidos se les realizó una endoscopia para analizar la vía digestiva superior donde se obtuvieron biopsias incisionales de antro y cuerpo gástrico (Anexo 4) las cuales se colocaron en tres contenedores estériles: 1) formaldehído al 10% amortiguado con un buffer de fosfatos a un pH de 7.2, para el estudio histopatológico; 2) solución salina fisiológica, para la extracción de ácidos nucleicos preservadas a -20°C hasta su análisis y 3) glutaraldehído al 2.5%, para el estudio de microscopía electrónica de transmisión, preservada a 4°C hasta su análisis. En cuanto a los cerdos, se obtuvieron los estómagos de 35 cerdos aparentemente sanos, con un peso aproximado de 100 kg después de ser sacrificados en los rastros municipales de Puerto Escondido, Oaxaca. Los estómagos fueron disecados a través de la curvatura mayor y el contenido gástrico fue descartado, posteriormente fueron lavados gentilmente con agua y se colectaron fragmentos de antro pilórico y fondo. De igual manera se tomaron tres muestras utilizando las condiciones arriba mencionadas.

#### **8.5 Análisis histopatológico**

El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de histopatología del departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM).

Las muestras de tejido obtenidas mediante biopsias incisionales endoscópicas de pacientes humanos y los fragmentos de tejido gástrico colectados *post-mortem* en el caso de los cerdos, fueron procesadas por la técnica estándar de Hematoxilina y Eosina. Se realizaron cortes histológicos utilizando un micrótomo (Leica RM2125

Leica Biosystems, DEU) con un grosor de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , fueron teñidas con la técnica de Hematoxilina y Eosina (H&E) para su visualización en un microscopio óptico (Lee, 1968).

El criterio para diagnóstico histológico de las biopsias gástricas de pacientes se realizó de acuerdo a la cascada de Correa & Houghton (2007) (Tabla 4) mientras que para las muestras gástricas de cerdos se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Park *et al.* (2000) (Tabla 5).

**Tabla 4.** Criterios para la clasificación de las biopsias gástricas de humano.

<b>Clasificación</b>	<b>Criterio</b>
Gastritis no-atrónica crónica activa	Infiltración difusa de leucocitos, sin pérdida glandular y mucosa gástrica activa.
Gastritis no-atrónica crónica no activa	Infiltración difusa de leucocitos, sin pérdida glandular y mucosa gástrica no activa.
Gastritis atrófica multifocal	Infiltración difusa de leucocitos, pérdida glandular y fibrosis.
Metaplasia intestinal	Reemplazo de células foveolares gástricas por células de fenotipo intestinal, alternadas con células caliciformes.
Displasia gástrica	Cambios atípicos en la morfología celular y arquitectura tisular.
Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal	Presencia de células neoplásicas de fenotipo intestinal.

Adaptado de Correa & Houghton – 2007.

**Tabla 5.** Criterios para la clasificación de las secciones histológicas de estómago de cerdos.

<b>Clasificación</b>	<b>Criterio</b>
Mucosa gástrica normal	Sin infiltración de células inflamatorias
Gastritis crónica activa	Infiltración moderada de linfocitos, células plasmáticas y algunos eosinófilos.
Gastritis crónica no activa	Infiltración moderadamente densa de linfocitos y células plasmáticas, sin presencia de folículos linfoides.
Gastritis crónica no activa con presencia de folículos linfoides	Infiltración moderadamente densa de linfocitos y células plasmáticas, con presencia de folículos linfoides.
Gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides	Muy denso infiltrado de linfocitos y células plasmáticas, con presencia de folículos linfoides.

Adaptado de Park *et al.*, -  
2000.

La tinción estándar de Hematoxilina y Eosina puede identificar directamente a *Helicobacter spp.* en un campo de 1000 x y además de permitir la evaluación del grado de inflamación. Sin embargo, cuando se combina una baja densidad bacteriana y un cambio atrófico en la mucosa, la identificación de este organismo se dificulta (Lee *et al.*, 2015). Por lo que se empleó la tinción especial de impregnación argéntica (Warthin-Starry), así como la detección molecular para asegurar la identificación del patógeno.

### **8.6 Tinciones especiales de impregnación argéntica (Warthin-Starry)**

A las muestras de tejido previamente fijadas en formalina amortiguada al 10% e incluidas en parafina se les realizó la técnica de impregnación argéntica de Warthin-Starry, con la finalidad de originar precipitados metálicos en las estructuras bacterianas y posteriormente se examinaron en un microscopio óptico.

## **8.7 Detección molecular de bacterias del género *Helicobacter***

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Agentes Biológicos y Cáncer y en el Laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos de del Instituto Nacional de Cancerología (INCan).

Las muestras de tejido gástrico, preservadas en solución salina fisiológica fueron sometidas a extracción de DNA y su posterior análisis mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) para detectar la presencia de *Helicobacter spp* mediante la amplificación de secuencias específicas.

### **8.7.1 Extracción y purificación de DNA de las biopsias gástricas de humanos y muestras de tejido gástrico de cerdos**

La extracción del DNA a partir de biopsias y muestras de tejido se realizó utilizando el kit Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen cat.69506), siguiendo las indicaciones del fabricante, que se describen brevemente a continuación:

1. Un total de 35 mg de tejido fueron digeridos en 180  $\mu$ L de buffer ATL y 20  $\mu$ L de proteinasa K en un termomixer Eppendorf Compact 5350 (Eppendorf, USA) a 56°C en agitación constante hasta su completa lisis, homogenizando la muestra con ayuda de un vortex ocasionalmente.
2. Posteriormente se agregaron 200  $\mu$ L de buffer AL, mezclándolo por medio de un vortex.
3. Se adicionaron 200  $\mu$ L de etanol al 100% grado biología molecular y se mezclaron por medio de un vortex.
4. La mezcla fue transferida a una columna Dneasy Mini, colocada en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó a 8000 rpm durante un minuto, desechando el líquido filtrado y el tubo colector.

5. Posteriormente, la columna fue colocada en un nuevo tubo colector de 2 mL, se añadieron 500  $\mu$ L de buffer AW1 y fue centrifugado por un minuto a 8000 rpm, desechando el líquido y el tubo colector.
6. La columna se colocó en un tubo colector de 2 mL nuevo, se agregaron 500  $\mu$ L de buffer AW2 y se centrifugó por tres minutos a 14000 rpm, se desechó el líquido y el tubo colector.
7. A continuación la columna se transfirió a un microtubo de 2 mL nuevo.
8. Enseguida se eluyó el DNA añadiendo 200  $\mu$ L de buffer AE al centro de la columna, incubándose por un minuto a temperatura ambiente (15 – 25°C).
9. Finalmente el tubo se centrifugó durante un minuto a 8000 rpm para obtener el DNA purificado.

El DNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro, NanoDROD 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) a 260/280 nm. Para aumentar la concentración de algunas muestras se utilizó el concentrador DNA 120 SpeedVac (Thermo Savant, USA) durante 40 minutos.

### **8.7.2 Amplificación de secuencias de *Helicobacter* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)**

Para evaluar la integridad del DNA de las muestras, se emplearon *primers* para amplificar el gen de la subunidad 18S ribosomal (18S – Fwd/18S – Rev) (Tabla 6) (Muñoz-Bello *et al.* 2018).

Para identificar la presencia de *Helicobacter* en biopsias gástricas de pacientes humanos y muestras de tejido gástrico de cerdos se emplearon *primers* universales para la detección de especies del género *Helicobacter* (16S *Helicobacter* – Fwd/16S *Helicobacter* – Rev) (Wongphutorn *et al.* 2018); así como pares de *primers* para la especie *Helicobacter pylori* (16S *H. pylori* – Fwd/16S *H. pylori* – Rev) (Loayza *et al.*

2017) y *primers* específicos para *Helicobacter suis* (BF\_HsuisF1/BF\_HsuisR1) (Tabla 6) (Bleacher *et al.* 2017).

Cada par de *primers* fue sometido a estandarización de condiciones mediante PCR punto final, donde se emplearon 50 ng de DNA previamente identificado como control. La mezcla de reacción se formuló de acuerdo a las especificaciones indicadas en la tabla 7.

Posteriormente se estandarizaron las concentraciones de *primers* mediante la obtención de curvas *Melt* por qPCR.

Finalmente las muestras fueron analizadas utilizando 50 ng de DNA de cada una. La mezcla de reacción se formuló de acuerdo a las especificaciones indicadas en la tabla 8.

**Tabla 6.** Secuencia de *primers* para la detección de *Helicobacter* e integridad génica.

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5' – 3')</b>	<b>Dirección</b>	<b>Producto</b>
18S – Fwd	AACCCGTTGAACCCATT	Fwd	149 pb
18S – Rev	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	Rev	
16S <i>Helicobacter</i> – Fwd	CTCATTGCGAAGGCGACCT	Fwd	76 pb
16S <i>Helicobacter</i> - Rev	TCTAATCCTGTTTGCTCCCCA	Rev	
16S <i>H. pylori</i> – Fwd	TGCGAAGTGGAGCCAATCTT	Fwd	118 pb
16S <i>H. pylori</i> – Rev	GGAACGTATTCACCGCAACA	Rev	
BF_HsuisF1	AAAACAMAGGCGATCGCCCTGTA	Fwd	150 pb
BF_HsuisR1	TTTCTTCGCCAGGTTCAAAGCG	Rev	

**Tabla 7.** Mezcla de reacción (*Master mix*) de PCR.

Reactivo	Concentración		Volumen	
Buffer 10 x	-	-	2	µL
dNTP's	0.4	mM	2	µL
MgCl <sub>2</sub>	2.5	mM	1.6	µL
Primer F	10	µM	0.2	µL
Primer R	10	µM	0.2	µL
Polimerasa	0.05	U/µL	0.13	µL
DNA	50	ng/µL	10	µL
H <sub>2</sub> O	-	-	3.87	µL
Volumen final para cada reacción			20.0	µL

**Tabla 8.** Mezcla de reacción (*Master mix*) de qPCR.

Reactivo	Volumen
SYBR Green	10 µL
Primer F	0.2 µL
Primer R	0.2 µL
DNA	2 µL
H <sub>2</sub> O	7.6 µL
Volumen final	20.0µL

La mezcla de reacción se colocó en un microtubo o en una placa de 96 reacciones y se procedió a realizar la amplificación empleando las condiciones correspondientes a cada juego de *primers* indicadas en la tabla 9. Como testigo positivo se empleó DNA extraído de células HeLa (Línea celular inmortalizada procedente de adenocarcinoma cervical) en la reacción destinada a detectar la integridad del material génico y de especies ya identificadas de *Helicobacter pylori* (*H. pylori* cepa 26695) y *Helicobacter suis* (*H. suis* cepa HS1). Como testigo negativo se empleó agua inyectable estéril en lugar de DNA. Las condiciones de amplificación incluyeron ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión.

**Tabla 9.** Protocolos de amplificación para PCR por par de *primers*.

<b>Primer</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Alineamiento</b>	<b>Extensión</b>	<b>Ciclos</b>
18S – Fwd	95°C 10 seg.	60°C 30 seg.	72°C 1 min.	40
18S – Rev				
16S <i>Helicobacter</i> – Fwd	95°C 10 seg.	60°C 30 seg.	72 °C 1 min.	40
16S <i>Helicobacter</i> – Rev				
16S <i>H. pylori</i> – Fwd	95°C 10 seg.	60°C 30 seg.	72°C 1 min.	40
16S <i>H. pylori</i> – Rev				
BF_HsuisF1	95°C 10 seg	60°C 30 seg.	72°C 1 min.	40
BF_HsuisR1				

### **8.7.3 Electroforesis de los productos de PCR**

Para la visualización de los productos de cada amplificación se preparó un gel de agarosa al 1 % disuelto en tampón de corrida TBE 1X a pH 7.8 y se colocó en una cámara de electroforesis con TBE 1X como disolución de corrida. De cada reacción de amplificación se mezclaron 5 µL con 1 µL de *buffer* de carga, la mezcla fue cargada en el gel para ser sometida a electroforesis durante 50 minutos a 50 volts, finalmente la visualización de las bandas se llevó a cabo por medio de un fotodocumentador (MultiDoc-It™ Imaging System, Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge, UK) utilizando GelRed como colorante.

### **8.8 Microscopía electrónica de transmisión**

El procesamiento de las muestras se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica “MVZ Aurora Velásquez Echegaray” del departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ-UNAM).

Se realizó microscopía electrónica de transmisión a 4 muestras de tejido gástrico, seleccionadas a partir de los resultados obtenidos del análisis histopatológico y análisis molecular.

Los tejidos previamente fijados en glutaraldehído al 2.5% con un pH de 7.2 fueron lavados con solución amortiguada de fosfatos y post fijados con tetraóxido de osmio al 1%, posteriormente se lavaron con solución amortiguada de fosfatos 0.1 M con pH de 7.2. Después cada una de las muestras fue deshidratada con concentraciones ascendentes de acetona para finalmente ser incluidas en resinas epóxicas (Epón 812) y polimerizadas en una estufa a 60°C por 24 horas.

Se realizaron cortes semifinos utilizando un ultramicrotomo, con un grosor de 140 nm de cada muestra, los cuales fueron montados en portaobjetos. Posteriormente, se contrastaron con azul de toluidina para seleccionar el área de interés y fueron evaluadas en un microscopio óptico, posteriormente se realizaron cortes ultrafinos de 60 nm, cada uno de ellos fue montado en rejillas de cobre de 200 mesh y se contrastaron utilizando acetato de uranilo y citrato de plomo (Vázquez *et al.*, 2000), para finalmente ser observados en un microscopio electrónico marca Jeol modelo 1010, a 60 Kv.

## **8.9 Análisis estadístico**

Los datos que muestran la correlación entre la presentación de lesiones histopatológicas y la positividad para la infección por *Helicobacter* spp. *H. pylori* y *H. suis* determinadas por qPCR fueron calculados mediante la prueba exacta de Fisher empleando el *software* SPSS Statistics® ver. 25 de IBM®.

## 9. Resultados

### 9.1 Datos demográficos de la población

Se incluyeron 37 pacientes con indicación de endoscopia digestiva superior con diagnóstico clínico de Enfermedad Gastrointestinal. La edad media fue de 51 años, un 58.3% fueron mujeres y un 41.6% hombres (Tabla 10). Los datos demográficos completos se muestran en el anexo 5.

**Tabla 10.** Datos demográficos de los pacientes.

<b>Dato demográfico</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
Pacientes de sexo femenino	58.3% (n=21)
Pacientes de sexo masculino	41.6% (n=15)
Edad media	51 años (14 – 75 años)

\*n=37

### 9.2 Análisis histopatológico

Se incluyeron 37 pacientes con indicación de endoscopia digestiva superior con diagnóstico clínico de Enfermedad Gastrointestinal, de los cuales se obtuvieron biopsias incisionales de estómago y 35 cerdos de los cuales se tomaron fragmentos de tejido gástrico, estos fueron procesadas por la técnica de hematoxilina y eosina estándar y fueron clasificadas empleando los criterios diagnósticos descritos en las tablas 4 y 5, respectivamente.

El hallazgo microscópico más frecuente en los pacientes humanos fue infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y células plasmáticas observado en el 95.9% de las secciones histológicas, seguido por hemorragias y edema en la submucosa en el 50% y 31% de las secciones histológicas respectivamente, otros cambios como hiperplasia de tejido linfoide asociado a mucosa y vacuolización del epitelio solo se hicieron presentes en el 9.4% y 5.4% de las muestras respectivamente (Tabla 11).

La clasificación de las secciones histológicas de tejido gástrico de pacientes humanos indicó que en su mayoría cursaban con gastritis no-atrónica crónica no

activa, seguida por gastritis atrófica y gastritis no-atrófica crónica activa en 60.8%, 21.6% y 12.1%, además se destaca la presencia de metaplasia intestinal en el 5.4% de las muestras analizadas (Tabla 12). Los diagnósticos descriptivos histopatológicos completos así como su clasificación se enlistan en el anexo 6.

**Tabla 11.** Hallazgos histopatológicos presentes en las secciones histológicas de biopsias gástricas de pacientes humanos.

Hallazgo histopatológico	Frecuencia
Infiltrado linfoplasmocítico	95.9% (n=71)
Hemorragias en la submucosa	50% (n=37)
Edema en la submucosa	31% (n=23)
Hiperplasia de tejido linfoide asociado a mucosas	9.4% (n=7)
Vacuolización del epitelio	5.4% (n=4)
Sin cambios patológicos aparentes	1.3% (n=1)

\*n=74

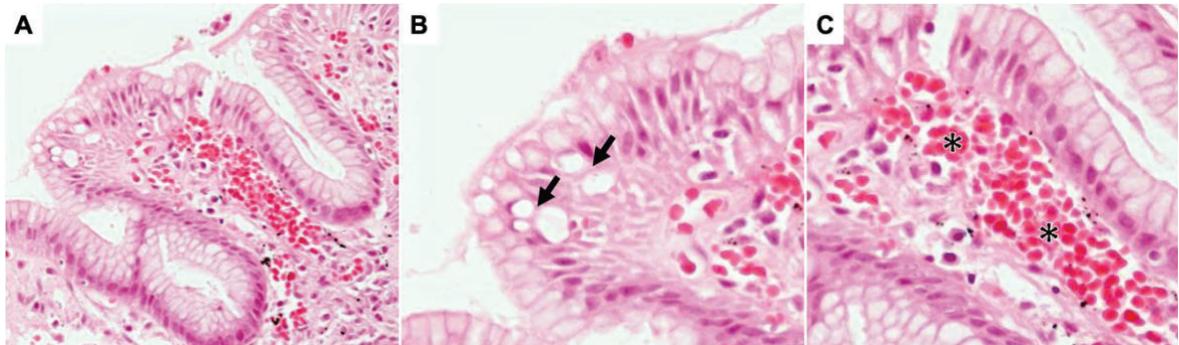
**Tabla 12.** Clasificación de las lesiones histopatológicas en las secciones de estómago de pacientes humanos.

Clasificación	Frecuencia
Gastritis no-atrófica crónica activa	12.1% (n=9)
Gastritis no-atrófica crónica no activa	60.8% (n=45)
Gastritis atrófica multifocal	21.62% (n=16)
Metaplasia intestinal	5.4% (n=4)
Displasia gástrica	0% (n=0)
Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal	0% (n=0)

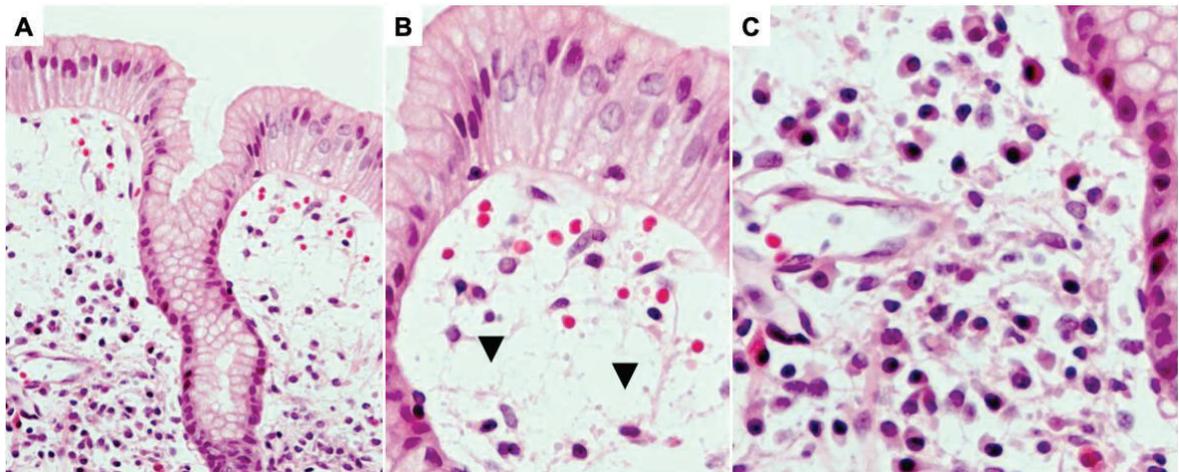
\*n=74

El análisis histopatológico determinó la presencia de lesiones altamente sugerentes de infección por bacterias del género *Helicobacter* en los casos analizados, destacando la vacuolización del epitelio gástrico (Figura 8) así como el infiltrado

inflamatorio compuesto por linfocitos y células plasmáticas que indican un proceso inflamatorio crónico (Figuras 8 y 9).



**Figura 8. Cambios histológicos en el epitelio gástrico.** A) Fotomicrografía de sección histológica de estómago. B) Multifocalmente se observan abundantes espacios anfílicos circulares en la superficie epitelial, correspondientes a vacuolización (flechas negras). C) En la capa submucosa del tejido se aprecian zonas extensas de eritrocitos fuera de su lecho vascular (hemorragias) (asteriscos). Tinción de H&E, observada a 40X.



**Figura 9. Proceso inflamatorio crónico en sección gástrica humana.** A) Fotomicrografía de sección histológica de estómago. B) De manera difusa se observan abundantes espacios anfílicos en la submucosa, correspondientes con edema (puntas de flecha). C) Nótese el abundante infiltrado inflamatorio, compuesto principalmente por linfocitos y células plasmáticas. Tinción de H&E, observada a 40X.

En el caso de la población animal, el hallazgo más prevalente fue el infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y células plasmáticas, observado en el 48.7% de las muestras, seguido por la hiperplasia del tejido linfoide asociado a la mucosa

gástrica en un 31.4% y el edema en la submucosa en 10% de las muestras (Figura 10) (Tabla 13).

La clasificación de estas lesiones nos indica que la principal patología que cursaba la población animal del presente estudio fue la gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides en un 15.7%, seguida de la gastritis crónica activa con 14.2%, la gastritis crónica no activa en el 10% y finalmente la gastritis crónica no activa con presencia de folículos linfoides con el 8.5% (Tabla 14).

Los diagnósticos descriptivos histopatológicos así como su clasificación se encuentran en el anexo 7.

**Tabla 13.** Hallazgos histopatológicos presentes en las secciones histológicas de fragmentos de tejido gástrico de cerdos.

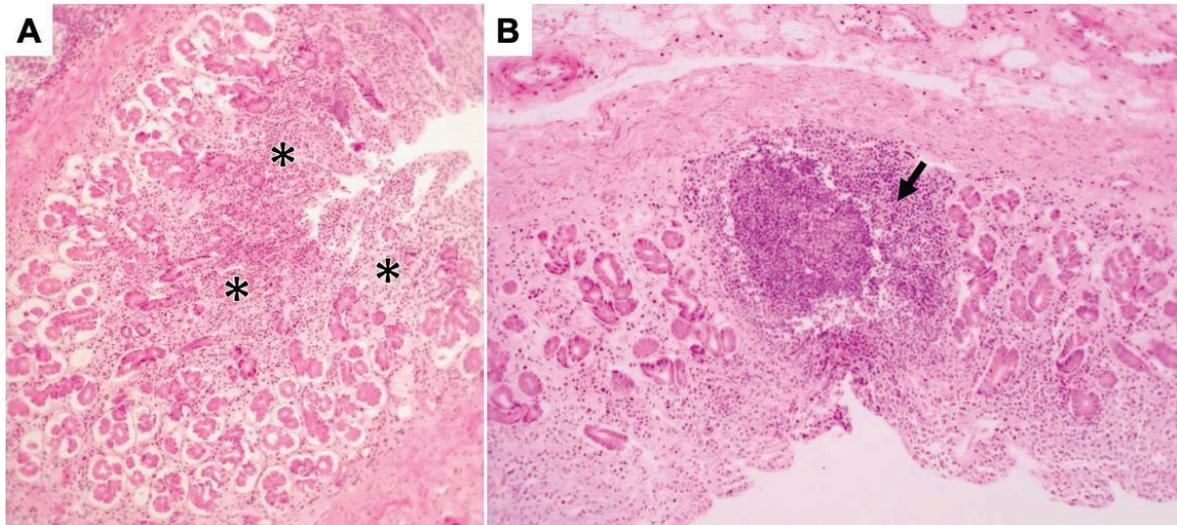
Hallazgo histopatológico	Frecuencia
Sin cambios patológicos aparentes	48.5% (n=34)
Infiltrado linfoplasmocítico	48.5% (n=34)
Edema en la submucosa	10% (n=7)
Hiperplasia del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica	31.4% (n=22)

\*n=70

**Tabla 14.** Clasificación de las lesiones histopatológicas en las secciones de estómago de cerdos.

Clasificación	Frecuencia
Mucosa gástrica normal	51.4% (n=36)
Gastritis crónica activa	14.2% (n=10)
Gastritis crónica no activa	10% (n=7)
Gastritis crónica no activa con presencia de folículos linfoides	8.5% (n=6)
Gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides	15.7% (n=11)

\*n=70

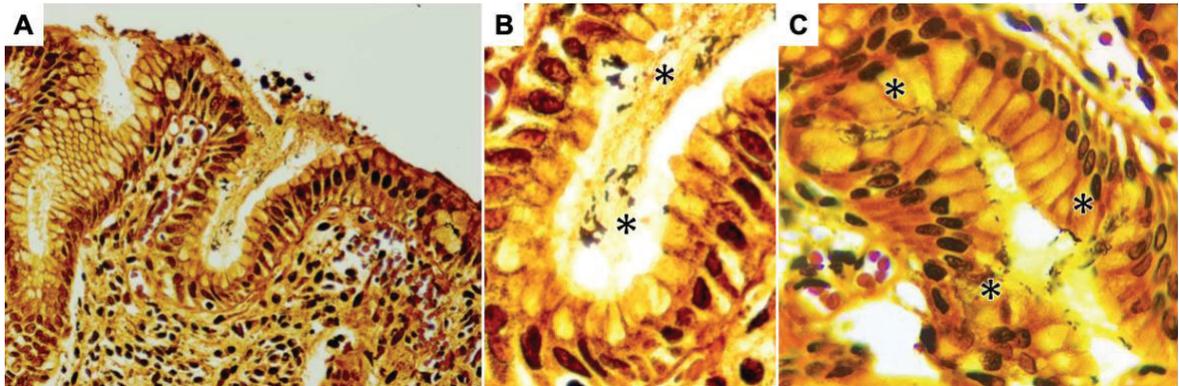


**Figura 10. Proceso inflamatorio crónico en secciones gástricas de cerdo.** A) Fotomicrografía de sección histológica de estómago. Nótese el abundante infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y células plasmáticas en la mucosa (asteriscos). B) Fotomicrografía de sección histológica de estómago. Obsérvese un área hiper celular, bien delimitada conformada por aumento en el número de células que conforman el tejido linfoide asociado a mucosas (hiperplasia de tejido linfoide asociado a mucosas) (flecha negra). Tinción de H&E, observada a 40X.

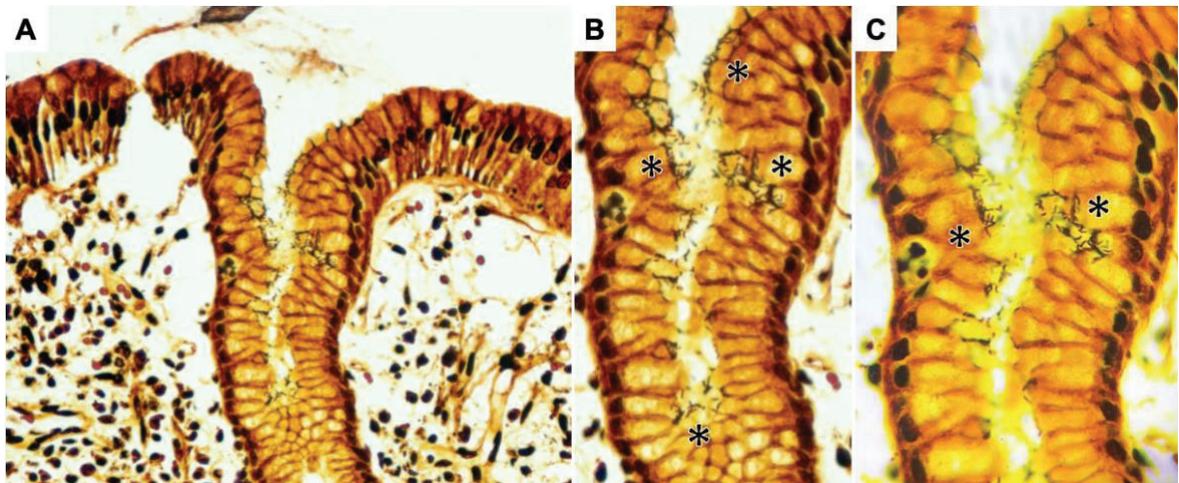
El análisis histopatológico de los fragmentos de tejido gástrico proveniente de cerdos determinó la presencia de alteraciones inflamatorias inespecíficas que podrían estar asociadas a cuadros infecciosos crónicos.

### **9.3 Tinciones especiales de impregnación argéntica (Warthin-Starry)**

Con el fin de evidenciar las estructuras bacterianas en las secciones histológicas de tejido se realizó la tinción especial de impregnación argéntica de Warthin-Starry a las 37 biopsias gástricas de pacientes humanos y a las 35 muestras de tejido gástrico provenientes de cerdo para evaluar la presencia de bacterias helicoidales compatibles con *Helicobacter* (HLOS, del inglés *Helicobacter-like organisms*). Los resultados indicaron que un 18.9% de las secciones histológicas pertenecientes a pacientes humanos presentan bacterias helicoidales (HLOS) (Figuras 11 y 12), mientras que no se encontraron bacterias helicoidales en el epitelio gástrico de los cerdos del presente estudio. La categorización de acuerdo a la positividad se encuentra descrita en los anexos 8 y 9.



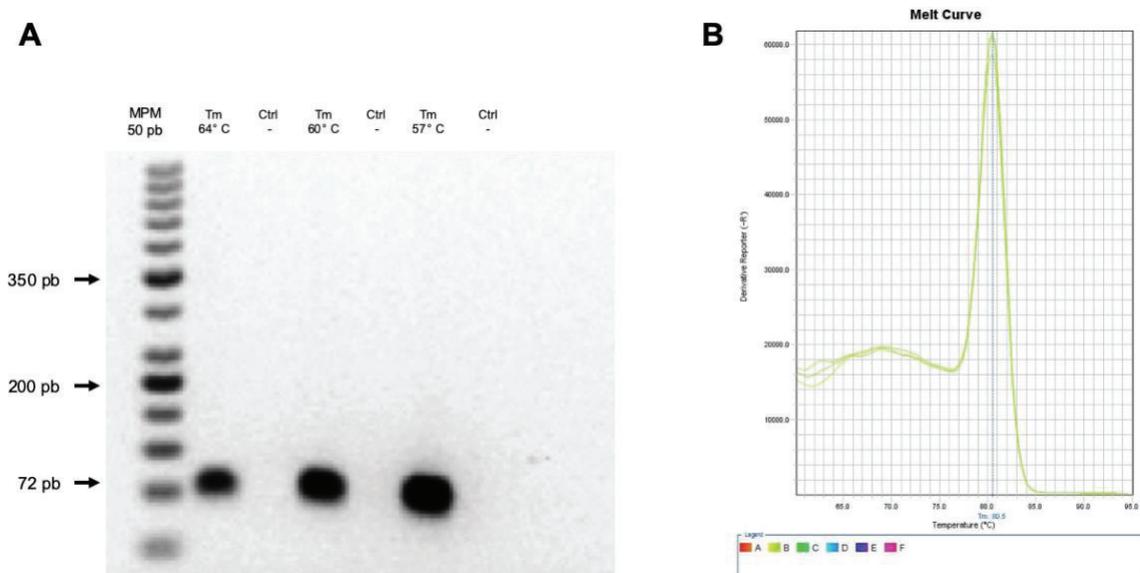
**Figura 11. Detección de bacilos mediante la tinción Warthin-Starry** A) Fotomicrografía de sección histológica de estómago. B) Magnificación de A, se observan abundantes microorganismos consistentes con *Helicobacter* (HLOS) Warthin Starry positivas inmersas en la capa de moco que cubre el epitelio gástrico (asteriscos). C) Fotomicrografía de sección histológica de estómago. Se aprecian múltiples bacilos helicoidales, Warthin Starry positivos en la capa de moco que cubre la parte apical del epitelio gástrico (asteriscos). Tinción Warthin-Starry, observada a 40X y 100X respectivamente.



**Figura 12. Detección de bacilos mediante la tinción Warthin-Starry** A) Fotomicrografía de sección histológica de estómago. B) Magnificación de A, Se aprecian abundantes estructuras bacterianas que corresponden a bacilos helicoidales Warthin Starry positivos (HLOS) que se encuentran en el borde apical del epitelio gástrico (asteriscos). C) Fotomicrografías de sección histológica de estómago. Se observa que dichas estructuras se encuentran dentro de las glándulas epiteliales gástricas y en el borde vasculogénico de las células epiteliales (asteriscos). Tinción Warthin-Starry, observada a 40X y 100X respectivamente.

## 9.4 Detección molecular de *Helicobacter*

Se realizó la amplificación de secuencias mediante qPCR a las 74 biopsias de pacientes humanos y 70 muestras de tejido gástrico de cerdo, utilizando los pares de *primers* previamente enlistados en la tabla 6 con las condiciones descritas en la tabla 9. Primeramente se llevó a cabo la estandarización de las condiciones para la amplificación por cada par de *primers*, encontrando que las condiciones descritas en la tabla 5 fueron las óptimas para cada uno (Figura 13).

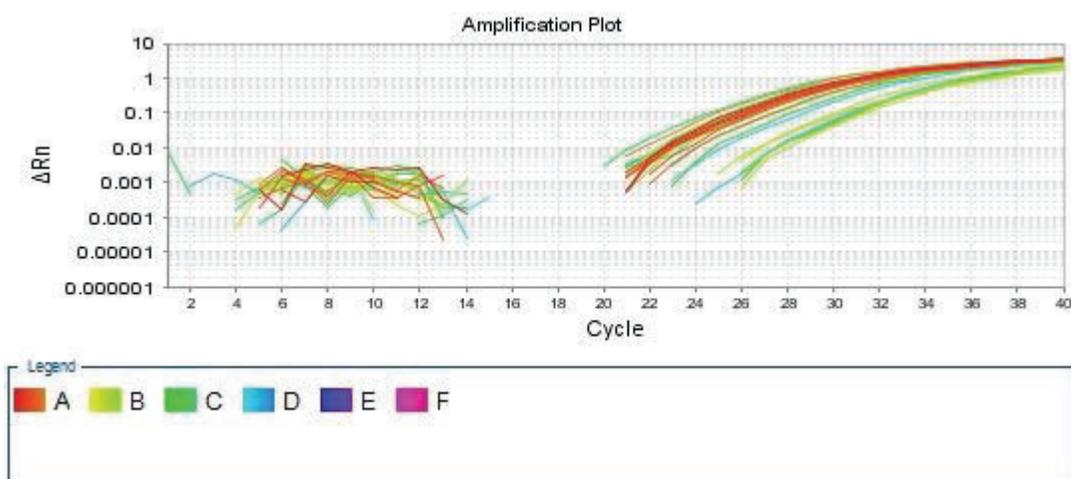


**Figura 13. Figuras representativas del proceso de estandarización de *primers*** A) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de PCR punto final para la detección del gen 16S de *Helicobacter* sp. a distintas temperaturas de alineamiento, empleando como control positivo DNA extraído de la cepa 26695 de *H. pylori*, obteniendo fragmentos del tamaño esperado. B) Curva *Melt* producto de la estandarización de condiciones para la detección del gen 16S de *Helicobacter* sp. mediante qPCR, donde se descarta la existencia de productos inespecíficos de la reacción, se empleó DNA extraído de la cepa 26695 de *H. pylori* para llevar a cabo esta estandarización.

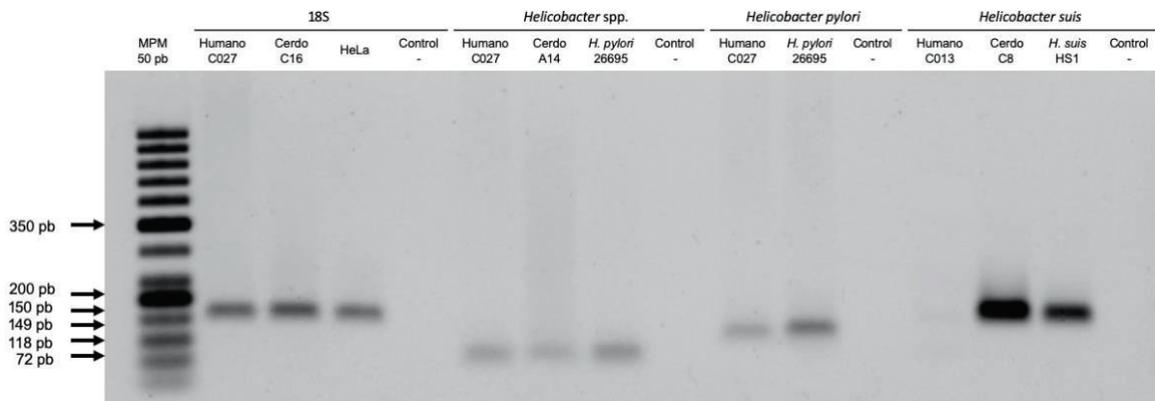
A continuación se determinó la calidad de los ácidos nucleicos obtenidos de las biopsias gástricas y fragmentos de tejido mediante la amplificación del gen 18S ribosomal. Se encontró que en su totalidad las muestras obtuvieron productos de amplificación de este gen (Anexos 10 y 11) determinando que las muestras poseían

calidad analítica, por lo que se procedió a evaluar la presencia de *Helicobacter*. Se procedió a detectar la presencia de DNA perteneciente a bacterias del género *Helicobacter* tanto en ambas poblaciones de estudio, estando presente en el 94.59% de los pacientes humanos y en el 100% de los cerdos muestreados (Tablas 15 y 16, figuras 14 y 15, anexos 12 y 13) posteriormente se determinó la presencia de *H. pylori* y *H. suis* en estas muestras.

El DNA de *H. pylori* fue encontrado en el 45.71% de los pacientes humanos, mientras que no fue detectado en las muestras procedentes de cerdos (Tablas 15 y 16, figura 15, anexos 14 y 15). En cuanto al DNA de *H. suis*, este fue detectado en el 68.5% de los cerdos de este estudio, así como en 8.82% de los humanos incluidos (Tabla 15 y 16, figura 15, anexos 16 y 17), de los cuales dos de ellos también se encontraban infectados con *H. pylori*.



**Figura 14. Gráfico de amplificación de reacción de qPCR.** Imagen representativa de los gráficos de amplificación de las muestras positivas a las reacciones de qPCR del presente estudio.



**Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación de qPCR.** Imagen representativa de muestras positivas de ambas poblaciones de estudio a las reacciones de qPCR para cada par de *primers*, donde se observan productos de amplificación del tamaño esperado para la detección del gen de la subunidad 18S (integridad génica), de la subunidad 16S de *Helicobacter sp.* (género), de la subunidad 16S de *H. pylori* y del gen de *UreA* de *H. suis* con fragmentos de 149 pares de bases, 72 pares de bases, 118 pares de bases y 150 pares de bases respectivamente.

**Tabla 15.** Prevalencia de *Helicobacter sp.*, *H. pylori* y *H. suis* en pacientes con Enfermedad Gastrointestinal.

Especies	Número de casos	Prevalencia general	Prevalencia en antro gástrico	Prevalencia en cuerpo gástrico
<i>Helicobacter sp.</i>	35	97.29%	94.59%	91.89%
<i>H. pylori</i>	16	43.24%	40.54%	43.24%
<i>H. suis</i>	3	8.10%	2.70%	5.40%

\*n=37

**Tabla 16.** Prevalencia de *Helicobacter sp.*, *H. pylori* y *H. suis* en cerdos.

Especies	Número de casos	Prevalencia general	Prevalencia en antro gástrico	Prevalencia en cuerpo gástrico
<i>Helicobacter sp.</i>	35	100%	97.14%	48.57%
<i>H. pylori</i>	0	0%	0%	0%
<i>H. suis</i>	24	68.57%	45.71%	57.14%

\*n=35

## 9.5 Resultados de asociación entre la infección y la presencia de lesiones histológicas

Se determinó la asociación entre la presencia de la infección por *Helicobacter* obtenida por la detección molecular mediante qPCR y el desarrollo de lesiones histológicas en el estómago de pacientes con Enfermedad Gastrointestinal y de cerdos sacrificados para consumo clasificadas mediante el estudio histopatológico (Tabla 17), donde se encontró una asociación entre la infección por *Helicobacter spp.* y la presencia de lesiones histopatológicas en la población animal ( $p = 0.047$ ), mientras que no se encontró asociación estadísticamente significativa en el resto de grupos analizados.

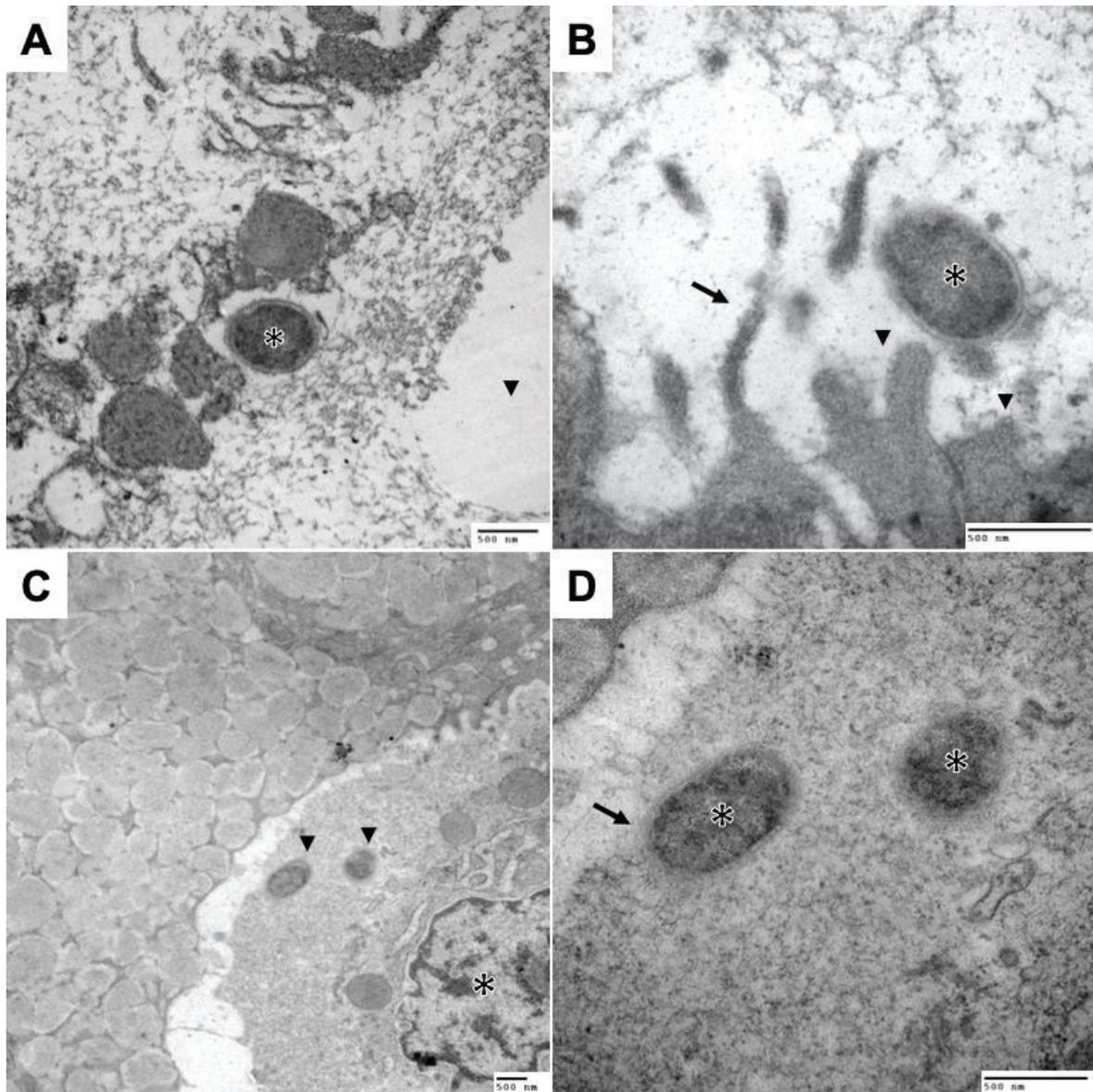
**Tabla 17.** Resultados de asociación entre la infección y la presencia de lesiones histológicas.

Asociación de la presencia de la infección por <i>Helicobacter</i> y el desarrollo de patologías gástricas	Valor de $p$
Infección por <i>Helicobacter spp.</i> y presencia de lesiones histopatológicas en humanos	1.000
Infección por <i>H. pylori</i> y presencia de lesiones histopatológicas en humanos	0.795
Infección por <i>H. suis</i> y presencia de lesiones histopatológicas en humanos	0.558
Infección por <i>Helicobacter spp.</i> y presencia de lesiones histopatológicas en cerdos	<b>0.047</b>
Infección por <i>H. suis</i> y presencia de lesiones histopatológicas en humanos	0.089

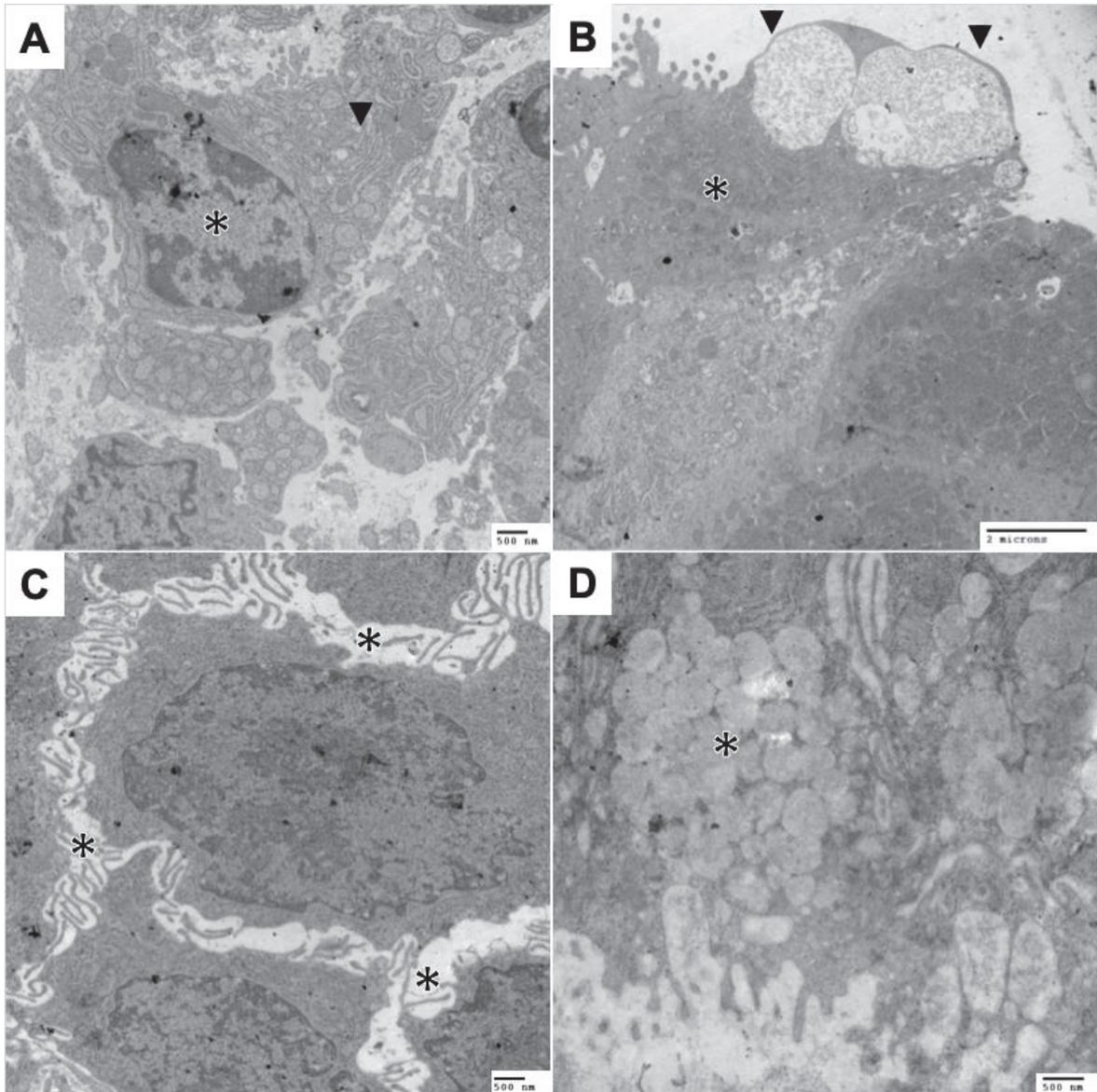
## **9.6 Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión.**

Se llevó a cabo el estudio de microscopía electrónica de transmisión a 4 muestras de pacientes humanos previamente identificadas como positivas a la infección por *Helicobacter* para la evaluación ultraestructural tisular de los mismos. Dichas muestras fueron procesadas con la técnica descrita por Vázquez *et al.*, (2000)

Los hallazgos ultraestructurales de mayor relevancia obtenidos a través del estudio de microscopía electrónica de transmisión, fue la identificación de estructuras bacterianas, cuya morfología coinciden con *H. pylori*; estas bacterias se localizaban en el borde apical de las células epiteliales, donde se pudo apreciar que esta interacción produce la atrofia de las microvellosidades de dichas células (Figura 16). Asimismo, se observaron abundantes células inflamatorias que se encontraban infiltrando la mucosa gástrica, principalmente células plasmáticas y fagocitos, en estos últimos se pudieron observar estructuras bacterianas inmersas en su citoplasma o formando pedestales en su membrana citoplasmática (Figuras 16 y 17). Adicionalmente se encontraron otras alteraciones tisulares ultraestructurales como la presencia de vacuolas en el citoplasma de las células epiteliales, células caliciformes intercaladas entre las células foveolares, secciones de tejido en los cuales se apreciaba la pérdida de las uniones estrechas, así como abundante edema (Figura 17).



**Figura 16. Interacción ultraestructural de *H. pylori* con el hospedero.** Fotomicrografías electrónicas de transmisión de estómago perteneciente a pacientes infectados con *H. pylori*. A) *H. pylori* (asterisco) en la luz del estómago (punta de flecha). Barra: 500 nm. B) *H. pylori* (asterisco) en el borde apical de una célula epitelial gástrica, en la cual se puede observar las microvellosidades acortadas (atrofia) (puntas de flechas) en comparación a las microvellosidades adyacentes que no están en contacto con el patógeno (flecha negra). Barra: 500 nm. C) *H. pylori* (puntas de flecha) dentro del citoplasma de un macrófago (asterisco). Barra: 500 nm. D) Magnificación de C. Formación de pedestal por *H. pylori* en la membrana citoplasmática de un macrófago (flecha negra), *H. pylori* dentro del citoplasma de un macrófago (asterisco). Barra: 500 nm. Técnica de contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo.



**Figura 17. Alteraciones ultraestructurales presentes en la mucosa gástrica de pacientes infectados con *H. pylori*.** Fotomicrografías electrónicas de transmisión de estómago perteneciente a pacientes infectados con *H. pylori*. A) Célula plasmática en el infiltrado inflamatorio presente en la mucosa gástrica (asterisco), Nótese el abundante retículo endoplásmico rugoso (punta de flecha). Barra: 500 nm. B) Vacuolas irregulares con contenido electrolúcido (punta de flecha) en el citoplasma de una célula epitelial gástrica (asterisco). Barra: 2 micrones. C) Pérdida de las uniones estrechas entre las células epiteliales gástricas, los espacios resultantes contienen material electrolúcido (edema) (asteriscos). Barra: 500 nm. D) Célula caliciforme intercalada entre las células foveolares del epitelio gástrico (asterisco). Barra 500 nm. Técnica de contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo.

## 10. Discusión

La infección por *H. pylori* es causal de trastornos inflamatorios como la úlcera péptica y se conoce la asociación directa de su principal factor de virulencia, la oncoproteína CagA y otros factores de virulencia con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal y linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica. La distribución cosmopolita de este patógeno y las altas prevalencias de esta infección en países en vías de desarrollo la convierten en un problema de salud pública (Haesebrouck *et al.* 2009; Flahou *et al.*, 2018; Hooi *et al.*, 2017). En contraste, el estudio de las especies de helicobacterias no-*Helicobacter pylori* no ha sido tan detallado, por lo que aún no se conocen por completo los mecanismos por los cuales este grupo de bacterias causan patologías en sus hospederos, así como el potencial que tienen para producir zoonosis (Haesebrouck *et al.* 2009).

Hasta la fecha se conoce que 5 especies del género *Helicobacter* que habitan el estómago infectan a los humanos, sin embargo, diversos estudios filogenéticos han descubierto un gran número de especies que poseen una relación evolutiva sumamente estrecha con *H. pylori* como son *Helicobacter acinonychis*, considerada su pariente más cercano y *Helicobacter cetorum*, las cuales infectan a grandes felinos y mamíferos marinos respectivamente (Tegtmeyer *et al.*, 2013; Kersulyte *et al.*, 2013). Así mismo, recientes descubrimientos de especies como *H. baculiformis* aislada de la mucosa gástrica de un gato doméstico, la cual posee una similaridad del 98 a 99% con *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* y *H. heilmannii*, conocidos patógenos zoonóticos de los perros y gatos y *H. cynogastricus* aislada de la mucosa gástrica de un perro doméstico, cuyos análisis de secuenciación muestran similitud mayor del 97% a *H. felis*, *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* (Van den Bulck *et al.*, 2006; Baele *et al.*, 2008) amplía el repertorio de especies en diferentes huéspedes. A pesar de que la infección producida por estas especies no ha sido detectada en el humano, su relación filogenética así como la similitud que estas poseen con patógenos conocidos, permite plantear el panorama de posibles enfermedades

zoonóticas emergentes producidas por bacterias de este género, ya que el cambio en la dinámica poblacional así como sus hábitos provocan interacciones cercanas con distintos animales, lo cual puede generar una brecha para la transmisión de diversas enfermedades.

El presente estudio se enfocó en determinar la prevalencia de *H. pylori*, *H. suis* y especies de helicobacterias no-*Helicobacter pylori* en población mexicana que posee factores de riesgo para adquirir estas infecciones, así como estudiar y clasificar las lesiones histopatológicas presentes en estos casos y evaluar las alteraciones ultraestructurales de la infección con el hospedero.

A través del estudio histopatológico de las biopsias gástricas provenientes de pacientes con enfermedad gastrointestinal se pudo determinar la presencia de diversos trastornos inflamatorios como gastritis no-atrónica crónica no activa (60.8%), gastritis atrófica multifocal (21.6%), gastritis no-atrónica crónica activa (12.1%) y metaplasia intestinal (5.4%). A pesar de descartar la presencia de displasia gástrica y neoplasias como el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, es importante resaltar que en su totalidad la población de estudio presenta lesiones que son componentes de la cascada de Correa y Houghton, la cual describe el desarrollo histopatológico del cáncer gástrico producido por la infección de *H. pylori* (Correa & Houghton, 2007). Con lo anterior podemos concluir que dichos pacientes poseen lesiones histológicas que preceden al desarrollo de cáncer gástrico conforme se adquiera cronicidad.

Mediante el estudio histopatológico de los fragmentos de tejido gástrico provenientes de cerdos, se determinó la existencia de alteraciones inflamatorias como gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides (15.7%), gastritis crónica activa (14.2%), gastritis crónica no activa (10%) y gastritis crónica no activa con presencia de folículos linfoides (8.5%) los cuales son trastornos inflamatorios crónicos sugerentes a procesos infecciosos, los cuales coinciden con los estudios previos realizados en Brasil por Mendes, *et al.* y en Corea del Sur por

Park, *et al.* (Mendes *et al.*, 1991; Park *et al.*, 2000). Sin embargo, es importante considerar que estas lesiones son cuadros inespecíficos que pueden ser resultado de diversas etiologías, siendo las más comunes las de origen dietario, donde partículas pequeñas de alimento, la interrupción del consumo y la presencia de carbohidratos altamente fermentables en la dieta promueven gastritis y la formación de úlceras (Ayles *et al.*, 1996), así como las enfermedades de origen infeccioso como el síndrome de emaciación multisistémica posterior al destete, producido por la infección con el Circovirus porcino tipo 2, las parasitosis producidas por *Gnathostoma hispidum*, *Hyostromylus rubidus*, *Mecistocirrus digitatus* y *Trichostrongylus axei* y el posible efecto inflamatorio producido por *Fussobacterium gastrosuis*, bacteria de la microbiota gástrica de los cerdos, la cual tras una infección previa con *H. suis* aumenta su colonización y puede provocar la muerte de las células epiteliales gástricas (Saikumar & Das., 2019; De Witte, *et al.*, 2019).

La alta frecuencia de fragmentos de tejido gástrico de cerdo sin cambios patológicos aparentes observados en el presente estudio se puede asociar a que, a diferencia de algunos mamíferos como el humano, los cerdos domésticos poseen una porción bien delimitada que carece de epitelio glandular en el estómago, siendo en esta región donde frecuentemente se observan las alteraciones macroscópicas producidas por la infección por *H. suis*, principalmente la ulceración de la *pars esophagea*, por lo que es importante coleccionar fragmentos de tejido de dicha región para obtener una evaluación completa (Haesebrouck *et al.* 2009).

Aunque la patogenia de la úlcera gástrica en cerdos sigue sin estar clara, se ha sugerido que las lesiones gástricas en el estómago no glandular en los cerdos pueden estar relacionadas con la presencia de *H. suis* en el estómago glandular, sin embargo diversos autores no han encontrado asociación entre la infección y el desarrollo de lesiones gástricas. Estas discrepancias pueden conllevar a diferencias en las técnicas de laboratorio empleadas para la detección de *H. suis* así como las distintas prácticas en el muestreo, que finalmente impactan en los resultados obtenidos (Harper *et al.* 2002; Haesebrouck *et al.* 2009).

A pesar de que es posible identificar los microorganismos semejantes a *Helicobacter* en las secciones de tejido teñidas con H&E a grandes magnificaciones, debido a las características de las biopsias incisionales obtenidas mediante endoscopía, aunadas a la baja densidad bacteriana no fue posible evaluar la presencia de dichos microorganismos en estas secciones (Lee *et al.*, 2015). En este sentido, el análisis histopatológico para la detección de *Helicobacter spp.* debe ser apoyada con el uso de tinciones especiales, ya que las bacterias pueden encontrarse fragmentadas o pueden encontrarse en forma cocoide debido al tratamiento de los pacientes. Las tinciones tipo Romawsky como la tinción de Giemsa y las tinciones de impregnación argéntica como la tinción de Warthin-Starry son las empleadas para la detección de estos microorganismos. Vásconez y Lozada refieren en su estudio la detección del 60% de las muestras positivas mediante la tinción de Giemsa y el 100% mediante la tinción de Warthin-Starry (Vásconez y Lozada 2017). La tinción de Warthin-Starry es la predominante en el diagnóstico clínico y experimental, a pesar de esto, en comparación con pruebas histológicas específicas como la inmunohistoquímica, la sensibilidad de esta tinción es del 50% (Farouk *et al.* 2018).

En esta cohorte de estudio, empleando la tinción de Warthin-Starry la presencia de microorganismos parecidos a *Helicobacter* (HLOS) se detectó únicamente en 12 secciones histológicas (16.2%) de las biopsias gástricas de pacientes con enfermedad gastrointestinal, mientras que no se detectó ninguna muestra positiva perteneciente a la población animal. Esto puede estar relacionado a las características anatómicas de los sitios incluidos, su estado de conservación, la baja carga bacteriana y la sensibilidad de la tinción (Lee *et al.*, 2015; Vásconez y Lozada 2017).

En contraste a las técnicas de detección basadas en tinciones histológicas, las pruebas de detección molecular poseen una mayor sensibilidad y especificidad, por

lo que es importante complementar los diagnósticos histopatológicos con pruebas complementarias confirmatorias.

Para la detección molecular de estos patógenos se optó por el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), ya que a diferencia de la Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final, posee mayor sensibilidad y especificidad, siendo la opción adecuada dada la cantidad de DNA obtenido en cada biopsia (Loayza *et al.* 2017; Wongphutorn *et al.* 2018).

La amplificación del gen 16S ribosomal de *Helicobacter* puede utilizarse para confirmar la detección de esta bacteria, sin embargo, la detección de *H. suis* es compleja, dada la carencia de *primers* específicos debido a su variabilidad génica, por lo cual comúnmente los *primers* diseñados tienden a perder especificidad, pudiendo obtener productos de amplificación en presencia del DNA de otras bacterias pertenecientes a este género o por el contrario, únicamente detectar regiones conservadas en algunas cepas en específico. Dado lo anterior, se implementó el uso de *primers* con un grado de degeneración 2X, diseñados específicamente para la región que codifica a UreA de *H. suis*, sin embargo es importante destacar que dichos *primers* no detectan en su totalidad a las cepas de *H. suis*, por lo que se recomienda el uso de técnicas más sensibles como el uso de sondas específicas en la reacción de qPCR, la detección de múltiples genes de interés o la secuenciación de las muestras positivas (Loayza *et al.* 2017; Blaecher *et al.* 2017).

Los resultados en la detección de *Helicobacter spp.* en las biopsias gástricas de pacientes humanos mostraron una prevalencia general de 97.2%, una prevalencia de 94.5% en antro gástrico y 91.8% en cuerpo gástrico, mientras que la detección de *H. pylori* determinó la prevalencia general de 43.2%, una prevalencia de 40.5% en antro gástrico y 43.2% en cuerpo gástrico. Esta prevalencia fue menor a la reportada por Torres *et al.* en 1998 donde se determinó que el 66% de la población mexicana resultó positiva empleando la detección de anticuerpos mediante ELISA

así como lo reportado en el estudio realizado por Bosques-Padilla en 2003 en el cual se determinó una prevalencia de 67.8% mediante estudios serológicos (Torres *et al.*, 1998; Bosques-Padilla *et al.* 2003). Finalmente, la detección de *H. suis* mostró una prevalencia general de 8.1%, una prevalencia de 2.7% en antro gástrico y de 5.4% en cuerpo gástrico, la cual es mayor que la detectada por Bahadori *et al.* en 2018, donde encontró una prevalencia de 1.8% en niños con alteraciones gástricas procedentes de Turquía (Bahadori *et al.*, 2018). Además se confirmó la presencia de dos pacientes con presencia de co-infección *H. pylori* – *H. suis* en esta cohorte. Con base a la detección de *H. suis* en la cohorte de estudio, se confirma el potencial zoonótico de esta bacteria en poblaciones que presentan factores de riesgo tales como el contacto directo con la producción de cerdos y la ingesta de carne contaminada.

Por otra parte, la detección de *Helicobacter spp.* en los fragmentos de tejido gástrico de cerdos mostraron una prevalencia general de 100%, una prevalencia de 97.1% en antro gástrico y de 48.5% en cuerpo gástrico, para la detección de *H. pylori* se determinó una prevalencia general de 0%, mientras que la detección de *H. suis* mostró una prevalencia general de 68.5%, una prevalencia de 45.7% en antro gástrico y de 57.1% en cuerpo gástrico. Los resultados de prevalencia coinciden con los descritos en la literatura, donde de manera general se conoce que *H. suis* coloniza más del 60% de los cerdos al momento del sacrificio (Haesebrouck *et al.* 2009), encontrando una mayor prevalencia que la encontrada mediante histopatología por Mendes *et al.* en 1991 en Brasil, de Grasso *et al.* en 1996 en Italia y Park *et al.* en 2000, que encontraron prevalencias de 10.8%, 12.9% y 8% respectivamente, mientras que resultó menor a lo descrito por Hellemans *et al.* en Bélgica, donde mediante PCR, se encontró que el 90% de los cerdos adultos se encontraban infectados (Mendes *et al.*, 1991; Grasso *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2000; Hellemans *et al.*, 2007). Existe la posibilidad de que el resto de casos positivos a la identificación de *Helicobacter spp.* que fueron negativos a la detección de *H. suis* pudieran estar infectados por cepas de *H. suis* distintas de las que fueron

empleadas para el diseño de los *primers* utilizados en el presente estudio, por lo que no se descarta una mayor prevalencia.

Adicionalmente, se encontró que la infección por *Helicobacter spp.* se encuentra asociada al desarrollo de lesiones histopatológicas en cerdos ( $p = 0.047$ ), por lo que es importante considerar esta infección en las producciones porcinas, ya que puede generar efectos negativos en la crianza (Haesebrouck *et al.* 2009; De Witte *et al.* 2018; De Witte *et al.* 2019).

Es importante destacar la alta prevalencia de la infección por *Helicobacter spp.* y *H. suis* en los cerdos sacrificados para consumo, ya que la carne obtenida de estos animales puede encontrarse contaminada por este patógeno, siendo la principal vía de contagio para esta infección.

Mediante el estudio ultraestructural llevado a cabo por microscopía electrónica de transmisión se pudieron observar con mayor detalle las alteraciones histológicas producidas por la infección por *H. pylori*, correlacionando los efectos citopáticos de esta bacteria, como la atrofia de las microvellosidades de las células epiteliales que se encuentran en contacto con el patógeno, la vacuolización de las células epiteliales gástricas, un cambio citopático producido por VacA, la cual después de su ensamble en la membrana citoplasmática de las células epiteliales forma un canal selectivo de aniones, provocando un gradiente de pH que atrae sustancias alcalinas al interior de la célula haciendo que se capten moléculas de agua por ósmosis generando vacuolas, la pérdida de uniones estrechas intercelulares, efecto producido por la interacción de CagA con distintas vías de señalización celulares como la de E-cadherina,  $\beta$ -catenina y Zonula Occludens 1 (Torres y Torres 2021; Serrano *et al.*, 2004), la presencia de células caliciformes que se encuentran intercaladas entre las células foveolares, una lesión característica de la metaplasia intestinal y un abundante infiltrado inflamatorio, en los casos analizados principalmente compuesto por linfocitos, células plasmáticas y en menor medida macrófagos, en cuyo citoplasma se apreció estructuras bacterianas así como en la

membrana citoplasmática, donde se encontraron formando pedestales, otro de los cambios ultraestructurales reportados previamente en esta infección (Bai *et al.*, 2009).

No se observaron estructuras bacterianas de morfología helicoidal, lo cual se puede atribuir a la orientación del tejido, obteniendo cortes transversales del patógeno o a la capacidad que posee el patógeno de diferenciarse a un estado viable pero no cultivable (VNC, *Viable but Non Culturable* por sus siglas en inglés), en donde las bacterias disminuyen su tamaño y cambian de forma convirtiéndose en cuerpos esféricos en un entorno empobrecido para su crecimiento y supervivencia (Sarem y Corti 2015).

Se conocen 3 formas de *H. pylori*, la forma bacilar viable y cultivable, considerada la más virulenta, la forma cocoide VNC, menos virulenta que la primera y la forma degenerativa no viable, además de las formas intermedias en “V” y en “U”. Previos análisis de microscopía electrónica de pacientes infectados se ha observado la coexistencia de ambas formas. Se ha demostrado que en condiciones desfavorables para el desarrollo bacteriano como la aerobiosis, pH alcalino, temperatura alta, incubación extendida, incubación prolongada en agua y en tratamiento con inhibidores de la bomba de protones y antibióticos, el fenotipo cocoide predomina (Sarem y Corti 2015). Cabe destacar que las formas cocoides tienen un papel importante en la recrudescencia, un tipo de recurrencia de la infección por *H. pylori* que consiste en la recurrencia causada por una cepa bacteriana idéntica genéticamente a la aislada previamente a la erradicación (Sarem y Corti 2015).

Los pacientes que fueron incluidos en la cohorte de estudio poseían diagnósticos previos de alteraciones gastrointestinales, los cuales son tratados empíricamente con base a los signos antes de realizar endoscopia digestiva superior, por lo que cabe la posibilidad de la generación de las formas VNC de *H. pylori*.

Por otra parte, la presencia de estructuras bacterianas inmersas en el citoplasma de los macrófagos podría deberse a la acción de VacA sobre estas células, ya que a pesar de que la exposición aguda de este patógeno estimula la vía de la autofagia, tras la exposición prolongada, interrumpe el tráfico lisosomal, lo que resulta en la acumulación de autofagosomas disfuncionales que carecen de catepsina D, lo que promueve la supervivencia intracelular de *H. pylori* (Abdullah *et al.* 2018).

Para tener un enfoque completo de estas interacciones es importante llevar a cabo el estudio a profundidad de los factores de virulencia de las especies de helicobacterias no-*Helicobacter pylori*, para de esta manera relacionar las alteraciones histopatológicas y ultraestructurales en sus hospederos.

## **11. Conclusiones**

Existe una alta prevalencia de la infección por *Helicobacter spp.* y *H. pylori* en los pacientes con enfermedad gastrointestinal de Puerto Escondido, Oaxaca, así como una alta prevalencia de *Helicobacter spp.* en los cerdos sacrificados para consumo en rastros municipales del mismo sitio, infección que se encuentra asociada al desarrollo de lesiones histopatológicas en estos animales.

La alta prevalencia de la infección por *H. suis* en los cerdos sacrificados para consumo y la prevalencia encontrada en los pacientes con enfermedad gastrointestinal establece el posible origen de la infección en estos últimos y se confirma de esta manera el reservorio de este patógeno zoonótico en esta región. Las lesiones ultraestructurales encontradas en pacientes con la infección de *H. pylori* en conjunto al conocimiento de los factores de virulencia y su efecto en el tejido nos ayudan a comprender la patogenia de las lesiones histológicas.

La sensibilidad de las tinciones histológicas varía de acuerdo con las características de las biopsias, por lo que se recomienda ampliamente el uso de técnicas moleculares específicas, que en conjunto ofrecen un diagnóstico integral preciso de esta infección.

## 12. Referencias

1. Abdo-Francis JM, L Uscanga, S Sobrino-Cossio, JF Rivera-Ramos, F Huertalga, JL Tamayo de la Cuesta. 2007. III Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. In: *Revista de Gastroenterología de México*. Vol 72. :323-338.
2. Abdullah, M., Greenfield, L. K., Bronte-Tinkew, D., Capurro, M. I., Rizzuti, D., & Jones, N. L. (2019). VacA promotes CagA accumulation in gastric epithelial cells during *Helicobacter pylori* infection. *Scientific reports*, 9(1), 38.
3. Adu-Aryee NA, L Aabakken, F Dedey, J Nsafu, W Kudzi. 2016. Comparison of endoscopic based diagnosis with *Helicobacter urease* test for *Helicobacter pylori* infection. *BMC Res Notes*. 9(1):421.
4. Ayles, H. L., R. M. Friendship, and E. O. Ball. 1996. Effect of dietary particle size on gastric ulcers, assessed by endoscopic examination, and relationship between ulcer severity and growth performance of individually fed pigs. *Swine Health Prod*. 4:211–216.
5. Bahadori A, *et al.* 2018 Presence of gastric *Helicobacter* species in children suffering from gastric disorders in Southern Turkey. *Helicobacter* 23(5): 1-6.
6. Baele M, A Decostere, P Vandamme, L Ceelen, A Hellemans, J MAST, K Chiers, R Ducatelle, F Haesebrouck. 2008. Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. nov. from pig stomachs. *Int J Syst Evol Microbiol*. 58(6):1350-1358.
7. Baele, M., Decostere, A., Vandamme, P., Van den Bulck, K., Gruntar, I., Mehle, J., Haesebrouck, F. (2008). *Helicobacter baculiformis* sp. nov., isolated from feline stomach mucosa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(2), 357–364.
8. Biernat M, B Iwańczak, A Bińkowska, J Grabińska, G Gościński. 2016. The Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in Symptomatic Children: A 13-Year Observational Study in the Lower Silesian Region. *Adv Clin Exp Med*. 25(2):303-308.
9. Blaser MJ, JC Atherton. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: Biology and

- disease. *J Clin Invest.* 113(3):321-333.
10. Blaecher C, Bauwens E, Tay A, Peters F, Dobbs S, Dobbs J, Charlett A, Ducatelle R, Haesebrouck F, Smet A. A novel isolation protocol and probe-based RT-PCR for diagnosis of gastric infections with the zoonotic pathogen *Helicobacter suis*. *Helicobacter.* 2017 Jun;22(3). Epub 2016 Dec 28.
  11. Bosques F, *et al.* 2018 IV consenso mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología de México.* 83(3): 325-341.
  12. Bosques-Padilla FJ, Tijerina-Menchaca R, Pérez-Pérez GI, Flores-Gutiérrez JP, Garza-González E. Comparison of *Helicobacter pylori* prevalence in symptomatic patients in northeastern Mexico with the rest of the country: its association with gastrointestinal disease. *Arch Med Res.* 2003 Jan-Feb;34(1):60-3.
  13. Burkitt MD, CA Duckworth, JM Williams, DM Pritchard. 2017. *Helicobacter pylori* -induced gastric pathology : insights from in vivo and ex vivo models. *Co Biol.* 10:89-104.
  14. Camargo M. 2017. Factores genéticos y epigenéticos del cáncer gástrico Genetic and epigenetic factors of gastric cancer. *Actual Biológicas.* 39(106):5-20.
  15. Cervantes-garcía E. 2016. *Helicobacter pylori*: mecanismos de patogenicidad. *Patol Clínica y Med Lab.* 63(2):100-109.
  16. Chisholm SA, RJ Owen. 2003. Development and application of a novel screening PCR assay for direct detection of 'Helicobacter heilmannii'-like organisms in human gastric biopsies in Southeast England. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 46(1):1-7.
  17. Correa P., Houghton J. 2007. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 133: 659 – 672.
  18. De Cooman L. *et al.* 2014. Presence of *Helicobacter suis* on pork carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 187: 73-76.
  19. De la Torre-Bravo. A, W Kettenhofen E, F Roesch D, L Rodríguez M, A Mejía N. 2010. Guía de diagnóstico y tratamiento del cáncer gástrico . Epidemiología , factores historia natural. *Rev Gastroenterol Mex.*

20. De Witte C, B Devriendt, B Flahou, I. Bosschem, R. Ducatelle, A. Smet, F. Haesebrouck. 2017. *Helicobacter suis* induces changes in gastric inflammation and acid secretion markers in pigs of different ages. *Vet Res.* 1-13.
21. De Witte C, Ducatelle R, Haesebrouck F. 2018. The role of infectious agents in the development of porcine gastric ulceration. *Vet. J.* 236: 56-61.
22. De Witte C, Demeyere K, De Bruyckere S, et al. Characterization of the non-glandular gastric region microbiota in *Helicobacter suis*-infected versus non-infected pigs identifies a potential role for *Fusobacterium gastrosum* in gastric ulceration. *Vet Res.* 2019;50(1):39. Published 2019 May 24.
23. Elhariri M, R Elhelw, D Hamza, HS El-Mahallawy. 2017. Serologic evidence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in animals and humans. *J Infect Dev Ctries.* 11(5):414-419.
24. Farouk, W. I., Hassan, N. H., Ismail, T. R., Daud, I. S., & Mohammed, F. (2018). Warthin-Starry Staining for the Detection of *Helicobacter pylori* in Gastric Biopsies. *The Malaysian journal of medical sciences : MJMS*, 25(4), 92–99.
25. Flahou B, Rossi M, Bakker J, et al. 2018. Evidence for a primate origin of zoonotic *Helicobacter suis* colonizing domesticated pigs. *ISME J.* 12(1):77-86.
26. Francis-Megraud, E Bessède, P Lehours. 2014. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter.* 19:6-10.
27. García EC, R García-gonzález. 2015. *Helicobacter pylori* y la respuesta inmune. *Patol Clínica y Med Lab.* 62(2):112-118.
28. Gombač M, et al. 2010. Histological changes in stomachs of apparently healthy dogs infected with *Helicobacter*. *Acta Veterinaria:* 60(2-3): 173-182.
29. Grasso G, et al. 1996. Prevalence of *Helicobacter*-like organisms in porcine gastric mucosa: A study of swine slaughtered in Italy. *Comp. immun. Microbiol. Infect. Dis.:* 19(3): 213-217.
30. Haesebrouck F, F Pasmans, B Flahou, K Chiers, M Baele, T Meyns, A Decostere, R I Ducatelle. 2009. Gastric helicobacters in domestic animals and

- nonhuman primates and their significance for human health. *Clin Microbiol Rev.* 22(2):202-223
31. Hellemans A, Chiers K, De Bock M, Decostere A, Haesebrouck F, Ducatelle R, Maes D. Prevalence of 'Candidatus *Helicobacter suis*' in pigs of different ages. *Vet Rec.* 2007 Aug 11;161(6):189-92.
  32. Harper, C. G., Feng, Y., Xu, S., Taylor, N. S., Kinsel, M., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Greenwell, M., Levine, G., Rogers, A., & Fox, J. G. (2002). *Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales. *Journal of clinical microbiology*, 40(12), 4536–4543.
  33. Hatakeyama M. 2014. *Helicobacter pylori* CagA and Gastric Cancer: A Paradigm for Hit-and-Run Carcinogenesis. *Cell Host Microbe.* 15(3):306-316.
  34. Hellemans A. *et al.*, 2015 Prevalence of “*Candidatus Helicobacter suis*” in pigs of different ages. *Veterinary Record* 161 (6): 189-192.
  35. Hooi JKY, WY Lai, WK Ng, MMY Suen, FE Underwood, D Tanyingoh, P Malfertheiner, DY Graham, VWS Wong, JCY Wu, FKL Chan, JJY Sung, GG Kaplan, SCI Ng. 2017. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology.* 153(2):420-429.
  36. Kersulyte, D., Rossi, M., & Berg, D. E. (2013). Sequence divergence and conservation in genomes of *Helicobacter cetorum* strains from a dolphin and a whale. *PloS one*, 8(12), e83177.
  37. Kono S, *et al.* 2015 Can endoscopic atrophy predict histological atrophy? Historical study in United Kingdom and Japan. *World J Gastroenterol.* 21(46): 13113-13123.
  38. Lee Luna. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology 3a. ed. U.S (Nueva York):McGraw-Hill Book Co.; 1968.
  39. Lee Y, *et al.* 2016 Association between *Helicobacter pylori* eradication and gastric cancer incidence: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 150:1113-24.

40. Loayza Villa MF, Herrera Sevilla VL, Vivar-Diaz N. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Gastric Biopsies Using Laser Microdissection and qPCR. *Methods Mol Biol.* 2017;1616:71-88.
41. Mendes EN, Queiroz DM, Rocha GA, Nogueira AM, Carvalho AC, Lage AP, Barbosa AJ. Histopathological study of porcine gastric mucosa with and without a spiral bacterium ("*Gastrospirillum suis*"). *J Med Microbiol.* 1991 Dec;35(6):345-8.
42. Mladenova-Hristova I, O Grekova, A Patel. 2017. Zoonotic potential of *Helicobacter* spp. *J Microbiol Immunol Infect.* 50(3):265-269.
43. Muñoz-Bello, J. O., Olmedo-Nieva, L., Castro-Muñoz, L. J., Manzo-Merino, J., Contreras-Paredes, A., González-Espinosa, C., López-Saavedra, A., & Lizano, M. (2018). HPV-18 E6 Oncoprotein and Its Spliced Isoform E6\*1 Regulate the Wnt/ $\beta$ -Catenin Cell Signaling Pathway through the TCF-4 Transcriptional Factor. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3153.
44. O'Connor A, W Fischbach, JP Gisbert, C O'Morain. 2016. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 21:55-61.
45. O'Rourke J, *et al.* 2001. Non-*pylori* helicobacter species in humans. *Gut* 49(5): 601-606.
46. Omotosho OO, OT Jeremiah, BO Emikpe, AF Olusegun, OO Olusegun, ID Temitope, AO Ademola. 2018. Molecular evidence of *Helicobacter suis* infection in pigs in Nigeria.17(21):680-684.
47. Øverby A, Y Murayama, H Michimae. 2017. Prevalence of Gastric Non-*Helicobacter pylori* Helicobacters in Japanese Patients with Gastric Disease. 61-66.
48. Park J. *et al.*, 2000. Association of Tightly Spiraled Bacterial Infection and Gastritis in Pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 62(7): 725-729.
49. Powers M, Couturier M. 2015. Non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* species associated with human disease: a primer for the clinical microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter.* 37(12): 93-101
50. Queiroz D, *et al.*, 1996. Association between *Helicobacter* and gastric ulcer

- disease of the pars esophagea in swine. *Gastroenterology*. 111(1):19-27.
51. Saikumar G, Das T. Porcine Circovirus. *Recent Advances in Animal Virology*. 2019;171-195. 2019 Jun 6.
52. Salama, N. R., Hartung, M. L., & Müller, A. (2013). Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature reviews. Microbiology*, 11(6), 385–399.
53. Sarem, M., & Corti, R. (2016). Rol de las formas cocoides de *Helicobacter pylori* en la infección y la recrudescencia. *Gastroenterología y Hepatología*, 39(1), 28–35.
54. Serrano A, Hernández M, De la Garza J, Herrera L. 2009. *Helicobacter pylori* y Cáncer Gástrico. *Cancerología*. 4:193-204.
55. Sierra F, JD Forero, M Rey. 2014. Tratamiento ideal del *Helicobacter pylori* : una revisión sistemática. *Rev Gastroenterol Mex*. 79(1):28-49.
56. Stoffel M, *et al.* 2000. Distinction of Gastric *Helicobacter* spp. In Humans and Domestic Pets by Scanning Electron Microscopy. *Helicobacter*. 5(4): 232-239.
57. Takigawa H, *et al.* 2019. *Helicobacter suis* infection is associated with nodular gastritis-like appearance of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer Medicine* 8(9): 4370-4379.
58. Tegtmeyer, N., Rivas Traverso, F., Rohde, M., Oyarzabal, OA, Lehn, N., Schneider-Brachert, W., Ferrero, RL, Fox, JG, Berg, DE y Backert, S. (2013). Análisis microscópico electrónico, genético y de expresión de proteínas de cepas de *Helicobacter acinonychis* de un tigre de Bengala. *PloS uno* , 8 (8), e71220.
59. Tomb J, O White, AR Kerlavage, *et al.* 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 388:1211-1212.
60. Torres J, *et al.* 1998. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J. Infect. Dis.* 178(4):1089-94.
61. Torres F, Torres C,. 2016. Fisiopatología molecular en la infección por *Helicobacter pylori*. *Salud Uninorte*. 32(3): 500-512.
62. Une Y. 2003. *Helicobacter* species and *Helicobacter* infections in Animals.

WSAVA Congress. Disponible en: <https://www.vin.com/doc/?id=3850297>

63. Van den Bulck, K., Decostere, A., Baele, M., Vandamme, P., Mast, J., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2006). *Helicobacter cynogastricus* sp. nov., isolated from the canine gastric mucosa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1559–1564.
64. Vásconez, D., & Lozada, J. (2017). " *Giemsa and Warthin Starry Coloring Method To Identify Helicobacter Pylori in Gastric Biopsies* ". 1(1).
65. Vázquez G, Echeverría O. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. México (Mexico): Fondo de Cultura Económica; 2000.
66. Villaguala C, C González, E Pastene, C Farías, K Sáez, A Retamal-Díaz AG. 2016. Obtainment of egg yolk immunoglobulin against *Helicobacter pylori* produced in araucana hens. *Arch Med Vet.* 48:79 88.
67. Watanabe T, M Tada, H Nagi, S Sasaki, M Nakao. 1998. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology.* 115(3):642-648.
68. Wongphutorn, P., Chomvarin, C., Sripa, B., Namwat, W., & Faksri, K. (2018). Detection and genotyping of *Helicobacter pylori* in saliva versus stool samples from asymptomatic individuals in Northeastern Thailand reveals intra-host tissue-specific *H. pylori* subtypes. *BMC microbiology*, 18(1), 10.
69. Xie G, W Li, R Li, *et al.* 2017. *Helicobacter Pylori* Promote B7-H1 Expression by Suppressing miR-152 and miR- 200b in Gastric Cancer Cells. *PLoS One.* 12(1):1-14.
70. Zamani M, *et al.* 2018. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *ALIMENT PHARM THER.* 47(7):868-876.

### 13. Anexos

**Anexo 1.** Características diferenciales de las especies gástricas de *Helicobacter* asociadas con animales domésticos y humanos

Característica	<i>H. pylori</i>	<i>H. suis</i>	<i>H. bizzozeronii</i>	<i>H. felis</i>	<i>H. salomonis</i>	<i>H. heilmannii</i>
Largo (µm)	2.5 – 5	2.3 – 6.7	5 – 10	5 – 7.5	5 – 7	5 - 10
Ancho (µm)	0.5 – 1	0.9 – 1.2	0.3	0.4	0.8 – 1.2	0.5 – 0.6
Reducción de nitrato	-	-	+	+	+	ND
Ureasa	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	ND
Crecimiento a 42°C	-	-	+	+	-	ND
Número de flagelos	4 – 8	4 – 10	10 – 20	14 - 20	10 – 23	10 – 20
Distribución de flagelos	Monopolar	Bipolar	Bipolar	Bipolar	Bipolar	Bipolar
Hospederos naturales	Humano Primates no humanos	Macaco cangrejero, macaco Rhesus, mandril y cerdo doméstico	Perro doméstico, gato doméstico y zorro	Perro doméstico y gato doméstico	Perro doméstico y gato doméstico	Perro doméstico y gato doméstico
Prevalencia en hospederos naturales	20 – 79%	8 – 95%	4 – 55.6%	22 – 50%	22.2%	20 – 100%
Prevalencia en humanos	20 – 79.1%	0.1 – 6%	0.13%	2.2%	2.54%	0.07%

Adaptado de Haesebrouck *et al.*, 2009

## Anexo 2. Factores de virulencia asociados con la colonización de *H. pylori*

<b>Factor</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
Ureasa	Hidroliza la urea en amonio y gas carbónico.
Superóxido dismutasa	Cataliza la transformación del superóxido en peróxido de hidrógeno.
Catalasa	Cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y óxido gaseoso.
Peroxirredoxinas	Catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y otros hidroperóxidos orgánicos.
MdaB	NAPD quinona reductasa, compensa la pérdida de antioxidantes.
NAP	Bacterioferritina, capta los iones ferrosos libres intracelulares con acción genotóxica.
Flagelos	Facilitan la penetración dentro de la capa de moco y la adherencia.
HpaA	Media la unión a glicoconjugados con ácido siálico (N-acetil-neuraminil-lactosa).
BabA	Facilita la adhesión y colonización del patógeno al antígeno B y al antígeno Lewis.
SabA	Proteína de adhesión al ácido siálico.
OipA	Proteína inflamatoria externa, producción de IL-8 y otras citocinas proinflamatorias.

Adaptado de Torres y Torres, 2016

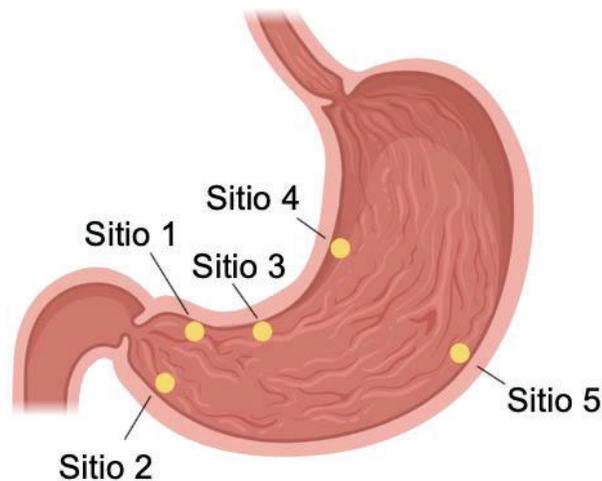
**Anexo 3.** Factores de virulencia asociados con el daño en la mucosa de *H. pylori*

<b>Factor</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
CagPAI	Locus genómico de 40 kb. Sistema de secreción tipo IV (T4SS).
CagA	Oncoproteína, principal factor de virulencia del <i>H. pylori</i> .
VacA	Segundo factor de virulencia de <i>H. pylori</i> . Induce la formación de vacuolas dentro de la célula.
IceA	Factor de virulencia inducido por contacto con el epitelio. Asociado con úlcera péptica.
DupA	Factor de virulencia que promueve la formación de úlcera duodenal.

Adaptado de Torres y Torres, 2016

**Anexo 4.** Sitios de toma de biopsias gástricas mediante endoscopia por el protocolo de Sydney

- Sitios 1 y 2: Antro
- Sitio 3: Ángulo
- Sitio 4: Cuerpo medio, curvatura menor
- Sitio 5: Cuerpo medio, curvatura mayor



Adaptado de Kono S. *et al.* 2015

**Anexo 5.** Datos demográficos de la población humana.

<b>Paciente</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad (años)</b>
A001	H	52
C001		
A002	M	67
C002		
A003	H	64
C003		
A004	M	74
C004		
A005	M	62
C005		
A006	H	56
C006		
A007	H	31
C007		
A008	H	75
C008		
A009	M	14
C009		
A010	H	28
C010		
A011	M	47
C011		
A012	M	60
C012		
A013	M	44
C013		
A014	M	49
C014		
A015	H	34
C015		

A016		
C016	H	34
A017		
C017	M	34
A018		
C018	H	42
A019		
C019	H	16
A020		
C020	M	40
A021		
C021	M	53
A022		
C022	M	18
A023		
C023	M	74
A024		
C024	M	59
A025		
C025	M	29
A026		
C026	M	52
A027		
C027	H	41
A028		
C028	M	45
A029		
C029	H	30
A030		
C030	M	60
A031		
C031	M	59

A032		
C032	M	59
A033		
C033	H	32
A034		
C034	M	46
A035		
C035	H	75
A036		
C036	H	70
A037		
C037	M	65

**Anexo 6.** Clasificación histopatológica de las secciones de tejido gástrico provenientes de pacientes humanos.

<b>Muestra</b>	<b>Diagnóstico descriptivo</b>	<b>Clasificación</b>
A001	Gastritis linfoplasmocítica moderada zonalmente extensiva con vacuolización del epitelio, edema y hemorragias.	Gastritis crónica activa.
C001	Gastritis linfoplasmocítica y necrótica grave generalizada con presencia de agregados y vacuolización, edema y hemorragia.	Metaplasia intestinal.
A002	Gastritis linfoplasmocítica leve multifocal con presencia de agregados, edema y hemorragia grave.	Metaplasia intestinal.
C002	Gastritis linfoplasmocítica leve multifocal con edema y congestión.	Gastritis crónica no activa.
A003	Gastritis linfoplasmocítica leve generalizada con vacuolización del epitelio y edema.	Metaplasia intestinal.

C003	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con vacuolización y edema.	Gastritis atrófica.
A004	Gastritis linfoplasmocítica leve multifocal con edema y hemorragias.	Gastritis atrófica.
C004	Gastritis linfoplasmocítica leve generalizada con edema y congestión.	Gastritis crónica no activa.
A005	Gastritis linfoplasmocítica leve generalizada con presencia de agregados, hemorragias y edema.	Gastritis crónica no activa.
C005	Gastritis linfoplasmocítica y necrótica leve generalizada.	Gastritis crónica no activa.
A006	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada con hemorragias y edema leve.	Gastritis atrófica.
C006	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada, con hemorragias y edema grave generalizado.	Gastritis atrófica.
A007	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada, con hemorragias y edema moderado generalizado.	Gastritis crónica no activa.
C007	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada, con hemorragias y edema moderado generalizado.	Gastritis atrófica.
A008	Gastritis linfoplasmocítica leve multifocal, con edema grave generalizado.	Gastritis atrófica.
C008	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada, con hemorragias y edema grave generalizado.	Gastritis crónica no activa.
A009	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada, con hemorragias y edema moderado generalizado.	Gastritis atrófica.

C009	Gastritis linfoplasmocítica leve generalizada, con hemorragias y edema moderado generalizado.	Gastritis crónica no activa.
A010	Mucosa gástrica normal, edema leve generalizado.	Gastritis crónica no activa.
C010	Mucosa gástrica normal, edema leve generalizado.	Gastritis crónica no activa.
A011	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada.	Gastritis crónica no activa.
C011	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada, con hemorragias.	Gastritis crónica no activa.
A012	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada.	Gastritis crónica no activa.
C012	Mucosa gástrica normal.	Gastritis crónica no activa.
A013	Gastritis linfoplasmocítica grave difusa, con edema grave generalizado.	Gastritis atrófica.
C013	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada.	Gastritis crónica activa.
A014	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hemorragias multifocales.	Gastritis crónica no activa.
C014	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hemorragias multifocales.	Gastritis crónica no activa.
A015	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosas y hemorragias multifocales.	Gastritis atrófica.
C015	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosas y hemorragias multifocales.	Gastritis atrófica.

A016	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosas y hemorragias multifocales.	Gastritis crónica no activa.
C016	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada, con hemorragias.	Gastritis crónica no activa.
A017	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada, con hemorragias.	Metaplasia intestinal.
C017	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada, con hemorragias.	Gastritis crónica no activa.
A018	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada, con hemorragias.	Gastritis crónica no activa.
C018	Gastritis linfoplasmocítica leve multifocal, con edema grave generalizado y hemorragias graves.	Gastritis crónica no activa.
A019	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada, con hemorragias.	Gastritis crónica no activa.
C019	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada, con hemorragias y edema grave generalizado.	Gastritis atrófica.
A020	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hemorragias multifocales.	Gastritis crónica no activa.
C020	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hemorragias multifocales.	Gastritis crónica no activa.
A021	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hemorragias multifocales.	Gastritis crónica no activa.
C021	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hemorragias multifocales.	Gastritis crónica activa.

A022	Gastritis generalizada multifocales.	linfoplasmocítica con	grave hemorragias	Gastritis crónica no activa.
C022	Gastritis generalizada linfoide asociado a mucosas y hemorragias multifocales.	linfoplasmocítica con	grave hiperplasia del tejido	Gastritis crónica no activa.
A023	Gastritis generalizada multifocales.	linfoplasmocítica con	leve hemorragias	Gastritis atrófica.
C023	Gastritis generalizada multifocales.	linfoplasmocítica con	leve hemorragias	Gastritis atrófica.
A024	Gastritis generalizada multifocales.	linfoplasmocítica con	leve hemorragias	Gastritis crónica no activa.
C024	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa.
A025	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa.
C025	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa.
A026	Gastritis generalizada, multifocales.	linfoplasmocítica con	moderada hemorragias	Gastritis crónica no activa.
C026	Gastritis generalizada, multifocales.	linfoplasmocítica con	moderada hemorragias	Gastritis crónica no activa.
A027	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica activa.
C027	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa.

A028	Gastritis generalizada con atrofia leve de la mucosa.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis atrófica.
C028	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa.
A029	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa.
C029	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa.
A030	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa.
C030	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa.
A031	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa.
C031	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa.
A032	Gastritis generalizada con atrofia leve de la mucosa.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis atrófica.
C032	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa.
A033	Gastritis generalizada con atrofia leve de la mucosa.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis atrófica.
C033	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa.
A034	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica activa.
C034	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica activa.
A035	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica activa.
C035	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica activa.

A036	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa
C036	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa
A037	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	moderada	Gastritis crónica activa
C037	Gastritis generalizada.	linfoplasmocítica	leve	Gastritis crónica no activa

**Anexo 7.** Clasificación histopatológica de las secciones de tejido gástrico provenientes de cerdos.

<b>Muestra</b>	<b>Diagnóstico descriptivo</b>	<b>Clasificación</b>
A1	Gastritis linfoplasmocítica moderada multifocal con edema moderado.	Gastritis crónica activa.
C1	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A2	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
C2	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A3	Gastritis linfoplasmocítica leve generalizada con edema leve e hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica activa.
C3	Gastritis linfoplasmocítica leve generalizada.	Gastritis crónica activa.
A4	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
C4	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa.
A5	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides.
C5	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada.	Gastritis crónica no activa.
A6	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
C6	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A7	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada con edema moderado.	Gastritis crónica no activa.
C7	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A8	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
C8	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A9	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
C9	Gastritis linfoplasmocítica leve generalizada.	Gastritis crónica no activa.
A10	Gastritis linfoplasmocítica leve generalizada con edema grave e hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa	Gastritis crónica no activa.
C10	Gastritis linfoplasmocítica leve generalizada con edema moderado.	Gastritis crónica activa.

A11	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada.	Gastritis crónica no activa.
C11	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A12	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa con presencia de folículos linfoides.
C12	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A13	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada.	Gastritis crónica no activa.
C13	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A14	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides.
C14	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A15	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa y edema moderado.	Gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides.
C15	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A16	Gastritis linfoplasmocítica leve generalizada.	Gastritis crónica activa.
C16	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A17	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa con presencia de folículos linfoides.
C17	Gastritis linfoplasmocítica leve generalizada.	Gastritis crónica activa.
A18	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
C18	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A19	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides.
C19	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A20	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada.	Gastritis crónica activa.

C20	Gastritis linfoplasmocítica leve multifocal.	Gastritis crónica activa.
A21	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
C21	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A22	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
C22	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A23	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides.
C23	Gastritis linfoplasmocítica moderada multifocal.	Gastritis crónica activa.
A24	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides.
C24	Gastritis linfoplasmocítica moderada multifocal con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa con presencia de folículos linfoides.
A25	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides.
C25	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A26	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides.
C26	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A27	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
C27	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A28	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
C28	Gastritis linfoplasmocítica leve multifocal con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa	Gastritis crónica activa.
A29	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa con presencia de folículos linfoides.

C29	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A30	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa con presencia de folículos linfoides.
C30	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A31	gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides.
C31	Hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Mucosa gástrica normal.
A32	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
C32	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A33	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada.	Gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides.
C33	Hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Mucosa gástrica normal.
A34	Gastritis linfoplasmocítica grave generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa y edema moderado.	Gastritis crónica no activa grave con presencia de folículos linfoides.
C34	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.
A35	Gastritis linfoplasmocítica moderada generalizada con hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa.	Gastritis crónica no activa con presencia de folículos linfoides.
C35	Mucosa gástrica normal.	Mucosa gástrica normal.

**Anexo 8.** Positividad a HLOs en las secciones de tejido teñidas con Warthin-Starry provenientes de pacientes humanos.

<b>Muestra</b>	<b>Warthin-Starry</b>	<b>Muestra</b>	<b>Warthin-Starry</b>
A001	+	A015	-
C001	+	C015	-
A002	-	A016	-
C002	-	C016	-
A003	-	A017	-
C003	-	C017	-
A004	-	A018	-
C004	-	C018	-
A005	-	A019	-
C005	-	C019	-
A006	-	A020	-
C006	+	C020	-
A007	-	A021	-
C007	-	C021	-
A008	-	A022	+
C008	-	C022	+
A009	-	A023	-
C009	-	C023	-
A010	-	A024	-
C010	-	C024	-
A011	-	A025	-
C011	+	C025	-
A012	-	A026	-
C012	-	C026	-
A013	-	A027	+
C013	+	C027	+
A014	-	A028	-
C014	-	C028	-

A029	-	C033	-
C029	-	A034	+
A030	-	C034	+
C030	-	A035	-
A031	-	C035	-
C031	-	A036	-
A032	-	C036	-
C032	+	A037	-
A033	-	C037	-

**Anexo 9.** Positividad a HLOs en las secciones de tejido teñidas con Warthin-Starry provenientes de cerdos.

<b>Muestra</b>	<b>Warthin-Starry</b>	<b>Muestra</b>	<b>Warthin-Starry</b>
A1	-	A10	-
C1	-	C10	-
A2	-	A11	-
C2	-	C11	-
A3	-	A12	-
C3	-	C12	-
A4	-	A13	-
C4	-	C13	-
A5	-	A14	-
C5	-	C14	-
A6	-	A15	-
C6	-	C15	-
A7	-	A16	-
C7	-	C16	-
A8	-	A17	-
C8	-	C17	-
A9	-	A18	-
C9	-	C18	-

A19	-	C27	-
C19	-	A28	-
A20	-	C28	-
C20	-	A29	-
A21	-	C29	-
C21	-	A30	-
A22	-	C30	-
C22	-	A31	-
A23	-	C31	-
C23	-	A32	-
A24	-	C32	-
C24	-	A33	-
A25	-	C33	-
C25	-	A34	-
A26	-	C34	-
C26	-	A35	-
A27	-	C35	-

---

**Anexo 10.** Valores de Ct de los productos de amplificación de qPCR para el gen 18S ribosomal de las biopsias gástricas de pacientes humanos.

<b>Muestra</b>	<b>Valor de Ct</b>	<b>Muestra</b>	<b>Valor de Ct</b>
A001	29.2531548	A015	26.55257416
C001	28.5114136	C015	27.78554916
A002	28.9938011	A016	27.60006523
C002	28.7983837	C016	27.32160568
A003	29.4044037	A017	27.60006523
C003	29.6178112	C017	27.43939972
A004	27.9114609	A018	27.31745338
C004	30.2550335	C018	27.97373962
A005	29.7312393	A019	27.47301674
C005	28.7333755	C019	26.72022629
A006	28.7038193	A020	31.99643707
C006	27.92296028	C020	31.98109627
A007	32.997364	A021	32.17626953
C007	33.8995781	C021	31.64111519
A008	29.4871407	A022	31.51898003
C008	33.8995781	C022	31.82365227
A009	33.8245506	A023	32.03757477
C009	33.9903603	C023	31.99066734
A010	28.7606277	A024	32.27449036
C010	30.9991207	C024	32.2918396
A011	27.5758514	A025	31.9030304
C011	30.4247875	C025	33.88165283
A012	28.7625751	A026	32.06228638
C012	29.5421448	C026	31.86447144
A013	29.262085	A027	26.08041763
C013	28.4332275	C027	27.84976006
A014	27.32172012	A028	27.03423691
C014	27.31603432	C028	26.89322853

A029	26.4640274	C033	28.73398209
C029	26.71377563	A034	28.28984261
A030	27.19902039	C034	26.82206345
C030	28.07261467	A035	28.44925308
A031	28.96975327	C035	28.71383667
C031	28.54104424	A036	27.60373688
A032	27.4940815	C036	28.55322266
C032	27.06390572	A037	26.18464088
A033	26.02742767	C037	28.12955284

**Anexo 11.** Valores de Ct de los productos de amplificación de qPCR para el gen 18S ribosomal de los fragmentos de tejido gástrico de cerdo.

Muestra	Valor de Ct	Muestra	Valor de Ct
A1	26.76685143	A10	27.90602875
C1	30.14035797	C10	28.95174026
A2	27.02420998	A11	27.2298584
C2	32.16976166	C11	35.98910522
A3	28.97242928	A12	26.87272263
C3	29.31981087	C12	29.34724426
A4	27.68113899	A13	26.45747375
C4	31.06583405	C13	28.44291496
A5	27.79211235	A14	29.79485321
C5	30.78897095	C14	29.35831451
A6	31.36255264	A15	25.68296814
C6	37.51410675	C15	28.17610359
A7	26.01866722	A16	26.34363174
C7	32.50535583	C16	27.98131752
A8	32.18766022	A17	27.27077866
C8	33.42155838	C17	26.32577515
A9	30.55264664	A18	26.09151268
C9	37.01646423	C18	28.7338829

A19	35.01388168	C27	28.18629837
C19	27.52469063	A28	28.75842857
A20	26.46892357	C28	28.39484406
C20	29.58502197	A29	28.32670021
A21	28.56390953	C29	31.53658676
C21	30.12292671	A30	32.38300705
A22	28.64632607	C30	30.69634819
C22	27.64143181	A31	28.2162075
A23	28.46941185	C31	29.10758591
C23	28.6319046	A32	30.97660255
A24	29.79271698	C32	30.52458382
C24	28.40292549	A33	28.9915905
A25	27.38043404	C33	29.29379082
C25	30.93613815	A34	27.9788723
A26	26.53186226	C34	30.63457108
C26	31.64369965	A35	29.57699013
A27	26.53186226	C35	29.7245636

---

**Anexo 12.** Valores de Ct de los productos de amplificación de qPCR para el gen 16S ribosomal de *Helicobacter* spp. de las biopsias gástricas de pacientes humanos.

<b>Muestra</b>	<b>Valor de Ct</b>	<b>Muestra</b>	<b>Valor de Ct</b>
A001	34.92669296	A015	34.3070488
C001	35.33608246	C015	32.93040848
A002	34.25790787	A016	32.70257568
C002	32.62234497	C016	34.49589157
A003	31.72363281	A017	33.72636795
C003	27.36891556	C017	33.90692902
A004	35.22851563	A018	33.28713989
C004	33.39512634	C018	34.69270706
A005	37.01832581	A019	32.86254501
C005	36.0783844	C019	27.16292191
A006	25.39254189	A020	33.21961975
C006	23.15410805	C020	34.00969696
A007	32.72471619	A021	33.14974594
C007	32.91320801	C021	35.3759613
A008	31.56062889	A022	25.49658966
C008	33.05094528	C022	31.92310905
A009	34.64757156	A023	32.81417847
C009	35.09950638	C023	32.95571518
A010	35.27101898	A024	37.08682632
C010	33.58063126	C024	33.36012268
A011	31.6469593	A025	32.72942734
C011	24.20603943	C025	33.61175537
A012	34.18473434	A026	33.83949661
C012	34.5047226	C026	32.13555145
A013	28.11086464	A027	17.46291542
C013	24.78427696	C027	21.45662498
A014	31.7217598	A028	No determinado
C014	25.56093597	C028	No determinado
A029	22.95582199	C033	No determinado

C029	20.44111252	A034	23.10472488
A030	35.26631165	C034	20.44553566
C030	No determinado	A035	24.2825222
A031	No determinado	C035	25.43519402
C031	36.25004196	A036	37.16543961
A032	31.48799324	C036	37.83239746
C032	27.00113678	A037	33.59732056
A033	32.29269409	C037	37.04281235

**Anexo 13.** Valores de Ct de los productos de amplificación de qPCR para el gen 16S ribosomal de *Helicobacter* spp. de los fragmentos de tejido gástrico de cerdo.

Muestra	Valor de Ct	Muestra	Valor de Ct
A1	29.33283234	A10	32.79442978
C1	No determinado	C10	No determinado
A2	31.15222168	A11	31.93413734
C2	No determinado	C11	33.93590164
A3	28.77119637	A12	33.43021774
C3	No determinado	C12	No determinado
A4	33.89027786	A13	No determinado
C4	26.13694382	C13	26.33392906
A5	33.90163803	A14	28.8013649
C5	27.76976967	C14	No determinado
A6	33.57651901	A15	28.60010529
C6	33.19648361	C15	No determinado
A7	28.80619431	A16	35.97304153
C7	No determinado	C16	24.45837021
A8	29.4886837	A17	31.04219627
C8	34.68315506	C17	No determinado
A9	34.23765564	A18	33.64163589
C9	31.69900703	C18	29.48107147
A19	35.80263138	C27	38.43021774
C19	31.43227005	A28	33.4436264

A20	29.14930344	C28	No determinado
C20	No determinado	A29	36.4813652
A21	31.95706367	C29	No determinado
C21	36.84830856	A30	32.44046021
A22	32.15322495	C30	38.22660065
C22	29.07419014	A31	33.977005
A23	32.07209396	C31	No determinado
C23	No determinado	A32	39.38041687
A24	37.06855011	C32	33.08985901
C24	No determinado	A33	33.07732773
A25	35.34233475	C33	No determinado
C25	No determinado	A34	38.47325897
A26	33.27818298	C34	29.18683624
C26	37.40730667	A35	37.89535904
A27	35.55829239	C35	No determinado

---

**Anexo 14.** Valores de Ct de los productos de amplificación de qPCR para el gen 16S ribosomal de *H. pylori* de las biopsias gástricas de pacientes humanos.

<b>Muestra</b>	<b>Valor de Ct</b>	<b>Muestra</b>	<b>Valor de Ct</b>
A001	25.18642426	A015	No determinado
C001	22.42802238	C015	No determinado
A002	No determinado	A016	No determinado
C002	35.56695175	C016	No determinado
A003	32.34715652	A017	No determinado
C003	27.15155411	C017	No determinado
A004	No determinado	A018	No determinado
C004	No determinado	C018	No determinado
A005	No determinado	A019	35.62984085
C005	No determinado	C019	24.81434822
A006	24.43493271	A020	No determinado
C006	22.3261795	C020	No determinado
A007	33.56460571	A021	No determinado
C007	35.74067307	C021	No determinado
A008	No determinado	A022	23.43546295
C008	No determinado	C022	33.47289658
A009	No determinado	A023	No determinado
C009	No determinado	C023	No determinado
A010	37.02818298	A024	No determinado
C010	34.5857811	C024	No determinado
A011	29.42339325	A025	No determinado
C011	22.40052605	C025	No determinado
A012	No determinado	A026	No determinado
C012	No determinado	C026	No determinado
A013	26.17919922	A027	22.91648483
C013	23.62037277	C027	26.33023834
A014	33.77397537	A028	-
C014	23.33198166	C028	-
A029	29.05269814	C033	-
C029	26.12300491	A034	28.20028305

A030	No determinado	C034	25.42385292
C030	-	A035	29.14112282
A031	-	C035	30.39759064
C031	No determinado	A036	No determinado
A032	37.02125931	C036	No determinado
C032	31.83248711	A037	No determinado
A033	No determinado	C037	No determinado

**Anexo 15.** Valores de Ct de los productos de amplificación de qPCR para el gen 16S ribosomal de *H. pylori* de los fragmentos de tejido gástrico de cerdo.

Muestra	Valor de Ct	Muestra	Valor de Ct
A1	No determinado	A10	No determinado
C1	No determinado	C10	No determinado
A2	No determinado	A11	No determinado
C2	No determinado	C11	No determinado
A3	No determinado	A12	No determinado
C3	No determinado	C12	No determinado
A4	No determinado	A13	No determinado
C4	No determinado	C13	No determinado
A5	No determinado	A14	No determinado
C5	No determinado	C14	No determinado
A6	No determinado	A15	No determinado
C6	No determinado	C15	No determinado
A7	No determinado	A16	No determinado
C7	No determinado	C16	No determinado
A8	No determinado	A17	No determinado
C8	No determinado	C17	No determinado
A9	No determinado	A18	No determinado
C9	No determinado	C18	No determinado
A19	No determinado	C27	No determinado
C19	No determinado	A28	No determinado

A20	No determinado	C28	No determinado
C20	No determinado	A29	No determinado
A21	No determinado	C29	No determinado
C21	No determinado	A30	No determinado
A22	No determinado	C30	No determinado
C22	No determinado	A31	No determinado
A23	No determinado	C31	No determinado
C23	No determinado	A32	No determinado
A24	No determinado	C32	No determinado
C24	No determinado	A33	No determinado
A25	No determinado	C33	No determinado
C25	No determinado	A34	No determinado
A26	No determinado	C34	No determinado
C26	No determinado	A35	No determinado
A27	No determinado	C35	No determinado

---

**Anexo 16.** Valores de Ct de los productos de amplificación de qPCR para el gen de UreA de *H. suis* de las biopsias gástricas de pacientes humanos.

<b>Muestra</b>	<b>Valor de Ct</b>	<b>Muestra</b>	<b>Valor de Ct</b>
A001	No determinado	A015	No determinado
C001	No determinado	C015	No determinado
A002	No determinado	A016	No determinado
C002	No determinado	C016	No determinado
A003	No determinado	A017	No determinado
C003	No determinado	C017	No determinado
A004	No determinado	A018	No determinado
C004	No determinado	C018	No determinado
A005	No determinado	A019	No determinado
C005	No determinado	C019	No determinado
A006	No determinado	A020	No determinado
C006	No determinado	C020	No determinado
A007	No determinado	A021	No determinado
C007	No determinado	C021	No determinado
A008	No determinado	A022	No determinado
C008	36.28738845	C022	No determinado
A009	No determinado	A023	No determinado
C009	No determinado	C023	No determinado
A010	No determinado	A024	No determinado
C010	No determinado	C024	No determinado
A011	No determinado	A025	No determinado
C011	No determinado	C025	No determinado
A012	No determinado	A026	No determinado
C012	No determinado	C026	No determinado
A013	No determinado	A027	No determinado
C013	39.22898428	C027	No determinado
A014	39.07782448	A028	-
C014	No determinado	C028	-
A029	No determinado	C033	-
C029	No determinado	A034	No determinado

A030	No determinado	C034	No determinado
C030	-	A035	No determinado
A031	-	C035	No determinado
C031	No determinado	A036	No determinado
A032	No determinado	C036	No determinado
C032	No determinado	A037	No determinado
A033	No determinado	C037	No determinado

**Anexo 17.** Valores de Ct de los productos de amplificación de qPCR para el gen UreA de *H. suis* de los fragmentos de tejido gástrico de cerdo.

Muestra	Valor de Ct	Muestra	Valor de Ct
A1	No determinado	A10	No determinado
C1	No determinado	C10	No determinado
A2	No determinado	A11	11.13555823
C2	No determinado	C11	14.69727208
A3	No determinado	A12	No determinado
C3	No determinado	C12	31.90434147
A4	No determinado	A13	No determinado
C4	No determinado	C13	No determinado
A5	No determinado	A14	No determinado
C5	No determinado	C14	No determinado
A6	No determinado	A15	9.144442447
C6	14.04356992	C15	No determinado
A7	No determinado	A16	No determinado
C7	No determinado	C16	10.81243105
A8	4.32362723	A17	No determinado
C8	10.30048464	C17	No determinado
A9	13.0190973	A18	No determinado
C9	13.45850237	C18	6.733588953
A19	No determinado	C27	30.58282506
C19	6.091466346	A28	8.302390972

A20	36.25658022	C28	28.18458555
C20	16.79951245	A29	22.00276396
A21	6.912349903	C29	1.084490942
C21	7.035308738	A30	No determinado
A22	3.226214115	C30	No determinado
C22	No determinado	A31	18.07937822
A23	36.8950619	C31	7.235150431
C23	24.03370386	A32	5.749444798
A24	No determinado	C32	29.31053908
C24	No determinado	A33	30.49154756
A25	No determinado	C33	23.48382579
C25	9.871766862	A34	No determinado
A26	27.03459707	C34	No determinado
C26	9.392060973	A35	30.38498675
A27	24.54925217	C35	30.58282506

---