



DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**Sinergismo de la dieta sódica y el estrés en lesiones gástricas
inducidas por *Helicobacter pylori* en jerbos
(*Meriones unguiculatus*)**

T E S I S

para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biomédicas

P r e s e n t a

Armando Gamboa-Domínguez

Tutor: Guillermo M. Ruiz-Palacios.

Sedes:

Departamentos de Patología e Infectología.
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición
Salvador Zubirán.

Febrero 2010



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.

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevó a cabo el día 31 de enero del 2007, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas del alumno **GAMBOA DOMÍNGUEZ ARMANDO**, con número de cuenta 8557997-6 y número de expediente 12910511 con la tesis titulada: **"FACTORES DE SINERGISMO EN LESIONES GÁSTRICAS INDUCIDAS POR Helicobacter pylori. MODELO EXPERIMENTAL EN JERBOS (Meriones unguiculatus)"**, dirigida por el Dr. Guillermo M. Ruiz Palacios y Santos.

PRESIDENTE: DR. LUIS BENITEZ BRIBIESCA
SECRETARIO: DR. GUILLERMO M. RUIZ PALACIOS Y SANTOS
VOCAL: DR. GONZALO CASTILLO ROJAS
VOCAL: DR. GUILLERMO BENITO ROBLES DIAZ
VOCAL: DR. LUIS A. HERRERA MONTALVO
SUPLENTE: DR. ROLANDO HERNANDEZ MUÑOZ
SUPLENTE: DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, a 21 de octubre de 2009.



Dra. Yolanda López Vidal
Responsable
Facultad de Medicina



Dr. Federico Martínez Montes
Coordinador del Programa

C.c.p. **Lic. Balfred Santaella Hinojosa**, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado.-Presente.
Tutor(a) Dr. Guillermo M. Ruiz Palacios y Santos.
Coordinación de Doctorado

Voto Aprobatorio

7, Julio, 2009

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ

Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Dr. Ávila,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**SINERGISMO DE LA DIETA SODICA Y EL ESTRÉS EN LESIONES GASTRICAS INDUCIDAS POR HELICOBACTER PYLORI EN JERBOS (*Meriones unguiculatus*)**" del alumno, **ARMANDO GAMBOA DOMINGUEZ** con número de cuenta **85579976** y número de expediente **12910511**, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctor en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado.

Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Dr. Luis Benítez Bribiesca

Unidad de Investigación, Centro Medico Nacional Siglo XXI

Instituto Mexicano del Seguro Social

Voto Aprobatorio

26, Junio, 2009

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ

Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

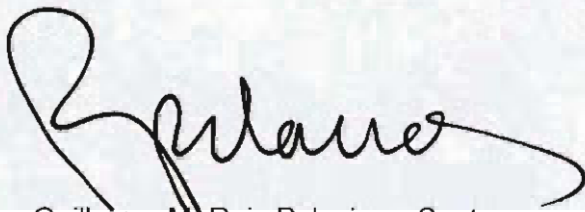
Estimado Dr. Ávila,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**SINERGISMO DE LA DIETA SODICA Y EL ESTRÉS EN LESIONES GASTRICAS INDUCIDAS POR HELICOBACTER PYLORI EN JERBOS (MERIONES UNGUICULATUS)**" del alumno, **Armando Gamboa Dominguez** con número de cuenta **85579975** y número de expediente **12910511**, inscrito (a) en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctor en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado.

Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Guillermo M. Ruiz Palacios y Santos

Departamento de Infectología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Voto Aprobatorio

26, Junio, 2009

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ

Director General de Administración Escolar,

UNAM

P R E S E N T E

Estimado Dr. Ávila,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**SINERGISMO DE LA DIETA SÓDICA Y EL ESTRÉS EN LESIONES GÁSTRICAS INDUCIDAS POR HELICOBACTER PYLORI EN JERBOS (*Meriones unguiculatus*)**" del alumno, **ARMANDO GAMBOA DOMÍNGUEZ** con número de cuenta **85579975** y número de expediente **12910511**, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctor en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado.

Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Dr. Gonzalo Castillo Rojas

Unidad de Investigación en Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad Universitaria

Voto Aprobatorio

26, Junio, 2009

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ

Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

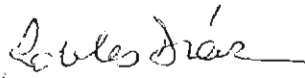
Estimado Dr. Ávila,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**SINERGISMO DE LA DIETA SODICA Y EL ESTRÉS EN LESIONES GÁSTRICAS INDUCIDAS POR HELICOBACTER PYLORI EN JERBOS (*Meriones unguiculatus*)**" del alumno, **ARMANDO GAMBOA DOMINGUEZ** con número de cuenta **85579975** y número de expediente **12910511**, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctor en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado.

Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Dr. Guillermo Benito Robles Díaz

Unidad de Posgrado en Medicina, UNAM. Ciudad Universitaria

Unidad de Investigación, Hospital General de México, Secretaría de Salud

Voto Aprobatorio

19, Noviembre, 2009

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ

Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E


Estimado Dr. Ávila,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**SINERGISMO DE LA DIETA SODICA Y EL ESTRÉS EN LESIONES GASTRICAS INDUCIDAS POR HELICOBACTER PYLORI EN JERBOS (MERIONES UNGUICULATUS)**" del alumno, **Armando Gamboa Dominguez** con número de cuenta **85579976** y número de expediente **12910511**, inscrito (a) en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctor en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado.

Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Luis Alonso Herrera Montalvo

Dirección de Investigación Clínica. Instituto Nacional de Cancerología.

Voto Aprobatorio

26, Junio, 2009

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ

Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

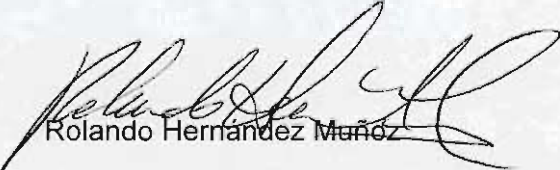
Estimado Dr. Ávila,

Después de haber evaluado la Tesis titulada **"SINERGISMO DE LA DIETA SODICA Y EL ESTRÉS EN LESIONES GASTRICAS INDUCIDAS POR HELICOBACTER PYLORI EN JERBOS (*Meriones unguiculatus*)"** del alumno, **ARMANDO GAMBOA DOMINGUEZ** con número de cuenta **85579975** y número de expediente **12910511**, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctor en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado.

Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Rolando Hernández Muñoz

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México

Voto Aprobatorio

7, Julio, 2009

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ

Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Dr. Ávila,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**SINERGISMO DE LA DIETA SODICA Y EL ESTRÉS EN LESIONES GÁSTRICAS INDUCIDAS POR HELICOBACTER PYLORI EN JERBOS (*Meriones unguiculatus*)**" del alumno, **ARMANDO GAMBOA DOMINGUEZ** con número de cuenta **85579975** y número de expediente **12910511**, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctor en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado.

Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Dra. Martha Estela Pérez Rodríguez

Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría

Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social

Tesis para obtener el grado de doctor en Ciencias Biomédicas

Sinergismo de la dieta sódica y el estrés en lesiones gástricas inducidas por *Helicobacter pylori* en jerbos (*Meriones unguiculatus*)

Alumno: Armando Gamboa-Domínguez.

Tutor: Guillermo M. Ruiz-Palacios.

Co-tutores: Alejandro García Carranca.
Mauricio Salcedo Vargas.

Sedes:

Departamentos de Patología e Infectología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán.

Febrero 2010.

INDICE

	Página
Resumen	3
Abstract	5
Introducción	6
Justificación	13
Objetivo general	14
Objetivos específicos	14
Hipótesis	15
Material y métodos	16
Diseño	16
Animales y grupos	17
Determinación de infección	19
Tejido	20
Inmunohistoquímica	20
Evaluación	21
Definiciones operacionales	24
Proliferación/Apoptosis	24
Expresión p53 y p21	24
Análisis	24
Resultados	25
Colonización	25
Desarrollo de estrés	26
Lesiones morfológicas en mucosa gástrica	27
Inmunohistoquímica y TUNEL	34
Discusión	38
Conclusiones	42
Referencias	43
Apéndice	41
Perspectivas	52
Congreso	54
Publicación	55

RESUMEN

A pesar de que *H. pylori* es considerado carcinógeno tipo I por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC/UICC), factores como sal y estrés podrían coadyuvar al desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Objetivo: determinar si el estrés psicológico y la ingesta mayor de sal potencian las lesiones gástricas asociadas con infección por *H. pylori* en *Meriones unguiculatus*. Material y métodos: Se asignaron en siete grupos 278 jerbos hembra libres de patógenos de 8 semanas de vida: cepa Hp-Sydney (45), dieta 8%+sal (38), estrés (reducción de 60% del espacio e inmersión en agua, 36), Hp+sal (33), Hp+estrés (34), *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina* (34), y control (58). Los animales fueron sometidos a eutanasia en las semanas 1 (n=67), 12 (n=73), 52 (n=65), y 68 (n=73) post-infección. Se usaron en forma cegada los sistemas de clasificación Sydney, Padova y Lauren. Se determinó proliferación celular, p53, p21 y apoptosis. Resultados: La tasa de infección fue del 100%. Se identificó gastritis folicular activa (grado 2/3) en Hp 10%, Hp+sal 38%, Hp+estrés 29% a las 52 semanas; 67%, 83% y 43% de gastritis no folicular a las 68 semanas, respectivamente ($p < 0.05$). Se identificaron glándulas proliferativas heterotópicas en los grupos de sinergismo desde la semana 52, con incremento en su número y tamaño en la semana 68. Las tasas proliferativas mayores se observaron en el grupo Hp+sal ($p < 0.0001$), mayor expresión de p21 en los grupos Hp+sal y Hp+estrés (ambos $p < 0.0001$) en la semana 68, sin incremento de p53. Ninguno de los animales infectados desarrolló displasia o carcinoma. El número de células en apoptosis disminuyó en las fases crónicas del experimento. Conclusión: El daño inflamatorio inducido por *H. pylori* es sinergizado por sal y estrés, así como el desarrollo de glándulas heterotópicas en la submucosa

gástrica. Administrados en forma crónica, ambos factores inducen mayor expresión de p21 independiente de p53. Sin embargo, hasta las 68 semanas ni la sola infección ni el uso de los cofactores permitió el desarrollo de adenocarcinoma gástrico.

Palabras clave: *H. pylori*, carcinogénesis, jerbos, cofactores, estrés, sal, p21, p53.

ABSTRACT

Although *H. pylori* is considered a type I carcinogen by the International Agency for the Research on Cancer (IARC/UICC), factors such as stress and salt may enhance its pathogenic potential. Aim: to determine if high-salt diet and psychological stress enhance *H. pylori* lesion in *Meriones unguiculatus*. Methods: 278 8-week-old female pathogen free gerbils were allocated to 7 groups: Hp-Sydney strain (45), 8%-higher-salt diet (38), stress (60% reduction of cage space and water immersion, 36), Hp+salt (33), Hp+stress (34), *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine* (34), and sham (58). Gerbils were sacrificed at 1(67), 12(73), 52(65), and 68(73) wks-post-infection. Sydney, Padova and Lauren's classifications were blindly used. Cell proliferation, p53, p21 and apoptosis were assessed. Results: Infection rate was 100%, follicular active gastritis (grade 2/3) was frequently observed in Hp 10%, Hp+salt 38%, Hp+stress 29% at 52 weeks and 67%, 83% and 43% at 68 weeks, respectively ($p < 0.05$). Heterotopic proliferative glands were identified in synergy groups since 52-wks with increases in its number and size by 68-wks. Higher proliferative rates were observed in Hp+salt ($p < 0.0001$) and, p21 over expression in Hp+salt and Hp+stress groups (both $p < 0.0001$) by 68-wks, without p53 increases as compared with *Hp* infected gerbils. None infected animal developed dysplasia or carcinoma. Apoptosis decreases in chronic phases. Conclusion: Salt and stress synergizes *H. pylori* induced inflammatory damage and increases the number of pseudo invasive glands. Chronically, both co-factors induce p21 over expression independent of p53 and, only salt resulted in higher cell proliferation. However, *H. pylori* alone neither salt nor stress synergized groups developed gastric carcinoma at 68-wks follow-up. **Key words:** *H. pylori*, carcinogenesis, gerbils, cofactors, stress, salt, p21, p53.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria gramnegativa que infecta el estómago de una tercera parte de la población mundial (1), con prevalencia en individuos sintomáticos de 50% en países industrializados y hasta 100% en países en vías de industrialización (2, 3). Estudios epidemiológicos han asociado su presencia con el desarrollo de gastritis, úlcera duodeno-gástrica, atrofia, metaplasia, displasia, adenocarcinoma de estómago distal y linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas (4, 5, 6, 7, 8). Los factores asociados a mayor virulencia de la bacteria son la presencia de la isla de patogenicidad *cag* (IP *cag*); una secuencia de 40-kb responsable de la síntesis de las proteínas CagA, CagE y IceA1 (9, 10, 11). Estas proteínas se han identificado en más de 60% de los aislados de pacientes con manifestaciones clínicas de enfermedad duodeno gástrica en oriente y occidente (12, 13, 14, 15), y se encuentran involucradas en el reclutamiento del cortejo inflamatorio en lámina propia a través de la producción de interleucina 8 (IL-8), y de la activación del factor nuclear kB (16, 17, 18) en el epitelio gástrico lesionado. Además, IP *cag* es responsable de la síntesis de un sistema de secreción tipo IV, que transloca la proteína CagA al interior de células epiteliales (19), y su integridad se asocia con la intensidad y extensión del daño inflamatorio en la mucosa gástrica (20).

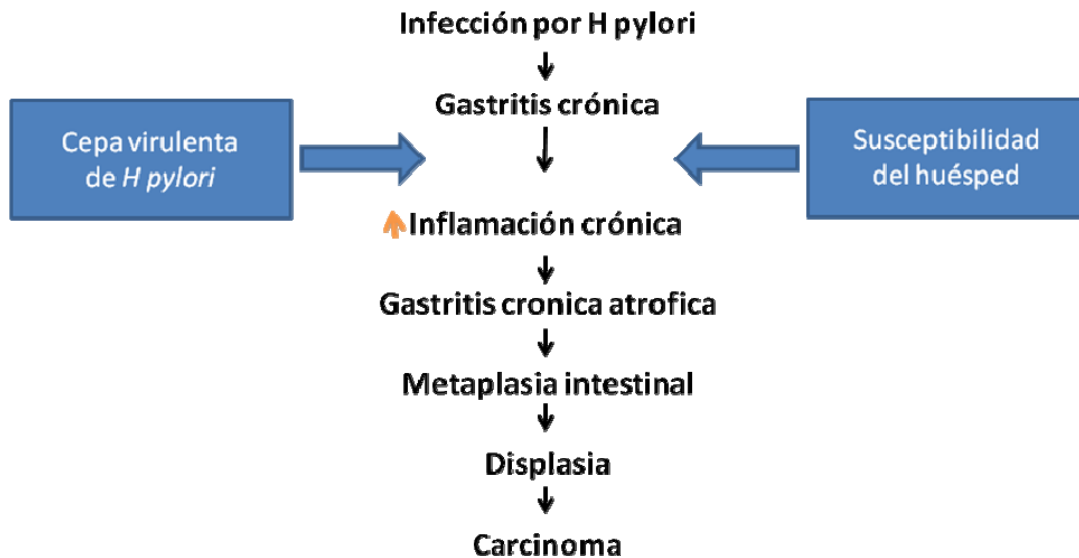
Antes de la identificación de *H. pylori*, se habían descrito en la mucosa vecina a adenocarcinomas gástricos de tipo intestinal una serie de cambios morfológicos preneoplásicos (Figura 1), que permitieron establecer un modelo de carcinogénesis gástrica en humanos (21). Posterior a su descripción, *H. pylori* ha sido considerado

como un elemento fundamental en este proceso y a la fecha es catalogado como carcinógeno tipo I (22, 23).

El adenocarcinoma gástrico es la decimocuarta causa de muerte en el mundo (23). En 1998 murieron por este padecimiento 822,000 personas y en México se registraron 5,000 decesos (24). El tipo intestinal de adenocarcinoma gástrico ha disminuido su incidencia global en países industrializados, sin embargo, se espera que se mantenga la incidencia en Latinoamérica y países con pobre saneamiento ambiental, donde se favorece la infección de la mucosa gástrica a edad temprana. En nuestra población, en fecha reciente el carcinoma gástrico persiste entre las primeras cinco causas de muerte por cáncer (25, 12, 26, 27). A pesar de que la prevalencia de gastritis por *H. pylori* en individuos mayores de 50 años es de casi 100%, el riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico es de 3.6% (IC 95% 1.8-7.3) (4), por lo que deben existir factores adicionales que coadyuven al desarrollo de lesiones neoplásicas (Figura 1). Algunos de esos factores tienen que ver con la patogenicidad de la bacteria y es probable que otros dependan de las características genéticas del huésped, de la dieta que se consuma y del ambiente (16).

El desarrollo de ulcera duodenal es inverso al del adenocarcinoma gástrico en presencia de *H. pylori* ya que entre 4-8% de pacientes infectados se presenta ulcera gástrica y en una cuarta parte de ellos ulcera duodenal (11). Portar microorganismos con el gen promotor de ulcera duodenal (*dupA*), se asocia con ulcera duodenal en 42-45% de los pacientes, así como con el desarrollo de gastritis predominantemente antral (28). Sin embargo, la asociación es variable y depende de la población analizada (29).

Figura 1. Modificación al modelo de carcinogénesis gástrica generado por Correa. Se integran como factores de importancia la presencia de cepas virulentas de *H. pylori* con integridad de la isla de patogenicidad y la susceptibilidad del huésped.



Evidencias epidemiológicas señalan que dietas ricas en sal y abundantes en nitrosaminas en personas sometidas a estrés de naturaleza diversa, se asocian al desarrollo de patología gastrointestinal, al contrario de poblaciones con ingesta de vegetales verdes, cítricos y con mínimo consumo de sal donde el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal; neoplasia asociada con antecedente de infección crónica por *H. pylori*, ha mostrado disminución de su incidencia (23).

La dieta rica en sal es considerada como inductora de gastritis y proliferación de células epiteliales en animales de experimentación (30). Además, en un modelo de ratones se evidenció que en presencia de dieta rica en sal existió mayor colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori*, así como distorsión estructural de la mucosa y

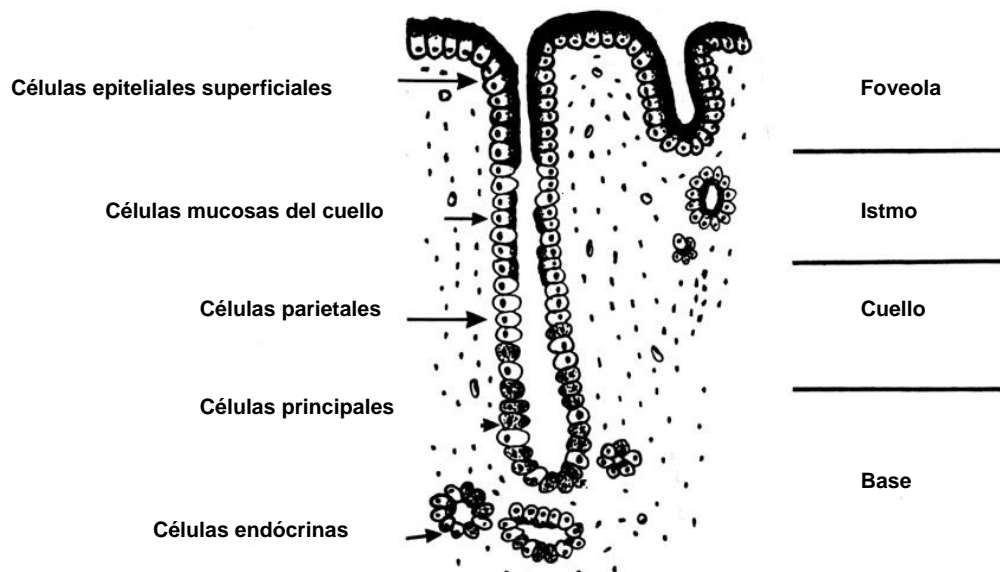
disminución de células oxínticas (30). El experimento duró solo 16 semanas y no analizó los cambios crónicos inducidos por la sal, ni el sinergismo de sal y la infección por *H. pylori*.

Los modelos de estrés físico y psicológico en animales de experimentación inducen úlceras gástricas y, en presencia de infección por *Helicobacter felis*, mayor lesión de la mucosa (31, 32). También en este caso se carece de información que revele el grado de sinergismo del estrés con la bacteria (32).

Se han utilizado diversos animales para tratar de reproducir el modelo hipotético de la carcinogénesis gástrica del humano (33). Algunas especies han resultado modelos poco factibles debido a su tamaño y en otras, los cambios de la mucosa gástrica son limitados y rara vez tienen como resultado el desarrollo de cáncer gástrico (33). En 1998 se informó el modelo de infección en jerbos que ha mostrado generar con mayor frecuencia y en menor tiempo, la secuencia de cambios morfológicos observados en la mucosa vecina a carcinomas gástricos en humanos (34, 35). El carácter causal del *H. pylori* en el adenocarcinoma de tipo intestinal ha quedado demostrado en estudios realizados en Japón (34, 36), y en fecha reciente se ha documentado en occidente con el uso de cepas patogénicas de la bacteria (37, 38). En ninguno de los estudios se ha identificado extensión de la neoplasia epitelial mas allá de la pared gástrica y no se han documentado metástasis a distancia. Es indispensable explorar este modelo de carcinogénesis gástrica adicionado con factores dietéticos, químicos y de estrés, epidemiológicamente asociados con adenocarcinoma gástrico y analizar la cinética celular y de la bacteria en diversas fases de la infección.

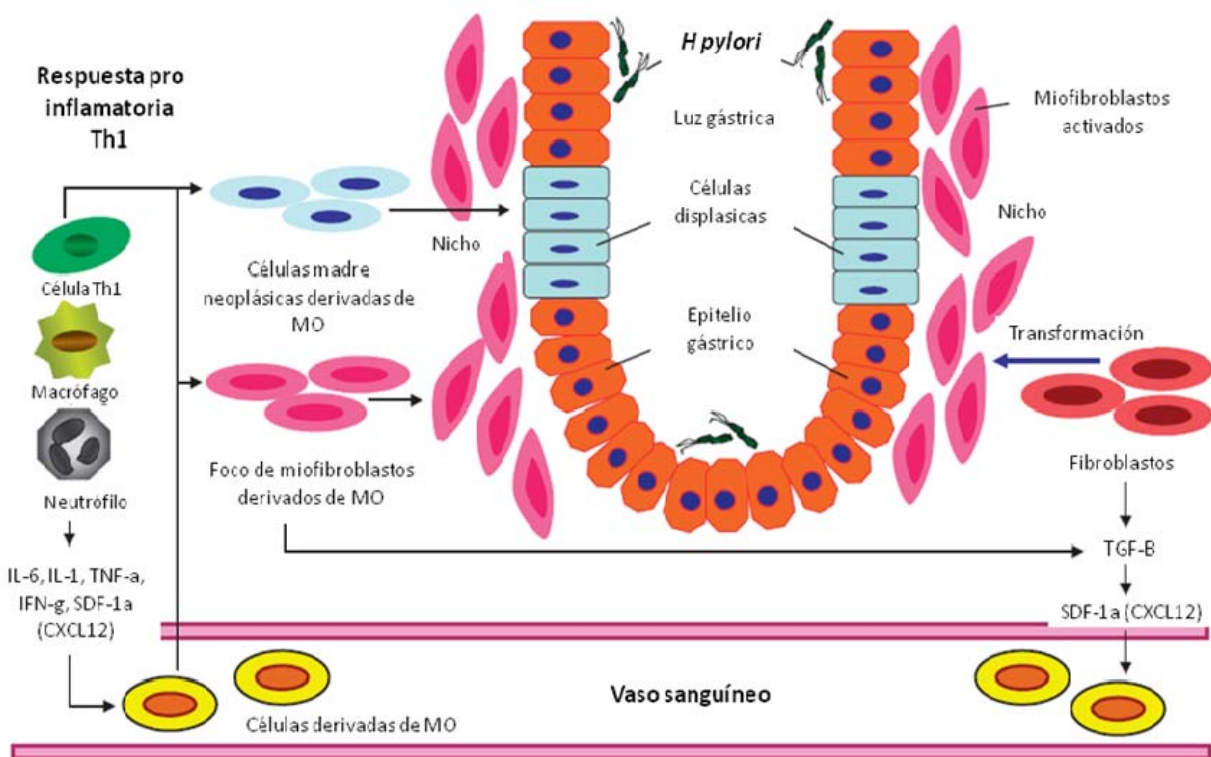
Las células epiteliales de la mucosa oxintica gástrica se originan en el cuello de las glándulas y se diferencian al migrar hacia la superficie de la mucosa y base de las glándulas (39). Las células del cuello son multi potenciales y a partir de ellas se originan células secretoras, principales, parietales y endocrinas (Figura 2). Tradicionalmente se ha considerado que son las células del cuello de las glándulas las que acumulan los cambios genéticos que preceden al desarrollo de lesiones preneoplásicas (21, 40). Las células progenitoras en el antro se localizan en la base de las glándulas y sus descendientes migran y se diferencian unidireccionalmente hacia la superficie.

Figura 2. Los diferentes compartimientos de la mucosa gástrica rodeada por lámina propia. La región del cuello alberga células de reserva con capacidad de diferenciación a células de las regiones foveolar, del istmo y base en que se encuentran las glándulas. Este esquema se circunscribe a la mucosa oxintica del estómago.



Una fuente adicional de precursores en el ambiente inflamatorio de lámina propia son las células emigrantes derivadas de medula ósea integradas en la mucosa gástrica. En modelos animales, dichas células terminalmente diferenciadas pueden ser precursores de carcinomas (41, 42). No hay evidencia de que esta vía se presente en humanos y únicamente se ha documentado en modelos transgénicos (Figura 3).

Figura 3. En presencia de inflamación crónica en lámina propia, la destrucción del epitelio favorece la migración e integración de células madre derivadas de medula ósea a la mucosa gástrica. La influencia durante largos periodos de infección por *H. pylori*, puede condicionar la progresión displásica de dichas células integradas.



Uno de los cambios preneoplásicos más tempranos e identificables en forma confiable es la metaplasia intestinal, que se ve precedida por eventos de inflamación crónica y atrofia gástrica (40). La metaplasia intestinal es fácilmente reconocible y corresponde a la sustitución del epitelio gástrico por células columnares y/o caliciformes productoras de moco ácido con histoquímica convencional (39). Este cambio morfológico es precedido por notables alteraciones del ciclo celular epitelial, caracterizado por aumento de las tasas proliferativas y modificaciones del estado funcional de la proteína p53 y su efector p21 (43, 44).

En forma concomitante, el índice de apoptosis en las células epiteliales se modifica y en lesiones de largo tiempo de evolución se reduce, permitiendo la presencia de un número mayor de células en la mucosa gástrica (43). Las alteraciones en la proliferación y muerte de las células son cambios constantes en enfermedades neoplásicas. Se ha informado que la mucosa antral de los jerbos exhibe aumento de proliferación en el cuello de las glándulas con disminución de apoptosis en presencia de *H. pylori CagA +* (45), estas modificaciones facilitarían la perpetuación de daños al material genético y teóricamente, mayor migración de células derivadas de la medula ósea a los diversos nichos de la mucosa gástrica (46).

JUSTIFICACION

A pesar de que el adenocarcinoma gástrico ha disminuido su incidencia, continúa siendo la catorceava causa de muerte en el mundo. Únicamente en México ocurrieron casi 5,000 decesos por esta enfermedad en 1998. Las cifras del Registro Histopatológico de Neoplasias en 2001 ubica los carcinomas de cuello del útero (24.4%), piel (13.6%), mama (11%), próstata (6%) y estómago (3%), como las principales neoplasias malignas en población mexicana. Sin embargo, estudios epidemiológicos usando datos del INEGI y de muestreos serológicos nacionales, ubican la mortalidad por cáncer gástrico en 6.5 casos x 100 000 habitantes (47, 48) y al alza, en contraste con países con adecuado saneamiento ambiental.

Los muestreos serológicos indican que en nuestra población la infección por *H. pylori* se adquiere en la infancia y que alrededor de los 20 años, más de 70% de la población la padece (49, 50). Los factores asociados con mayores frecuencias de infección son pobreza, nivel escolar bajo y hacinamiento; semejante a otros países en vías de industrialización (51, 52, 53).

Es importante conocer si factores dietéticos (sal) o estilos de vida (estrés) favorecen el desarrollo de adenocarcinoma gástrico en presencia de *H. pylori cag+* para modificar oportunamente el curso clínico de las lesiones preneoplásicas en el estómago de aquellos grupos en riesgo. No existe información de modelos animales que describan el sinergismo de la infección por *H. pylori cag+* con dieta alta en sal o con estrés en la génesis de lesiones preneoplásicas o neoplásicas en estómago. Tampoco se conoce si la presencia de microambientes específicos modifican la expresión de la isla de patogenicidad *cag* en *H. pylori*.

OBJETIVO GENERAL

Establecer el carácter sinérgico de la adición de estrés o dieta alta en sal en la infección por *H. pylori* en jerbos

OBJETIVOS

Definir si *H. pylori* es un carcinógeno tipo I similar a *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina*.

Identificar si el efecto carcinogénico de *H. pylori* se potencia con dos factores predisponentes de cáncer gástrico (dieta alta en sal y estrés).

Caracterizar las alteraciones de la proliferación de las células epiteliales gástricas en presencia de *H. pylori* y de las maniobras de sinergismo.

Identificar modificaciones de la virulencia de la bacteria en un modelo animal de un año de duración.

HIPÓTESIS NULA

El efecto carcinogénico de *H. pylori* será semejante al de *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina*.

El efecto carcinogénico de *H. pylori* será semejante cuando se agregue dieta rica en sal o estrés.

Las alteraciones de la proliferación epitelial serán semejantes en todos los grupos.

No existirán modificaciones de la virulencia de la bacteria.

HIPÓTESIS ALTERNATIVA

El efecto carcinogénico de *H. pylori* será diferente al de *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina*.

El efecto carcinogénico de *H. pylori* será diferente cuando se agregue dieta rica en sal o estrés.

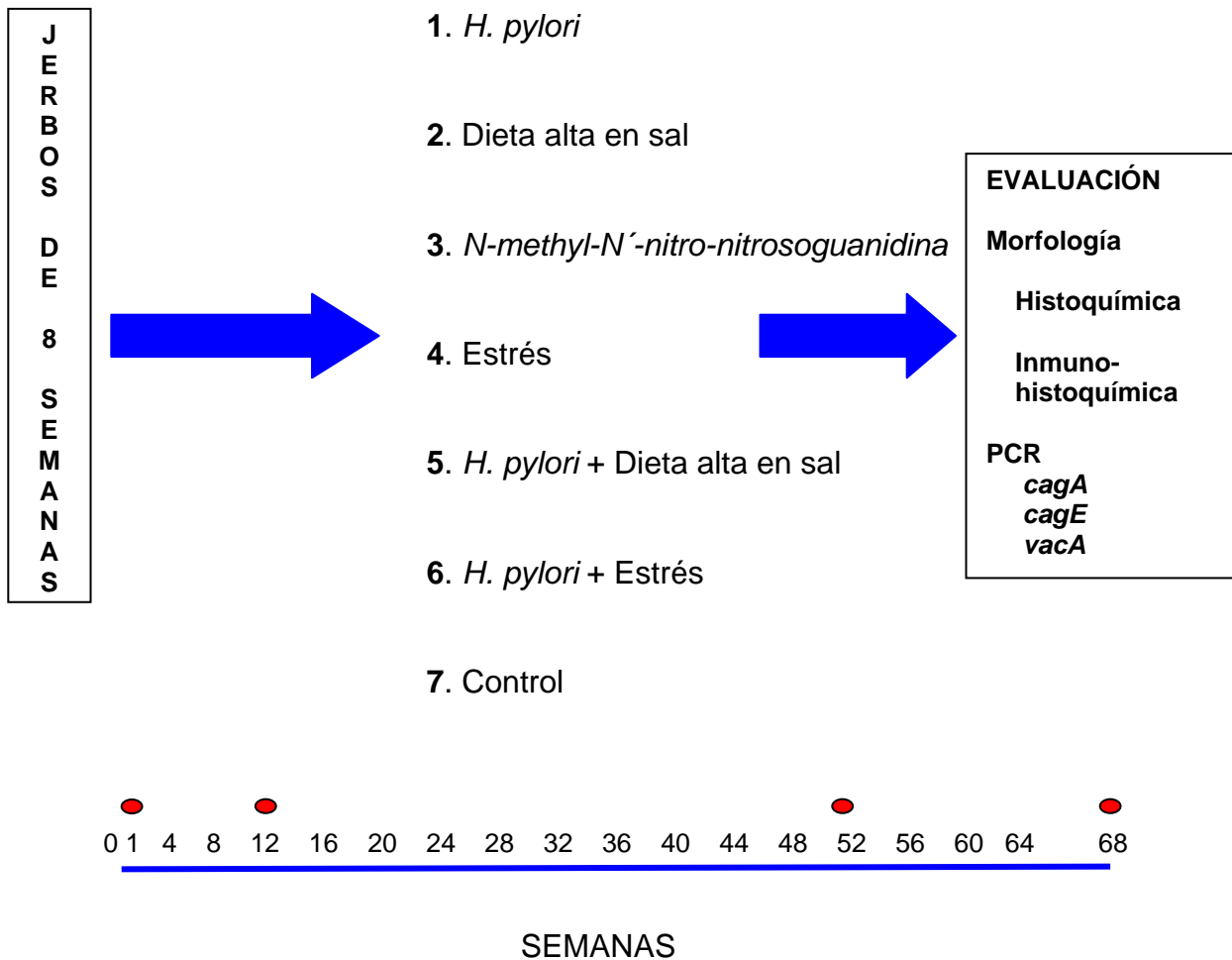
Las alteraciones de la proliferación epitelial serán diferentes en todos los grupos.

Existirán modificaciones de la virulencia de la bacteria.

MATERIALES Y METODOS

Diseño:

Prospectivo, longitudinal, comparativo y experimental.



- Fases de sacrificio (1, 12, 52 y 68 semanas post infección).

Esquema global que resume las maniobras del proyecto.

Animales:

Se utilizaron 350 jerbos (*Meriones unguiculatus*) hembra de 8 semanas de vida y libres de patógenos, ubicados en microaisladores de piso alto con agua y comida *ad libitum* en condiciones controladas de temperatura. Se conformaron grupos de 50 animales que se sacrificaron aleatoriamente en lotes de 10 por grupo en las semanas 1, 12, 52 y 68. Aquellos animales ubicados en los grupos de inoculación con *H. pylori* fueron sometidos a escrutinio de heces mediante PCR para búsqueda de la bacteria una vez por semana durante el primer mes hasta su identificación.

Grupo *H. pylori*:

Todos los animales se mantuvieron en ayuno las 24 horas previas a la inoculación. Bajo sedación con ketamina/xilacina se realizó inoculación intragástrica de una suspensión de *H. pylori* (cepa Sydney estandarizada *cagA+*, *vac+*) (51), a una concentración de 1×10^9 UFC en solución salina en el tiempo cero utilizando una cánula flexible. La confirmación de la infección gástrica se realizó en heces mediante la identificación de 16sRNA y *CagA*.

Este grupo permitió evaluar la capacidad de la bacteria en la génesis de cambios epiteliales, inflamatorios, preneoplásicos y neoplásicos.

Grupo dieta rica en sal:

Los animales recibieron dieta alta en sal (Harlan S. A. México, 8% de NaCl) a partir del tiempo cero y continuaron con la misma hasta las fechas establecidas de sacrificio. El exceso de sal se administró en las croquetas utilizadas para su alimentación, preparadas con un 8% mayor de sal que la dieta regular.

Fue el grupo que mostró la capacidad aislada de la sal como inductora de cambios epiteliales preneoplásicos.

Grupo *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina*:

Todos los animales de este grupo recibieron *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina* (NMNNG, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), disuelta en agua (50 mg/L) que se colocó en bebederos con protección de aluminio para la luz. La solución se preparó una vez por semana y se proporcionó *ad libitum* utilizando bebederos metálicos anti derrame.

Control positivo para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Permitió contrastar el peso específico de *H. pylori* con un carcinógeno químico estándar.

Grupo estrés:

Los animales de este grupo fueron puestos en contenedores con superficies cúbica 50% menor que el resto de los animales. Esta maniobra se realizó aumentando la cama para disminuir espacio vertical y usando cubos para disminuir la base. Las consecuencias del estrés se midieron al evaluar la formación de nidos y la pérdida de la territorialidad de los hábitos de alimentación y eliminación de heces y orina. Los grupos de 52 y 68 semanas fueron sometidos adicionalmente a inmersión en aguda en días aleatorios para evitar adaptación e inducir estrés físico.

Fue el grupo que mostró la capacidad aislada del estrés como inductor de cambios epiteliales gástricos.

Grupo *H. pylori* + dieta rica en sal.

Se adicionaron las indicaciones como ya se ha establecido.

Este grupo demostró el sinergismo de la bacteria y la sal en la carcinogénesis gástrica.

Grupo *H. pylori* + estrés

Se adicionaron las condiciones como ya se ha establecido. Se registró si los animales eran capaces de formar la nidada y la territorialidad en la eliminación de excretas. Este grupo demostró el sinergismo de la bacteria y el estrés en la carcinogénesis gástrica.

Grupo control:

Animales de la misma familia con alimento estándar y agua *ad libitum*.

Es el control negativo que permitió definir la normalidad en la mucosa gástrica del jerbo.

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

Se obtuvieron heces de cada uno de los animales que fueron enjuagadas y centrifugadas para obtener un paquete celular, usando el método de extracción del DNA con tiocianato de guanidina, se procedió como se explica en la determinación de *H. pylori* en mucosa gástrica.

Determinación de *H. pylori* en mucosa gástrica mediante PCR.

Se realizó extracción de DNA con la técnica de tiocianato de guanidina. El DNA purificado fue sometido a PCR semi anidada utilizando los siguientes iniciadores para la determinación del gen *16S rRNA* (ver apéndice 1).

Se realizó electroforesis del producto amplificado en gel de agarosa al 2%, se visualizó y fotografió bajo luz UV utilizando el programa de análisis “Molecular Imaging”. Los productos del gen fueron transferidos a una membrana en la que se utilizó Southern blot para la confirmación de resultados.

Tejido:

Posterior al sacrificio de los animales se realizó gastrectomía total utilizando material desechable en cada procedimiento para evitar contaminación. El estómago se abrió siguiendo la curvatura mayor y se realizaron cortes longitudinales que incluían mucosa glandular oxíntica y no oxíntica. Cada fragmento tuvo un grosor promedio de 0.5cm. Una mitad del estómago se fijó en formol amortiguado al 10% para incluir en parafina y procesar para obtener preparaciones histológicas, la otra mitad se conservó a -70°C para los estudios moleculares.

En las laminillas teñidas con hematoxilina eosina (HE), se seleccionaron las áreas con mayor grado de lesión y el fragmento se transfirió a un nuevo bloque que reunía los representativos de cada animal. Este bloque de parafina permitió realizar cortes en blanco para inmunohistoquímica y TUNEL.

Determinación de índice de proliferación celular, apoptosis y estado de p53/p21:

Se realizaron tinciones de inmunohistoquímica en tejido desparafinado para proteína p53, p21 y antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) mediante el método de avidina-biotina-peroxidasa (Ventana Medical System, Tucson, AZ), utilizando sistema automatizado de tinción (Ventana Medical System, Inc. Tucson, AZ). Se

utilizaron anticuerpos primarios que previamente mostraron reactividad en tejido de jerbo, estandarizados en nuestro laboratorio con las condiciones propuestas (clona PC10 para PCNA, clona SX118 para p21 y clona DO-7 para p53, Dako A/S, Denmark). Se utilizaron cortes de amígdalas como control positivo para la reacción de p21 y PCNA, y de adenocarcinoma de colon para proteína p53. En todos los casos se tuvieron controles negativos al omitir el paso que agrega el anticuerpo específico al procedimiento rutinario de marcaje. El procedimiento incluyó rescate antigénico de acuerdo a las especificaciones del proveedor, bloqueo de peroxidasa endógena, preincubación, lavado con PBS, incubación con el anticuerpo específico, revelado con diaminobencidina y montado.

La apoptosis se midió *in situ* en las células epiteliales utilizando cortes seriados de aquellos en los que se midió la proliferación, con la técnica de desoxinucleotidil transferasa terminal mediante marcaje de trifosfatos de desoxiuridina terminales (TUNEL) como se ha descrito previamente (52) (ApopTag Plus, Intergen Co.).

Evaluación:

Personal. Las biopsias fueron revisadas por un patólogo con experiencia en la evaluación de tejido gástrico en animales y humanos. Se le proporcionaron lotes de un máximo de diez laminillas por día.

Ceguedad. Las laminillas se identificaron con números aleatorios que impidieron conocer el grupo al que pertenecían.

Morfología. Se utilizó la escala visual análoga de Sydney actualizada (53) para identificar y asignar grados de inflamación aguda y crónica, atrofia y metaplasia. La

clasificación de Padua para displasia gástrica normó la subclasificación de ésta categoría (54).

La evaluación morfológica se realizó teniendo como referencia los siguientes criterios de lesión:

Inflamación. Presencia de polimorfonucleares, eosinófilos, linfocitos, células plasmáticas e histiocitos en lámina propia de tubo digestivo anterior en mayor cantidad que en la mucosa normal. Se anotó el tipo de respuesta inflamatoria, la constitución celular y el sitio de afección en mucosa o submucosa. Se evaluó cualquier lesión del epitelio superficial, foveolar o glandular, así como la agregación de células inflamatorias alrededor de cualquier estructura mucosa.

Hiperplasia. Es un proceso de adaptación en el que las células proliferantes son normales. Los casos de hiperplasia grave se caracterizan por glándulas revestidas por células epiteliales inmaduras y sobrepuestas con núcleos de localización basal con hiper cromasia, basofilia citoplasmática y volumen citoplasmático reducido, que maduran conforme migran a las zonas superficiales. Este cambio no fue gradificado sin embargo, se consideró su localización (epitelio superficial, foveolar y/o glandular) y la extensión del mismo. Se clasificó subjetivamente como leve, moderado o grave.

Atrofia. Se diagnostica cuando las foveolas gástricas ocupan menos de 50% de la mucosa del cardias, menos de 15% de la mucosa del cuerpo y fondo gástrico, y menos de 50% del espesor de la mucosa antral. Debido a que la medición del grosor absoluto de la mucosa depende por completo de la orientación

perpendicular del corte, la presencia de atrofia se estableció subjetivamente. Las guías para dicha gradificación son las publicadas por Lewin y cols (55)

Metaplasia. Es el cambio de un epitelio maduro por otro con maduración normal. Para fines del estudio la presencia de células columnares no absortivas, células caliciformes y/o células de Paneth en estómago. La metaplasia se describió de acuerdo al tipo y la extensión gradificada como mínima, moderada o extensa. Se consideró la distribución de la metaplasia y en caso de metaplasia intestinal se determinó el tipo de mucina (sialomucina o sulfomucina) utilizando azul alciano a pH 2.5 y tinciones de hierro coloidal. La metaplasia se definió como completa o incompleta de acuerdo a su semejanza con el epitelio del intestino delgado o grueso respectivamente (56).

Displasia. Alteración de la maduración del epitelio con cambios citológicos y estructurales en la mucosa del tubo digestivo anterior, en ausencia de inflamación moderada o grave. El epitelio gástrico displásico posee las siguientes características: a) proliferación celular aumentada, b) morfología anormal y pleomorfismo celular, c) desarreglo estructural de las glándulas y d) cambios estromales. Las características citológicas de displasia epitelial (hipercromasia nuclear con la cromatina en grumos gruesos, relación núcleo/citoplasma alta, extensión de los núcleos a la mitad luminal de las células epiteliales e incremento en el tamaño nuclear) fueron evaluadas y gradificadas como de alto o bajo grado.

Adenocarcinoma. Células neoplásicas que rebasen la membrana basal del epitelio e infiltren el estroma de la lámina propia o la pared del estómago. Las lesiones se clasificaron atendiendo al modelo propuesto por Laurén (57).

Proliferación y apoptosis.

Se realizó índice de proliferación celular al contar las células epiteliales con marca nuclear en 10 glándulas bien orientadas en cuerpo/antro gástrico para el anticuerpo PCNA. En forma semejante se estableció un índice de apoptosis en antro y cuerpo gástrico con TUNEL. Los resultados se expresaron como valores promedio de PCNA y TUNEL por glándula en cada uno de los animales.

Sobre expresión de p53 y p21

La reacción se consideró positiva cuando más de 5% de las células epiteliales en cada glándula bien orientada mostraban reactividad nuclear. Se realizó el conteo de los núcleos positivos en 10 glándulas de antro/cuerpo. En cada caso se obtuvo un valor promedio para cada animal.

ANÁLISIS

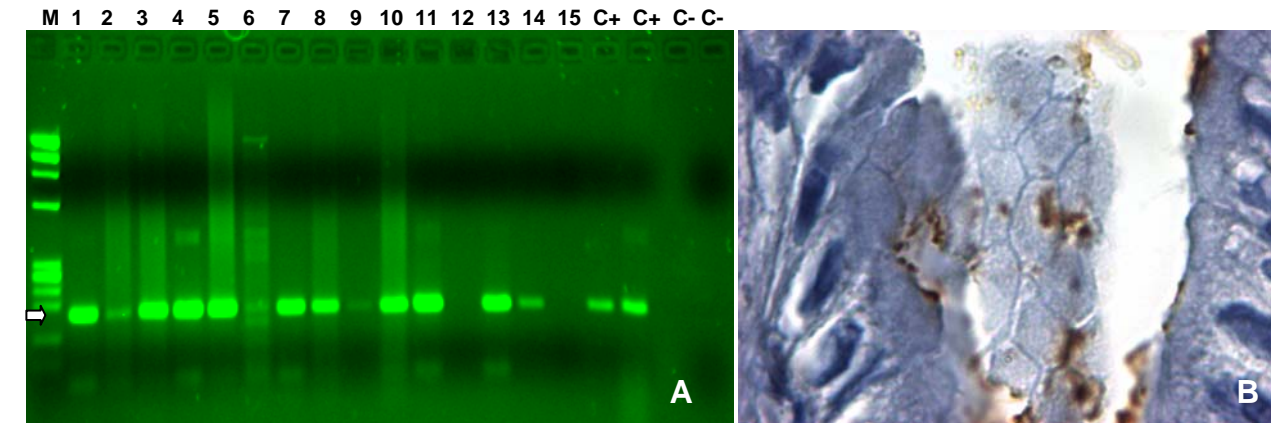
Los resultados se analizaron utilizando medidas de tendencia central y dispersión, gráficas de cajas y lineales. El análisis univariado de las variables categóricas se realizó utilizando X^2 y prueba exacta de Fisher. Las variables ordinales se analizaron utilizando la prueba U de Mann-Whitney. El cálculo de riesgo se realizó mediante regresión logística condicionada. Todas las comparaciones se realizaron a dos vías considerando significativa $p < 0.05$. Se utilizó el paquete Statistica 4.0 para Windows.

RESULTADOS

Colonización

El ADN extraído de las heces colectadas en los micro-aisladores mostraron una banda de 352 pb que evidenció la presencia de *cag A* por PCR en los grupos de animales inoculados (Figura 1a). Todos los animales inoculados mostraron estructuras bacilares irregulares en la superficie mucosa que se tiñeron de color café ocre en la inmunohistoquímica para *H. pylori* (Figura 1b). La tasa de infección fue del 100% y no fue necesario re-inocular.

Figura 1. Confirmación de colonización por *H. pylori*. La presencia de una banda de 362 pb identifica la expresión de *cagA* en heces (A). Estructuras bacilares café ocre en el moco superficial del antro identifica *H. pylori* por inmunohistoquímica (B; 1000X).



M	Marcador de peso molecular.
1, 2, 3	Hp, Hp+sal, Hp+estrés, grupos de la fase 1.
4, 5, 7	Hp, Hp+sal, Hp+estrés, grupos de la fase 2.
6	Animales con ingesta de sal sin inoculación.
8, 9, 10	Hp, Hp+sal, Hp+estrés, grupos de la fase 3.
12	Animales sometidos a estrés sin inoculación.
11, 13, 14	Hp, Hp+sal, Hp+estrés, grupos de la fase 4.
C+	Control positivo
C-	Control negativo

Desarrollo de estrés

La distribución de las heces (zonal o difusa en el espacio de micro aisladores), la presencia de lesiones en piel, número de casos de muerte prematura y canibalismo se usaron como indicadores de estrés (Figura 2). El número de eventos registrados fue principalmente observado en los animales sometidos a estrés durante 52 y 68 semanas.

Figura 2. Lesión cutánea en cara, cola y lomo indicativos del desarrollo de estrés en animales sometidos a reducción de espacio e inmersión en agua.



Lesiones morfológicas en mucosa gástrica.

Los cambios inflamatorios en la mucosa gástrica fueron divididos en aquellos mediados por polimorfonucleares (gastritis aguda) o por linfocitos y células plasmáticas (gastritis crónica). El infiltrado crónico con formación de folículos con centros germinales se categorizó como gastritis crónica folicular. La lesión a los diversos compartimientos de la mucosa, así como la densidad del infiltrado inflamatorio se usaron para gradificar la intensidad de lesión inflamatoria.

Se identificó inflamación crónica con destrucción glandular (grado 2) o con erosión y ruptura del epitelio superficial (grado 3), predominantemente en los grupos infectados con *H. pylori*. Los animales que recibieron NMNNG mostraron infiltrado inflamatorio con desarrollo de úlceras (grado 3) en la primera y doceava semanas de iniciada su administración. En la fase 4 del grupo con carcinógeno, se observó leve inflamación y los cambios más frecuentes en dichas fases fueron observados en el epitelio y su progresión a displasia. Los animales sometidos a estrés presentaron lesiones inflamatorias hasta la semana 68 con aumento en grado en el último periodo del experimento, en menor grado en los animales que consumieron dieta alta en sal. La presencia de daño inflamatorio agudo se identificó en las fases más tempranas en los animales sometidos a infección más estrés o dieta alta en sal. Los grados mayores de gastritis aguda se identificaron en esos grupos pero hasta la semana 52 y 68 (Figura 3 y 4). Los cambios no fueron significativos cuando se comparan con el grupo de gerbos inoculados; sin embargo, fue mayor el grado de lesión inflamatoria en los grupos de sinergismo.

Figura 3. Gastritis aguda. No se identificó infiltración polimorfonuclear en los animales control negativo y fue mínima en aquellos sometidos a estrés y dieta alta en sal. Los mayores grados de inflamación se encontraron en los animales infectados. En los grupos de sinergismo la inflamación apareció desde la primera fase en contraste con el grupo de solo *Helicobacter pylori*. Los grados de inflamación aguda fueron más altos en las fases crónicas del experimento.

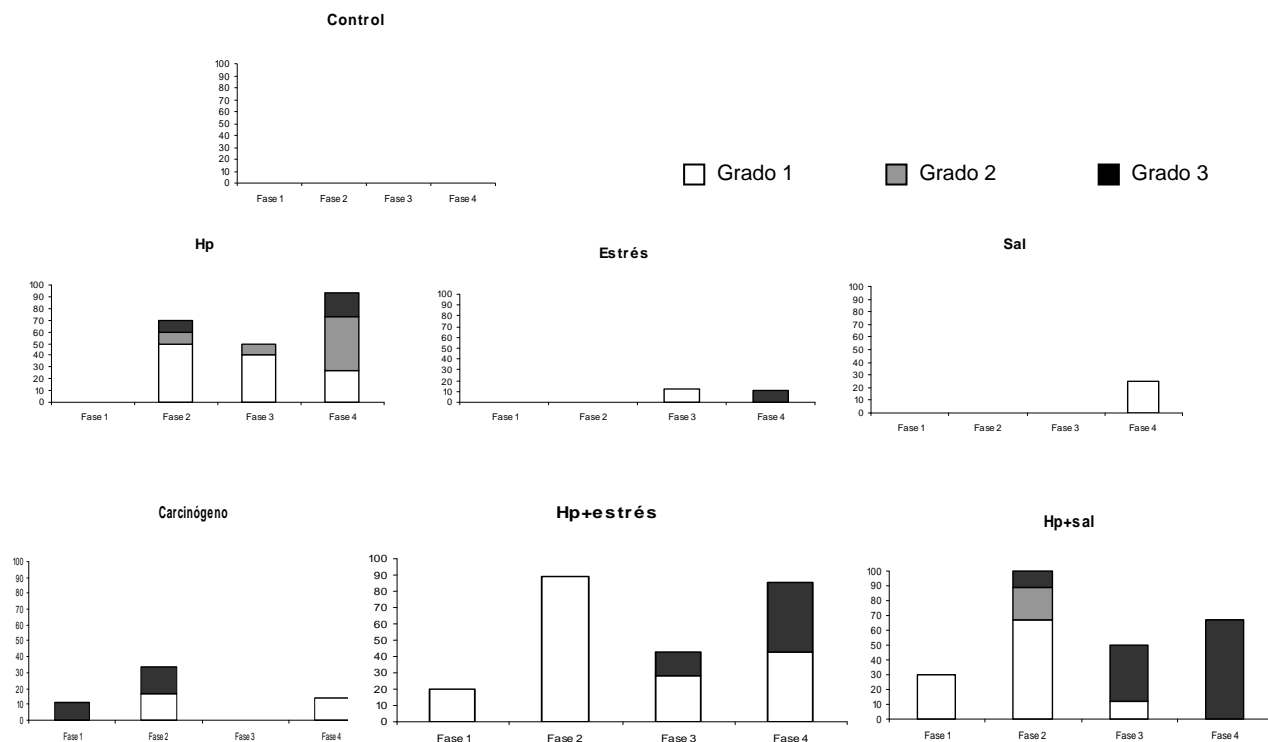
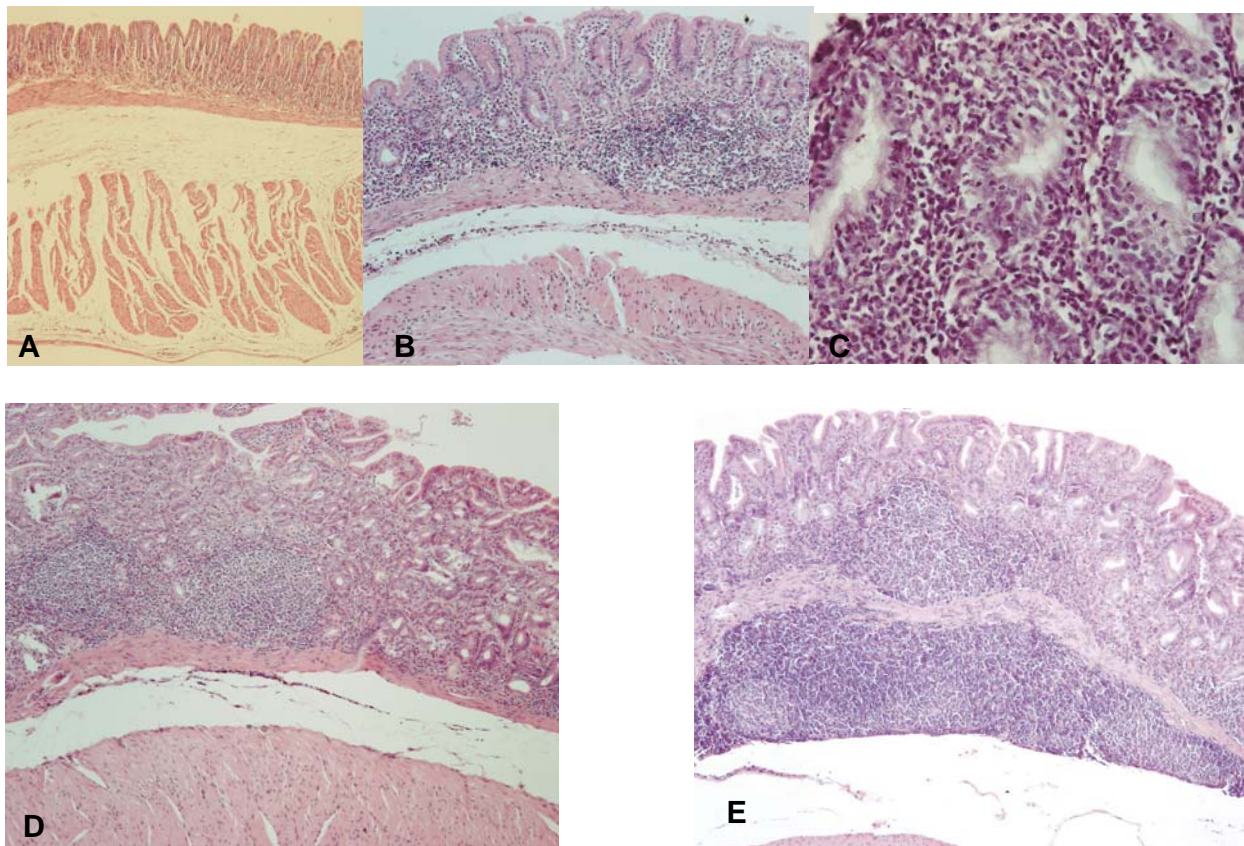
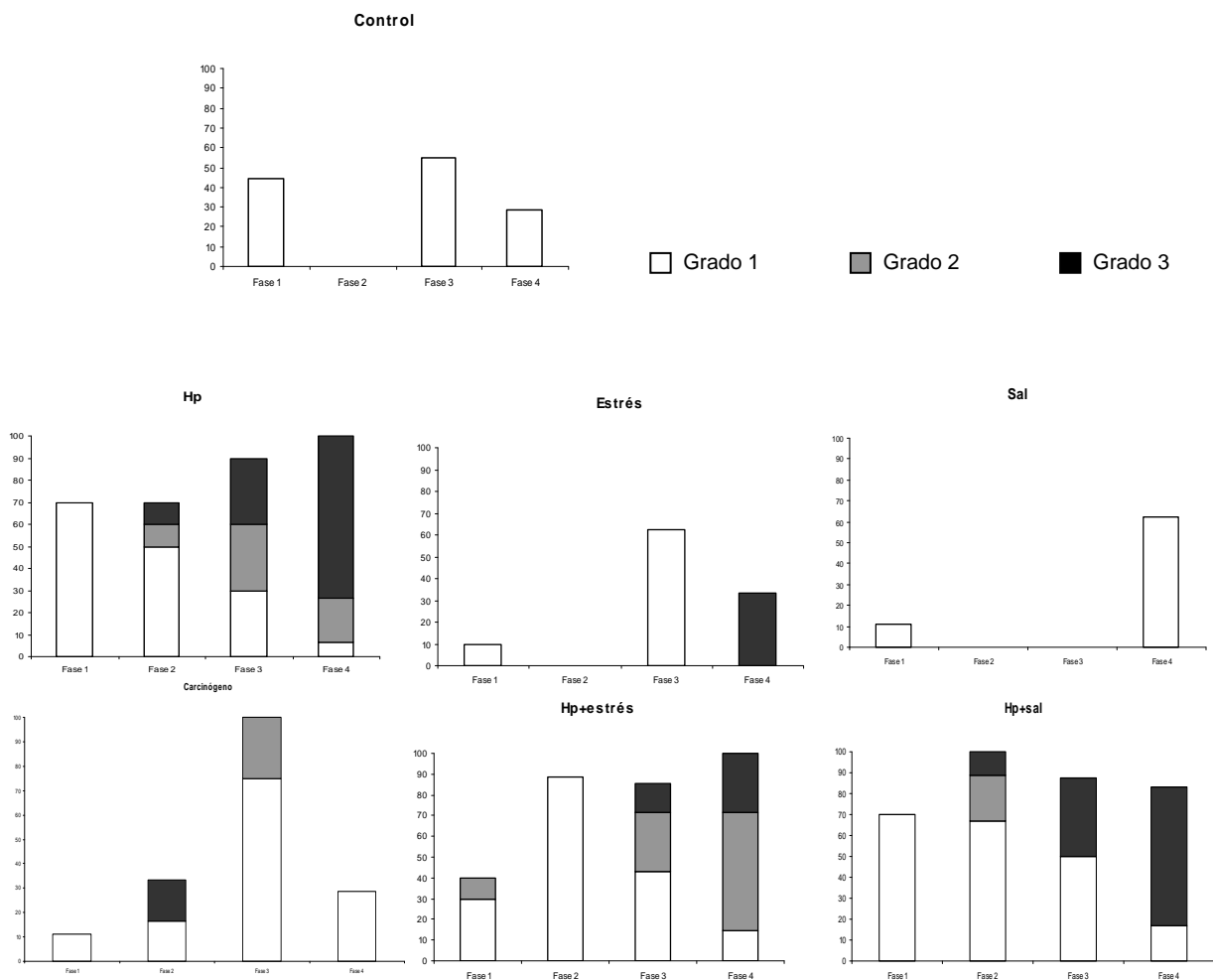


Figura 4. Morfología de gastritis aguda y crónica con y sin formación de cúmulos linfoides. Los cortes de la pared gástrica (A-E), muestran denso infiltrado inflamatorio agudo y crónico con migración trans epitelial (C) y arreglo vagamente nodular del infiltrado inflamatorio crónico (C, D). A: Control, B y C: Infectados fase 2 y 3. D: Hp+sal, E: Hp+estrés. HE 200X y en C 400X.



En 21 animales control se identificó mínimo infiltrado inflamatorio crónico. Los casos de gastritis crónica grado 2 se identificaron más tempranamente en el grupo Hp+estrés. La intensidad de la inflamación crónica fue similar entre los animales infectados sin maniobras de sinergismo y aquellos adicionados con estrés y dieta alta en sal (Figura 5).

Figura 5. Gastritis crónica. La inflamación linfoplasmocitaria grado 2 y 3 se identificó desde las 12 semanas de infección (Fase 2) en los animales infectados y desde la semana 1 (Fase 1), en el grupo de animales infectados y adicionados con estrés. No se identificó sinergismo en la densidad del infiltrado inflamatorio al agregar sal a los animales infectados. Se pudo apreciar infiltrado linfoplasmocitario mínimo en lámina propia de animales control negativo.

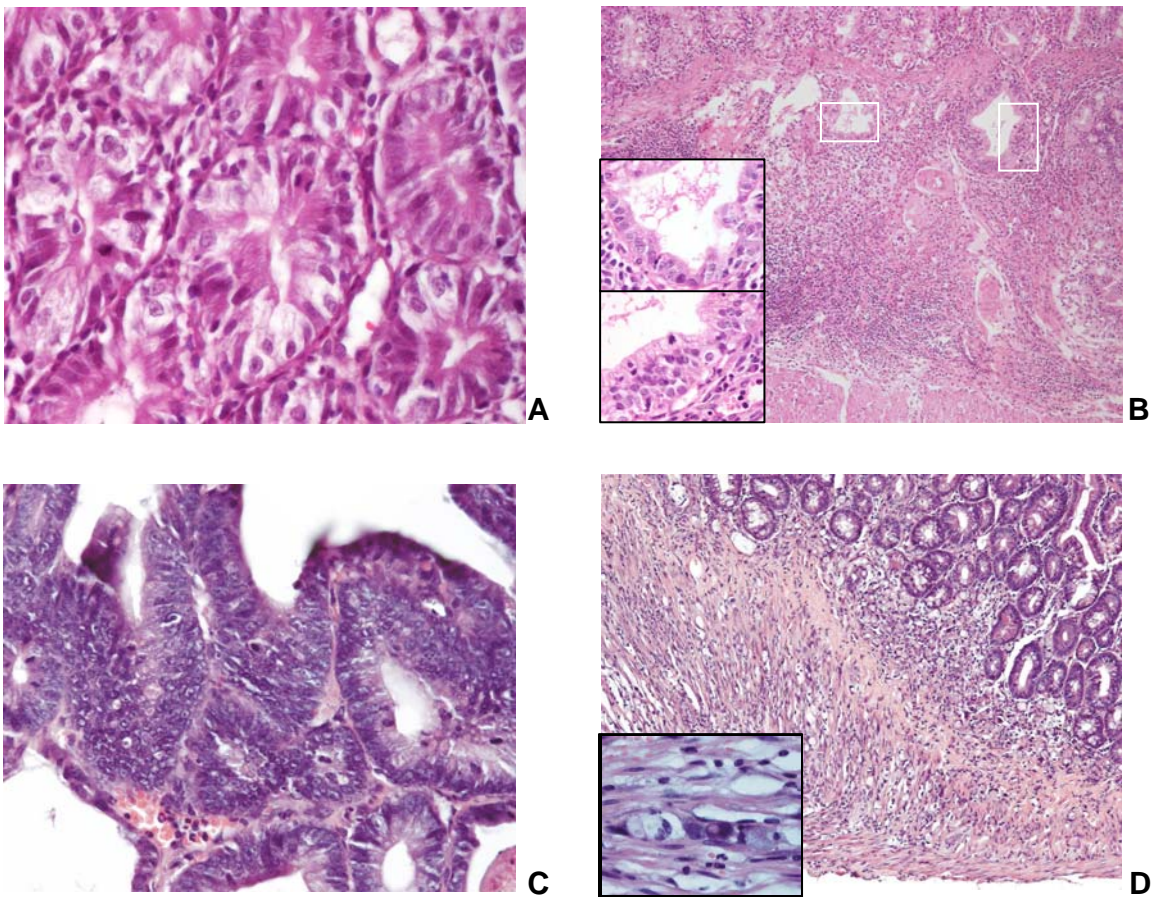


La gastritis crónica folicular; hallazgo considerado patognomónico de la infección por *H. pylori*, se reprodujo en los animales inoculados. Los casos con actividad moderada/intensa (grados 2 o 3), se identificaron en las fases tardías de la infección y con mayor frecuencia en los grupos de sinergismo: Hp 10% de animales, Hp+sal 38% de animales y Hp+estrés 29% en la semana 52; y en 67%, 83% y 43% de animales con la lesión en los grupos respectivos a las 68 semanas ($p < 0.05$, ver figura 4D).

Los animales no infectados sometidos a estrés únicamente desarrollaron gastritis crónica grado 3 hasta la semana 68; en las fases previas, el grado de inflamación crónica no fue diferente del identificado en los animales control. El grupo de animales sometido a dieta sódica mayor presentaron grados mínimos de gastritis crónica y los que recibieron carcinógeno químico desarrollaron mayor inflamación en la semana 12 con reducción posterior de la intensidad (Figuras 5).

Se identificaron alteraciones en la maduración típicas de displasia epitelial a las 12 semanas en los animales suministrados con NMNNG, dichos cambios aumentaron de grado en fases subsecuentes y un jerbo presentó un carcinoma difuso con células en anillo de sello que invadía extensamente la pared gástrica, con diseminación por contigüidad a la adventicia pancreática (Figura 6). La evolución esperada de metaplasia intestinal completa, metaplasia intestinal incompleta, displasia (leve/moderada/grave) y desarrollo de adenocarcinoma intestinal no se reconoció ni en los animales del grupo control positivo, ni en los infectados y adicionados con sal o estrés.

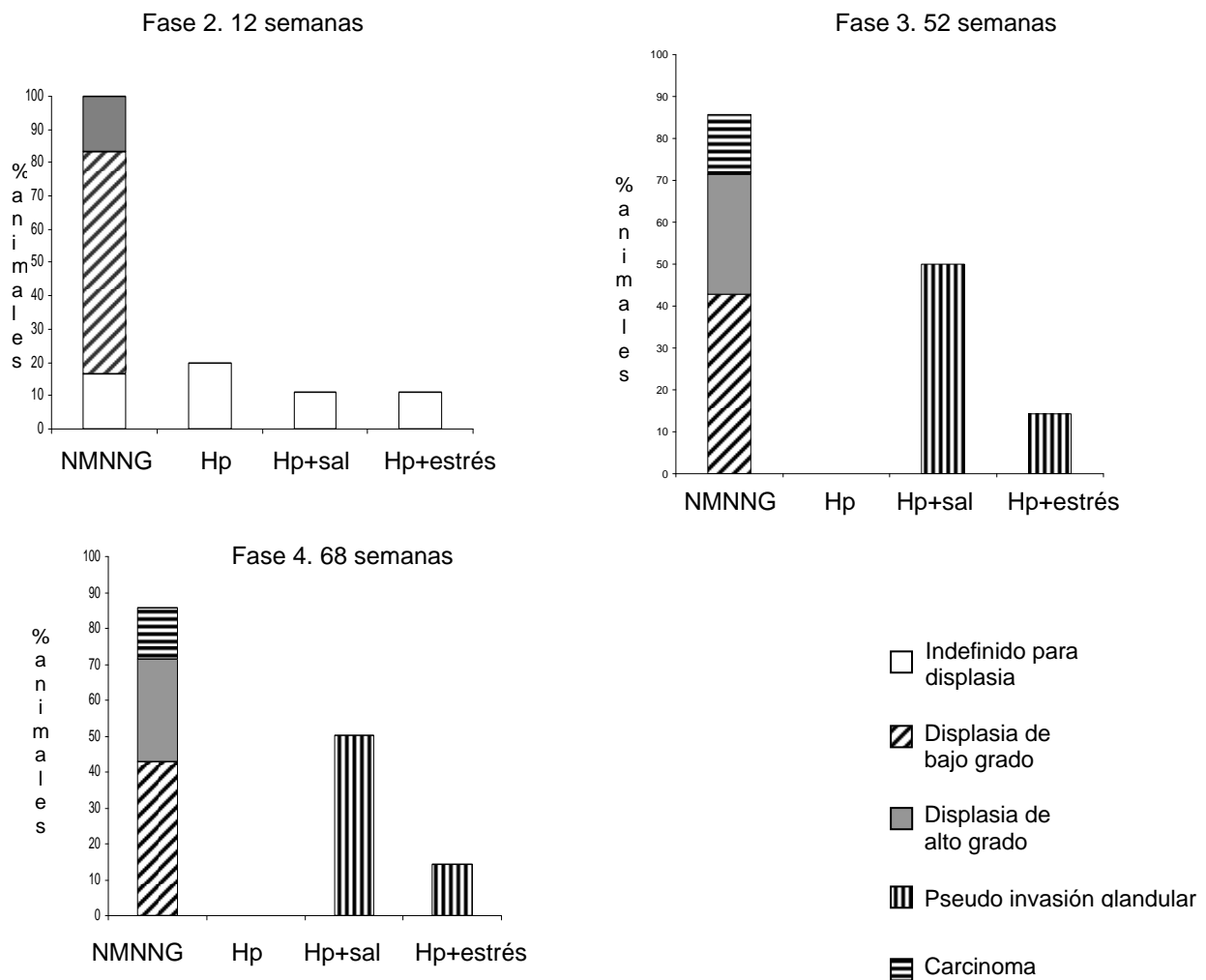
Figura 6. Lesión en las células epiteliales de la mucosa gástrica. Displasia de alto grado en antro de gerbo con 52 semanas de administración de NMNNG (C), es notable la distorsión de la maduración al comparar con el control negativo (A). En B se observan glándulas en submucosa rodeadas de inflamación que simulan invasión neoplásica, sin embargo, existe adecuada polaridad de los núcleos y mínima atipia (recuadros en B). Carcinoma difuso con células en anillo de sello (NMNNG 68 semanas, D y recuadro).



Ninguno de los animales infectados con *H. pylori* y/o sometidos a sinergismo, desarrollo cambios morfológicos de displasia de acuerdo con los criterios del consenso de Padua y únicamente en la semana 12 se reconocieron cambios indefinidos de displasia en los animales infectados y sometidos a sinergismo (Figura 7). La pseudo invasión de glándulas a la submucosa únicamente se documentó en los animales

infectados y sometidos a sinergismo a partir de la semana 52. No se identificó en los animales que únicamente recibieron la infección en cualquiera de las fases del experimento (Figura 7).

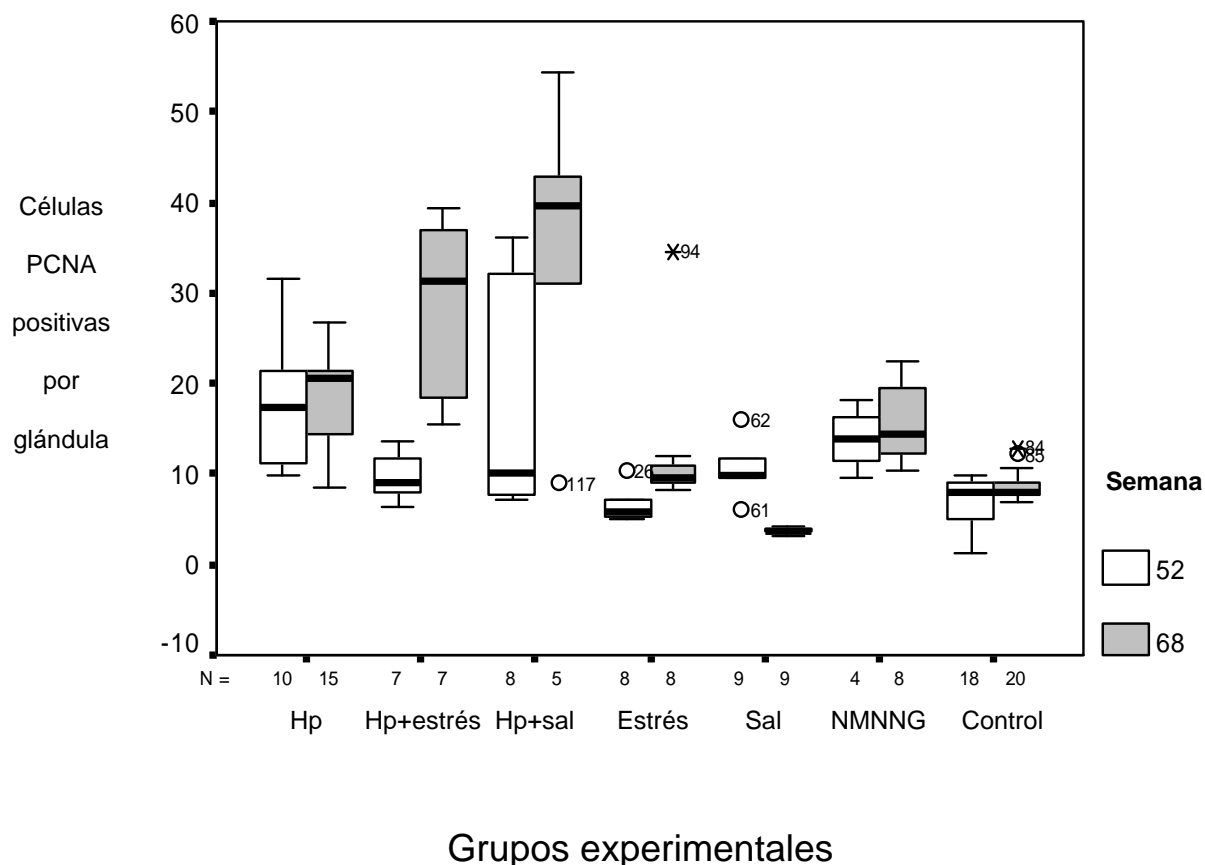
Figura 7. Espectro de cambios epiteliales observados en mucosa y submucosa durante las semanas 12, 52 y 68 de infección (Fases 2, 3 y 4 respectivamente). La capacidad carcinogénica de *H. pylori* no es equivalente a la de NMNNG; en éste último los cambios displásicos se reconocieron desde la fase 2 y evolucionaron a displasia de alto grado (carcinoma in situ) en la fase 3, hasta el desarrollo de carcinoma difuso en la fase 4. Los animales infectados y sinergizados con sal y estrés desarrollaron hiperplasia epitelial con pseudoinvasión glandular.



Inmunohistoquímica y TUNEL

La proliferación celular fue dependiente del tiempo, alcanzando diferencias significativas en la semana 52 en los grupos Hp y Hp+sal. En la semana 68 las diferencias ocurrieron entre los animales infectados y los de los grupos con sinergismo ($p < 0.005$), al comparar con el grupo control negativo. Sin embargo, entre los animales infectados, el único grupo que mostró sinergismo en la proliferación celular fue el de Hp+sal a 68 semanas al comparar con Hp ($p < 0.0001$; Figura 8).

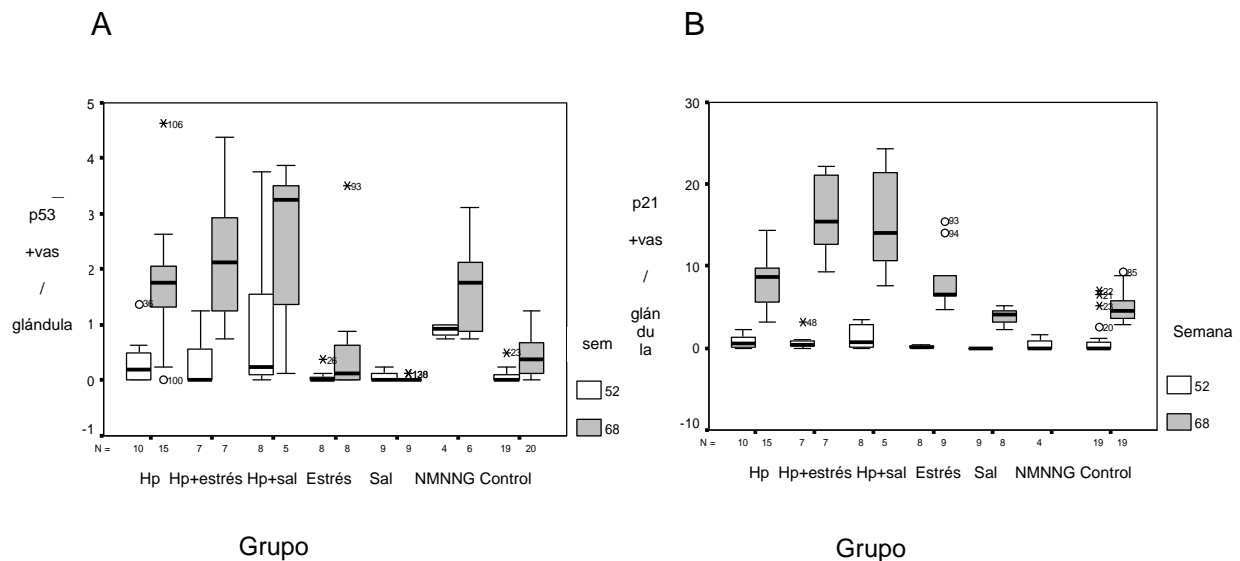
Figura 8. Células proliferantes en cualquiera de las fases del ciclo celular excepto G0. Las células son positivas para PCNA en cortes orientados longitudinalmente de las glándulas antrales. Se presentan los datos de las fases 2 y 3 de infección (semanas 52 y 68 post inoculación).



La expresión de p53 en el núcleo de células epiteliales fue mayor en los animales infectados y sometidos a sinergismo al comparar con los controles negativos ($p < 0.002$ para los tres), pero fue semejante al comparar animales infectados vs aquellos infectados y adicionados con sal o estrés (Figura 9a).

Por otro lado, se identificó incremento en la expresión nuclear para p21 en los grupos infectados y con sinergismo al comparar con los controles negativos ($p < 0.0001$), dichas diferencias persistieron al comparar los dos grupos de sinergismo con el de infectados ($p < 0.001$; Figuras 9b).

Figura 9. Células positivas para p53 y p21 en glándulas orientadas en mucosa de antro. Los grupos con y sin sinergismo de estrés o sal son semejantes en la expresión nuclear de proteína p53 (A). Por otro lado, la expresión de p21 mostró diferencias significativas entre los animales con Hp y aquellos que recibieron Hp+sal o Hp+estrés a la semana 68 de infección (B).



Los animales infectados presentaron mayor proliferación que los controles negativos a partir de la semana 52, dichas diferencias persistieron a las 68 semanas de seguimiento ($p < 0.001$ en ambos casos).

La expresión de p53 ocurrió más tempranamente en los gerbos tratados con NMNNG que coincidió con incremento en los niveles de expresión de p21 ($p = 0.02$), sin cambios en la proliferación celular. Comparando los efectos subcelulares de la infección por *H. pylori* y la administración de NMNNG, la única diferencia fue una mayor expresión de p21 a las 52 semanas en el último grupo ($p < 0.001$).

La ingesta crónica de 8% mayor de sal o el estrés *per se* no fueron suficientes para modificar la expresión de p53, p21 o PCNA al comparar con animales intactos. El número de células en apoptosis identificadas por TUNEL fue menor en las fases crónicas del experimento (52 y 68 semanas) que en las fases tempranas de la infección (Figura 10).

Figura 10. Apoptosis en cortes orientados de mucosa antral. Se documenta disminución del número promedio de células en apoptosis en los grupos de infección y sinergismo.

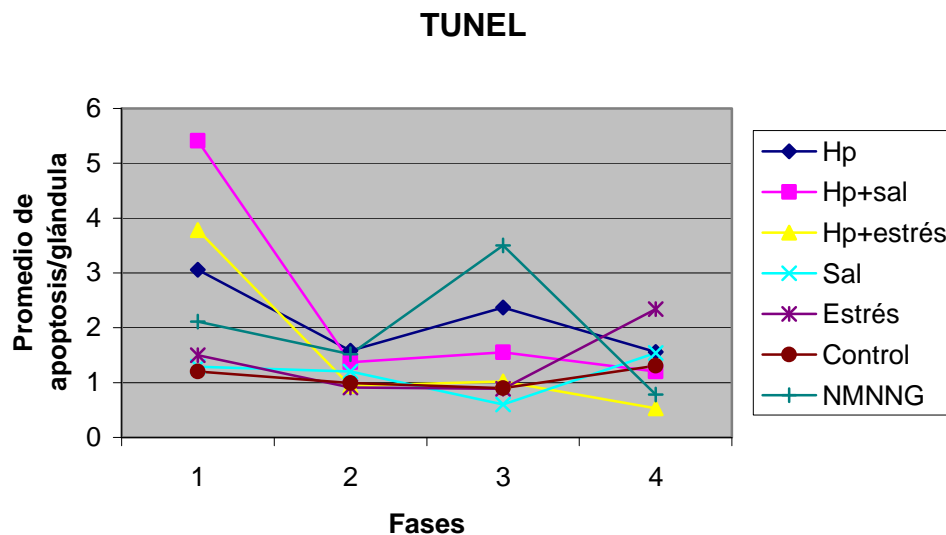
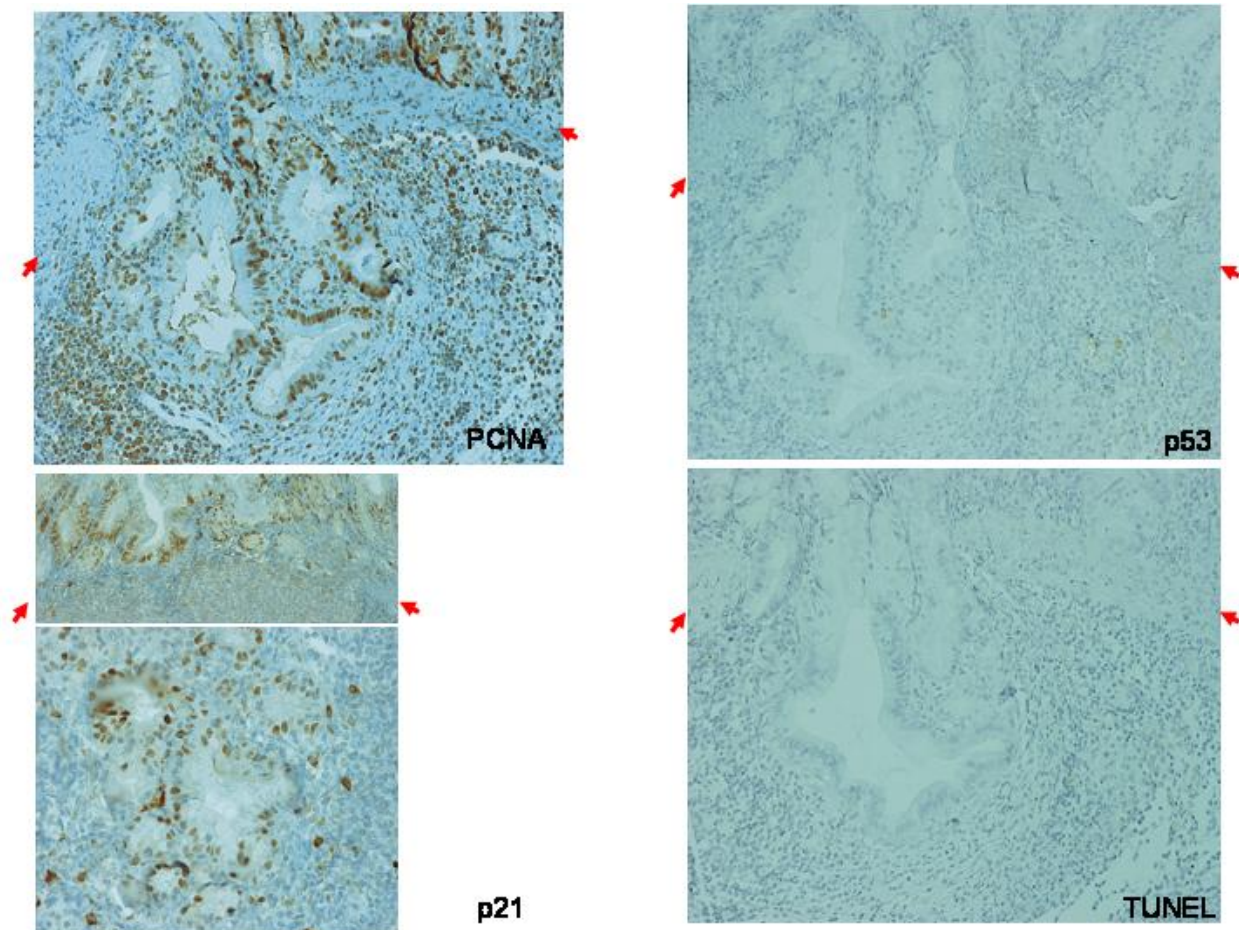


Figura 11. Proliferación de glándulas heterotópicas en la mucosa de antro gástrico. Las glándulas en submucosa presentaron alta proliferación evidenciada por la marca nuclear café ocre nuclear (PCNA), con incremento en la expresión de p21 en la misma localización. No se apreció reactividad para p53 ni apoptosis en las células epiteliales. El perfil de expresión mencionado ha sido descrito en células epiteliales terminalmente diferenciadas. (Flechas: muscular de la mucosa).



DISCUSION

La intensidad de la inflamación, pseudoinvasión glandular, proliferación de células epiteliales y expresión de p21 en los jerbos inoculados con *H. pylori* cagA+, mostraron sinergismo al exponerlos adicionalmente a dieta alta en sal o a estrés a las 52 y 68 semanas post infección. Dichos cambios se observaron sin el uso de cualquier otro estímulo lesivo sobre la mucosa gástrica y fueron obtenidos de una muestra de 350 jerbos hembra libres de patógenos. Los grados mayores de inflamación mediada por polimorfonucleares en la mucosa, la proliferación de las células epiteliales y la expresión nuclear de la proteína p21 en el estómago, fueron más altos a partir de la semana 52 y se incrementaron aun más en la semana 68 en los grupos con doble estímulo lesivo. En la fase del experimento que se prolongó más de un año (68 semanas), y que incluyo 73 animales con 10 mediciones independientes en cada caso, la sola infección por *H. pylori* no fue suficiente *per se* para generar displasia de alto grado ni carcinoma gástrico invasor. Sin embargo, en forma global se identifico disminución de la tasa de apoptosis en las células epiteliales de los animales de los grupos inoculados. Menor muerte celular e incremento de la tasa de proliferación es la constante en mucosas inestables, que permiten el incremento de células con daño en el ADN y el posible desarrollo de neoplasias invasoras (58).

Se ha descrito que posterior a 30 minutos de inmersión en agua, un grupo de jerbos infectados con *H. pylori* desarrollaron úlceras y sangrado gástrico en un modelo a 12 semanas, sin sinergismo con la intensidad del daño inflamatorio (59). Nuestros resultados a 52 y 68 semanas mostraron mayor infiltrado inflamatorio agudo y proliferación de células epiteliales en el grupo Hp+estrés, comparado con los animales

que únicamente portaban la infección. No se apreció sinergismo respecto al número de animales con gastritis crónica, pero a las 68 semanas los animales con gastritis crónica grado 3 del grupo de sinergismo desarrollaron focos de mucosa gástrica heterotópica. El incremento en las lesiones mucosas en los animales infectados y estresados puede ser debido al uso de dos agentes lesivos de la mucosa gástrica administrados en forma aguda (inmersión en agua) y crónica (reducción del espacio físico), para evitar adaptación; maniobras que no fueron usadas en el estudio comentado (59).

En los animales suplementados con sal se identificó infiltrado inflamatorio agudo y crónico mínimo. Este es un evento claramente dependiente de la dosis de administración (60). Infiltrados agudo y crónico mayores en un menor lapso de tiempo se observaron en animales infectados y adicionados con 8% más sal en sus dietas (Figuras 3 y 4). La presencia del marcador morfológico de infección por *H. pylori* – gastritis crónica folicular- se incrementó con la adición mayor de sal a la dieta de los animales. Los cambios morfológicos esperados y asociados con la inflamación en el grupo de sinergismo con sal incluyeron mayores tasas de proliferación con disminución de apoptosis, ambos cambios previamente descritos en un modelo con mínimo seguimiento (61, 62) y confirmados en el presente análisis a 68 semanas de seguimiento.

¿Se debe interpretar a la proliferación heterotópica de glándulas como un paso temprano en la carcinogénesis gástrica en jerbos? A la fecha no tenemos una clara respuesta a esa pregunta. La evidencia actual que demuestra mayores tasas de proliferación y ausencia de involución completa en glándulas heterotópicas con fenotipo intestinal (62), así como su presencia en mucosas crónicamente dañadas lo sugiere. En

el presente estudio, las glándulas heterotópicas se identificaron en los grupos de sinergismo; más de un foco en dos animales infectados y adicionados con 8% más sal y un foco en un gerbo en el grupo Hp+estrés. Las glándulas mostraron tasas altas de proliferación y sobre expresión de p21, pero sin cambios displásicos o mitosis anormales en las células epiteliales (Figuras 5 y 10). Este extraño perfil –proliferación alta y expresión alta de p21 en ausencia de expresión de p53- se ha identificado en células epiteliales gástricas terminalmente diferenciadas o con cambios por envejecimiento (63), más que en lesiones neoplásicas. Sin embargo, el incremento de p21 puede estar relacionado con el factor nuclear-kB, producto de la interacción *H. pylori*/célula epitelial que induce su expresión (64).

El daño genotóxico determinó reactividad fuerte y difusa para p53 en el grupo tratado con NMNNG a las 12 y 52 semanas, con incremento modesto de p21 que confirma observaciones previas de activación independiente de p53 y p21 (65). Ninguno de los animales en los grupos de infección por *H. pylori* desarrolló proliferación de glándulas heterotópicas a las 52 o 68 semanas. La tasa de apoptosis disminuyó globalmente a las 68 semanas en todos los animales infectados, en forma más pronunciada en los grupos de sinergismo (Figura 9).

La búsqueda de cofactores en la carcinogénesis gástrica debe realizarse usando criterios confiables y reproducibles para designar a las lesiones preneoplásicas y neoplásicas en modelos animales. Es claro para algunos grupos (66) y el nuestro, que las lesiones que alguna vez se informaron como malignas quizá no correspondan a carcinomas. En el presente estudio, el único caso indudable de carcinoma se presentó en un animal tratado durante 68 semanas con NMNNG y el aspecto fenotípico fue de

carcinoma difuso con células en anillo de sello. Independientemente de las diferencias del presente estudio con los anteriormente informados (34, 67), se usaron bacterias con la isla de patogenicidad íntegra y el mismo grupo de animales. Una explicación alterna es atribuir las diferencias en el uso de nomenclaturas diferentes para las lesiones infiltrantes y no invasivas de la mucosa gástrica que es la constante entre la tendencia oriental y occidental del estudio de biopsias gástricas (68, 69). Los patólogos orientales tienden a sobregradificar las lesiones displásicas y emiten diagnósticos de carcinoma en ausencia de invasión a la pared gástrica (68). Adicionalmente, se ha mostrado que la pseudoivación glandular a submucosa desaparece una vez que se erradica *H. pylori* (70, 71). Sin embargo, dichas glándulas proliferantes pueden mostrar morfología atípica asociada al infiltrado inflamatorio agudo y crónico acompañante, fenómeno que contribuye a su sobre diagnóstico como carcinoma.

En resumen, la sal y el estrés sinergizan el daño inflamatorio, la proliferación de la mucosa gástrica y disminuyen apoptosis en jerbos con infección crónica por *H. pylori*. Las glándulas gástricas proliferativas heterotópicas se identificaron únicamente en los grupos de Hp+sal y Hp+estrés y su apariencia citológica así como la expresión de p21 sugiere cambios degenerativos de glándulas terminalmente diferenciadas. No se identificó desarrollo de cáncer gástrico en los animales con infección por *H. pylori* ni en los grupos de sinergismo. La secuencia metaplasia-displasia-carcinoma y expresión de p53 únicamente se identificó en los grupos tratados con NMNNG.

Conclusiones

1. La capacidad carcinogénica de *H. pylori* no es comparable a la de *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina*.
2. La reacción inflamatoria, proliferación y apoptosis de células epiteliales en presencia de *H. pylori* es sinergizada por sal y estrés en jerbos.
3. La mayor intensidad del daño en la mucosa gástrica asociado a las maniobras de sinergismo, motivó el desarrollo de heterotopia glandular.
4. Las células epiteliales que revisten las glándulas pseudo infiltrativas son terminalmente diferenciadas y no expresan p53
5. *H. pylori* induce incremento de la expresión de p21 en forma al parecer independiente de p53.

REFERENCIAS

1. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388:539-547.
2. Hopkins RJ, Morris JG. *Helicobacter pylori*: the missing line in perspective. *Am J Med* 1994; 97:265.
3. Megraud F, Brassens-Rabe MP, Denis F, Belbouri A, Hoa DQ. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1870.
4. Parsonnet J, Friedman G, Vandersteen DP, Chang Y, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325:1127-1131.
5. Wee A, Kang JY, Teh M. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: correlation with gastritis, intestinal metaplasia, and tumor histology. *Gut* 1992; 33:1029-1032.
6. Parsonnet J, Hansen S, Rodríguez L. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 1994; 330:1267-1271.
7. Hussel T, Isaacson P, Crabtree JE. The response of cells from low grade B cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993; 342:571-574.
8. Isaacson P. Gastric lymphomagenesis. *Am J Clin Pathol* 1997; 117:S39-S49.
9. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *VacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997; 112:92-99.
10. van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, Pena S, et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1999; 116:823-830.

11. Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, et al. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001; 107:611-620.
12. Youn HS, Baik SCh, Cho YK, Woo HO, et al. Comparison of *Helicobacter pylori* infection between Fukuoka, Japan and Chinju, Korea. *Helicobacter* 1998; 3:9-14.
13. Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T, Ogura K, et al. Structure of *cag* Pathogenicity Island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* 1999; 44:336-341.
14. Jiang Q, Hiratsuka K, Taylor DE. Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Molecular Microbiology* 1996; 20:833-842.
15. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Peña S, et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* *VacA*. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2597-2603.
16. Blaser MJ, Parsonnet J. Parasitism by the “slow” bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J Clin Invest* 1994; 94:4-8.
17. Glocker E, Lange C, Covacci A, Bereswill S, et al. Proteins encoded by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF- κ B activation. *Infect Immunity* 1998; 66:2346-2348.
18. Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, et al. Analysis of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 1998; 28:37-53.
19. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, et al. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:14648-14653.

20. Shibata W, Hirata Y, Maeda S, Ogura K, et al. CagA protein secreted by the intact type IV secretion system leads to gastric epithelial inflammation in the Mongolian gerbil model. *J Pathol* 2006; 210:306-314.
21. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48:3554-3560.
22. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Infection with *Helicobacter pylori*. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 61.
23. Eslick GD, Lim LL, Byles JE, Xia HH, Talley NJ. Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2373-2379.
24. Registro histopatológico de neoplasias malignas. Mortalidad y morbilidad 2001. Epidemiología. Secretaría de salud.
25. <http://sinais.salud.gob.mx> 2005.
26. Ekstrom AM, Hansson LE, Signorello LB, Lindgren A, et al. Decreasing incidence of both major histologic subtypes of gastric adenocarcinoma –a population-based study in Sweden. *Br J Cancer* 2000; 83:391-396.
27. Campbell S, Fraser A, Holliss B, Schmid J, O'Toole. Evidence for ethnic tropism of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1997; 65:3708-3712.
28. Zhang Z, Zheng Q, Chen X, Xiao S, et al. The *Helicobacter pylori* duodenal ulcer promoting gene, dupA in China. *BMC Gastroenterology* 2008; 8:49.
29. Lu H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2005; 128:833-848.

30. Fox JG, Dangler CA, Taylor NS, King A, et al. High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice. *Cancer Res* 1999; 59:4823-4828.
31. Sutoo D, Akiyama K, Matsui A. Gastric ulcer formation in cold-stressed mice related to a central calcium-dependent-dopamine synthesizing system. *Neurosci Lett* 1998; 249:9-12.
32. Matsushima Y, Kinoshita Y, Watanabe M, Hassan S, et al. Augmentation of water-immersion stress-induced gastric mucosal lesions in BALB/c mice infected with *Helicobacter felis*. *Digestion* 1999; 60:34-40.
33. Marchetti M, Aricó B, Burroni D, Figura N, et al. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 1995; 267:1655-1658.
34. Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 1998; 115:642-648.
35. Ikeno T, Ota H, Sugiyama A, Ishida K, et al. *Helicobacter pylori* induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils. *Am J Pathol* 1999; 154:951-960.
36. Wang TC, Fox JG. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Koch's postulates fulfilled? *Gastroenterology* 1998; 115:780-783.
37. Franco AT, Johnston E, Krishna U, Yamaoka Y, et al. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res* 2008; 68:379-387.

38. Romero-Gallo J, Harris EJ, Krishna U, Washington MK, et al. Effects of *Helicobacter pylori* eradication on gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2008; 88:328-336.
39. Owen DA. Normal histology of the stomach. *Am J Surg Pathol* 1986; 10:48-61.
40. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. *Cancer Res* 1992; 52:6735-6740.
41. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004; 306:1568-1571.
42. Takaishi S, Okumura T, Wang T. Gastric cancer stem cells. *J Clin Oncol* 2008; 26:2876-2882.
43. Chernova OB, Chernov MV, Agarwal ML, Taylor WR, Stark GR. The role of p53 in regulating genomic stability when DNA and RNA synthesis are inhibited. *TIBS* 1995; 20:431-434.
44. Dictor M, Ehinger M, Mertens F, Akervall J, Wennerberg J. Abnormal cell cycle regulation in malignancy. *Am J Clin Pathol* 1999; 112:S40-S52.
45. Peek RM, Wirth HP, Moss SF, Yang M, et al. *Helicobacter pylori* alters gastric epithelial cell cycle events and gastrin secretion in Mongolian gerbil. *Gastroenterology* 2000; 118:48-59.
46. Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133:659-672.
47. Tovar Guzman V, Hernandez Giron, Barquera S, Rodriguez Salgado N, Lopez Carrillo L. Epidemiologic panorama of stomach cancer mortality in Mexico. *Arch Med Res* 2001; 32:312-317.

48. Torres J, Leal Herrera Y, Perez Perez G, Gomez A, et al. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis* 1998; 178:1089-1094.
49. Torres J, Perez Perez G, Goodman KJ, Atherton JC, et al. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Arch Med Res* 2000; 31:431-469.
50. Torres J, Lopez L, Lazcano E, Camorlinga M, et al. Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14:1874-1877.
51. Lee A, O'Rourke J, Corazon de Ungria M, Robertson B, et al. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 1997; 112: 1386-1397.
52. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer CJH, van de Velde CJ, et al. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993; 41:7-12.
53. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:1161-1181.
54. Rugge M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, et al. Gastric dysplasia. The Padova international classification. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:167-176.
55. Lewin KJ, Riddell RH, Weinstein WM. *Gastrointestinal Pathology and its clinical implications*. 1st De. Igaku-Shoin:New York, 1989.
56. Morson BC, Sobin LH, Grundmann E, Johansen A, et al. Precancerous conditions and epithelial dysplasia in the stomach. *J Clin Pathol* 1980; 33:711-721.

57. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called intestinal type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64:31-49.
58. Whittles CE, Biddlestone LR, Burton A, Barr H, et al. Apoptotic and proliferative activity in the neoplastic progression of Barretts oesophagus: a comparative study. *J Pathol* 1999; 187:535-40.
59. Yamamoto N, Sakagami T, Fukuda Y, Koizuka H, et al., Influence of *Helicobacter pylori* infection on development of stress-induced gastric mucosal injury. *J Gastroenterol* 2000; 35:332-40.
60. Vences Mejía A, Caballero Ortega H, Dorado González V, Gamboa-Dominguez A et al. Cytochrome P450 expression in rat gastric epithelium with intestinal metaplasia induced by high dietary NaCl levels. *Env Toxicol Pharmacol* 2005; 20:57-64.
61. Bergin IL, Sheppard BJ, Fox JG. *Helicobacter pylori* infection and high dietary salt independently induce atrophic gastritis and intestinal metaplasia in commercially available outbred Mongolian gerbils. *Dig Dis Sci* 2003; 48:475-485.
62. Nozaki K, Shimizu N, Inada K, Tsukamoto T, et al. Synergistic promoting effects of *Helicobacter pylori* infection and high-salt diet on gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93:1083-9.
63. Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, Yokozaki H, et al. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1} in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the stomach: Relationship with p53 status and proliferative activity. *J Pathol* 1996; 180:122-8.
64. Basak Ch, Pathak SK, Bhattacharyya A, Mandal D, et al. NF- κ B- and C/EBP β -driven interleukin-1 β gene expression and PAK1-mediated caspase-1 activation

65. Craanen ME, Blok P, Offerhaus GJA, Meijer GA, et al. p21^{waf1/cip1} expression and the p53/MDM2 feedback loop in gastric carcinogenesis. *J Pathol* 1999; 189:481-6.
66. Elfvin A, Bölin I, von Bothmer C, Stolte M, et al. *Helicobacter pylori* induces gastritis and intestinal metaplasia but no gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40:1313-20.
67. Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, et al. Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res* 1998; 58:4255-9.
68. Ridell RH, Iwafuchi M. Problems arising from Eastern and Western classifications systems for gastrointestinal dysplasia and carcinoma: are they resolvable? *Histopathology* 1988; 33:197-202.
69. Lawers GY, Shimizu M, Correa P, Ridell RH, et al. Evaluation of gastric biopsies for neoplasias: Differences between Japanese and Western pathologists. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:511-8.
70. Nozaki K, Shimizu N, Tsukamoto T, Inada K, et al. Reversibility of heterotopic proliferative glands in glandular stomach of *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils on eradication. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93:374-81.
71. Cao X, Tsukamoto T, Nozaki K, Shimizu N, et al. Eradication of *Helicobacter pylori* induces apoptosis and inhibits proliferation of heterotopic proliferative glands in infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci* 2004; 95:872-7.

Apéndice 1

Iniciadores usados para la determinación de la presencia de la infección

Hp 1.1	5´ CTGGAGAGACTAAGCCCTCC	3´
Hp 3.1	5´ AGGATGAAGGTTTTAGGATT	3´
Hp 4.1	5´ GACTGACTATCCCGCCTACG	3´

Desnaturalización	1 ciclo de 5 minutos a 95°C	}	30 ciclos (39 en 2do. PCR)
Desnaturalización	1 ciclo de 45 segundos a 95°C		
Alineamiento	1 ciclo de 45 segundos a 60°C		
Síntesis	1 ciclo de 45 segundos a 72°C		
Extensión	1 ciclo de 7 minutos a 72°C		

Usando el mismo DNA se realizaron las determinaciones del gen *cagA* utilizando los iniciadores:

CFA1	5´ TAGAGACGCAAGAGCAATCG	3´
CRA1	5´ GCTTTAGCCACTGATACCGC	3´
CRA2	5´ CTTCTGCCTTGCTGAAATCC	3´

Desnaturalización	1 ciclo de 10 minutos a 94°C	}	35 ciclos (38 en 2do. PCR)
Desnaturalización	1 ciclo de 1 minuto a 94°C		
Alineamiento	1 ciclo de 1 minuto a 59°C		
Síntesis	1 ciclo de 1 minuto a 72°C		
Extensión	1 ciclo de 10 minutos a 72°C		

Perspectivas

Los resultados del presente proyecto no confirman la presunta suficiencia de la infección por *H. pylori* en la causalidad de adenocarcinoma gástrico en jerbos. Un grupo más ha tenido resultados semejantes en experimentos de infección crónica; la razón es atribuida al uso de diferente nomenclatura en el diagnóstico de carcinoma en oriente. Lo anterior motivó que nuestro grupo estudiara la expresión de enzimas de reparación del DNA en las glándulas heterotópicas proliferantes. Con el uso de anticuerpos monoclonales para MLH-1, MSH-2 y MSH-6 se demostró que las células de las glándulas ubicadas en la submucosa preservan los mecanismos de reparación. Lo anterior es una prueba más a favor de que dichas estructuras no son diagnósticas de cáncer. Los resultados del estudio fueron presentados en “XXth International workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation” en Estambul, Turquía. Septiembre 20-22, 2007. El resumen completo se anexa a continuación y se encuentra en preparación la versión *in extenso* del manuscrito.

Heterotopic proliferative glands in *H. pylori* infected Mongolian gerbils preserve DNA repair enzyme MSH-6

Gamboa-Dominguez A, Saqui-Salces M, Luqueño V, Ortiz S, Ruiz-Palacios G

Department of Pathology and Infectious Diseases. National Institute of Medical Sciences and Nutrition SZ. Mexico City, Mexico.

Biological significance of heterotopic proliferative glands (HPG) is controversial in the antral mucosa of the gerbil model. Loss of DNA repair in infiltrative glands should be consistent with malignant transformation. **Objective:** Analyze the pattern of DNA repair enzymes using the MLH-1, MSH-2 and MSH-6 antibodies in HPG. **Materials and methods:** 278 8-week-old female pathogen free gerbils were allocated to 7 groups: Hp-Sydney strain (45), 8%-higher-salt diet (38), stress (60% reduction of cage space and water immersion, 36), Hp+salt (33), Hp+stress (34), *N-methyl-N'-nitro-N-*

nitrosoguanidine (34), and sham (58). Gerbils were sacrificed at 1(67), 12(73), 52(65), and 68(73) wks-post-infection. Sydney, Padova and Lauren's classifications were blindly used. MLH-1, MSH-2 and MSH-6 were assessed in cases showing HPG, in positive and negative controls. **Results:** Infection rate and gastritis was 100% in Hp and synergized animals. HPG were identified in synergy groups since 52-wks with increases in its number and size by 68-wks. Nine gerbils belonging to synergy groups (13%) showed a mean of 4 HPG foci in antrum and transition zone with oxyntic mucosa. No cross reactivity was found with MLH-1 (clone G168-15) and MSH-2 (clone G219-1129, both BD Pharmingen), antibodies. A strong nuclear staining for MSH-6 was observed in surface and glandular epithelial cells as well as in HPG. MNNG treated animals showed decreased MSH-6 expression in dysplastic epithelium. **Comments:** Together with the benign appearance of HPG, preservation of MSH-6 as in normal gastric mucosa is indicative of its non-malignant behavior.

A continuación, nuestro grupo pretende probar el uso de anticuerpos monoclonales de diferenciación de las células epiteliales gástricas (sonic Hedgehog) e identificar sin existe marca en jerbo. En caso de identificar cruzamiento de la reacción, estaremos en posibilidad de aportar un elemento más en la caracterización de las glándulas pseudo-invasivas en submucosa.

Como parte de la línea de investigación en cáncer gástrico se adquirieron tres marcadores monoclonales de inmuno histoquímica para la identificación de células madre en epitelios humanos (Nestina, Chemicon Internacional; CD133, clona AC133-Miltenyi Biotecnology; CD166, clona L50, Abcam). En los últimos meses se ha descrito que células madre originadas en medula ósea son capaces de integrarse a la mucosa gástrica y en presencia de daño crónico, sufrir transformación maligna. La intención de nuestro grupo de trabajo es identificar si con dicho método y doble tinción, se reconocen células con fenotipo totipotencial en el contexto de daño inflamatorio crónico o integradas con células epiteliales rodeadas por membrana basal en la mucosa gástrica de jerbos.

Volume 12

Number 4

2007

ISSN 1083-4389

Helicobacter

EDITOR: David Y. Graham, M.D.



Blackwell
Publishing

European Helicobacter Study Group

**XXth International Workshop on Helicobacter
and Related Bacteria in Chronic Digestive
Inflammation**

Istanbul, September 20–22, 2007

Accepted abstracts

Poster Round 5.2: Pathology and Pathophysiology

Abstract no.: P170

Heterotopic Proliferative Glands in *H. pylori* Infected Mongolian Gerbils Preserve DNA Repair Enzyme MSH-6

A. Gamboa-Dominguez, M. Saqui-Salces, V. Luqueño, S. Ortiz & G. Ruiz-Palacios
National Institute of Medical Sciences and Nutrition SZ, Mexico City, Mexico

Biological significance of heterotopic proliferative glands (HPG) is controversial in the antral mucosa of the gerbil model. Loss of DNA repair in infiltrative glands should be consistent with malignant transformation.

Objective. Analyze the pattern of DNA repair enzymes using the MLH-1, MSH-2 and MSH-6 antibodies in HPG.

Materials and Methods. 278 8-week-old female pathogen free gerbils were allocated to 7 groups: *H. pylori*-Sydney strain (45), 8%-higher-salt diet (38), stress (60% reduction of cage space and water immersion, 36), *H. pylori*+salt (33), *H. pylori*+stress (34), *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (34), and sham (58). Gerbils were sacrificed at 1(67), 12(73), 52(65), and 68(73) week-postinfection. Sydney, Padova and Lauren's classifications were blindly used. MLH-1, MSH-2 and MSH-6 were assessed in cases showing HPG, in positive and negative controls.

Results. Infection rate and gastritis was 100% in *H. pylori* and synergized animals. HPG were identified in synergy groups as 52-weeks with increases in its number and size by 68-weeks. Nine gerbils belonging to synergy groups (13%) showed a mean of 4 HPG foci in antrum and transition zone with oxyntic mucosa. No cross reactivity was found with MLH-1 (clone G168-15) and MSH-2 (clone G219-1129, both BD Pharmingen), antibodies. A strong nuclear staining for MSH-6 was observed in surface and glandular epithelial cells as well as in HPG. MNNG treated animals showed decreased MSH-6 expression in dysplastic epithelium.

Comments. Together with the benign appearance of HPG, preservation of MSH-6 as in normal gastric mucosa is indicative of its nonmalignant behavior.

Abstract no.: P171

Clinical Significance of *Helicobacter pylori* Culture from the Duodenal Bulb

K. Seppälä,* T. U. Kosunen,* P. Sipponen* & H. Rautelin*[†]

*University of Helsinki, Helsinki, Finland; [†]HUSLAB, Helsinki University Central Hospital, Finland

Aim. To show that *H. pylori* infection in duodenal bulb indicates increased risk for complications associated with duodenal ulceration.

Methods. Duodenal bulb, antrum and corpus biopsies from 875 patients were studied histologically and *H. pylori* cultures were carried out separately from each site. Sera were tested for *H. pylori* antibodies.

Results. 161 patients with positive bulbus culture had more often ulcerations (50%) in whole stomach and esophagus than those 154 patients whose culture was positive only in more proximal biopsies (36%). In these two cohorts all patients had *H. pylori* antibodies. Among the 558 patients with negative cultures subjects with *H. pylori* antibodies (n = 79) had more often ulcerations (24%) than those without antibodies (6%).

Conclusions. Positive *H. pylori* culture from the duodenal bulb seemed to predict increased risk for severe gastric disease.

Abstract no.: P172

Does Gastroesophageal Acid Reflux Give Rise to *Helicobacter pylori* in Sinonasal Mucosa?

M. Yalinay Cirak,* A. Ozdek,[†] D. Engin,* T. Karakan,[‡] S. Unal[‡] & S. Turet*

*Gazi University Faculty of Medicine Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Ankara, Turkey; [†]Ministry of Health Diskapi Yildirim Beyazit Training and Research Hospital ENT Clinic, Ankara, Turkey; [‡]Gazi University Faculty of Medicine Department of Internal Medicine Gastroenterology Unit, Ankara, Turkey

The aim of this study was to investigate the association of the presence of *Helicobacter pylori* in the sinonasal and gastric mucosa and pathological gastroesophageal acid reflux. Seventeen dyspeptic patients with gastric *H. pylori* infection and concurrent chronic rhinosinusitis (CRS) were included in this study. Gastric *H. pylori* infection was identified by real time PCR in the gastric biopsy samples of these patients. During surgical procedure, mucosal tissue samples were collected from ethmoidal cells. Following DNA extraction, primers directed to 23S rDNA of *H. pylori* was used to amplify 406 bp PCR product. All the patients were submitted to 24-h pHmetry. *H. pylori* DNA was detected in 13 out of 17 (76.5%) patients with CRS. Nine out of 17 (52.9%) patients were diagnosed to have pathological gastroesophageal acid reflux, and 6 of these 9 patients were sinonasal *H. pylori* DNA positive. Likewise, 7 out of 8 acid reflux negative patients were *H. pylori* DNA positive in sinonasal mucosa ($p = .312$). Although *H. pylori* was detected in the majority of patients with CRS, the number of acid reflux episodes was similar in sinonasal *H. pylori* DNA positive and negative subjects. The role of nonacid reflux might be another contributing factor for the presence of *H. pylori* in the ethmoidal mucosa. Further research is required to clarify this issue.

Salt and Stress Synergize *H. pylori*-Induced Gastric Lesions, Cell Proliferation, and p21 Expression in Mongolian Gerbils

Armando Gamboa-Dominguez · Tom Ubbelohde · Milena Saqui-Salces · Luis Romano-Mazzoti · Minerva Cervantes · Claudia Domínguez-Fonseca · Maria de la Luz Estreber · Guillermo M. Ruíz-Palacios

Received: 8 June 2006 / Accepted: 17 July 2006 / Published online: 3 April 2007
© Springer Science+Business Media, Inc. 2006

Abstract Our aim was to determine if salt and stress enhance *Helicobacter pylori* (Hp) lesions in *Meriones unguiculatus*. Two hundred seventy-eight pathogen-free gerbils were allocated to seven groups: Hp-Sydney strain (45), 8% higher-salt diet (38), stress (60% space reduction/water immersion; 36), Hp + salt (33), Hp + stress (34), *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (34), and sham (58). Gerbils were sacrificed at 1 week (67), 12 weeks (73), 52 weeks (65), and 68 weeks (73). Sydney, Padova, and Lauren classifications were blindly used. Proliferation, p53, p21, and apoptosis were assessed. Follicular active gastritis (grade 2/3) was observed in 10% of Hp gerbils, 38% of Hp + salt gerbils, and 29% of

Hp + stress gerbils at 52 weeks and 67%, 83%, and 43% at 68 weeks ($P < 0.05$). Heterotopic proliferative glands were identified in synergy groups from 52 weeks, with increases in their number and size by 68 weeks. Higher proliferative rates were observed in Hp + salt gerbils ($P < 0.0001$), and p21 overexpression in Hp + salt and Hp + stress gerbils (both P 's < 0.0001), by 68 weeks, without p53 increases. We conclude that salt and stress synergize Hp damage and increase pseudo-invasive gland foci.

Keywords *Helicobacter pylori* · Carcinogenesis · Gerbils · Stress · Salt · p21

A. Gamboa-Dominguez · M. Saqui-Salces · C. Domínguez-Fonseca
Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, Tlalpan, 14000 DF, Mexico

T. Ubbelohde · L. Romano-Mazzoti · M. Cervantes · G. M. Ruíz-Palacios
Department of Infectious Diseases, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, Tlalpan, 14000 DF, Mexico

M. de la Luz Estreber
Department of Experimental Medicine, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, Tlalpan, 14000 DF, Mexico

G. M. Ruíz-Palacios (✉)
Departamento de Infectología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, 14000, Distrito Federal, México
e-mail: grmps@servidor.unam.mx

A. Gamboa-Dominguez (✉)
Departamento de Patología, INCMNSZ
e-mail: agamboat@quetzal.innsz.mx

Introduction

Helicobacter pylori is a type I carcinogen chronically infecting more than two-thirds of humans worldwide and associated with gastric cancer; it was the second leading cause of morbidity and mortality in 2000 [1, 2]. Besides the high prevalence of *H. pylori* in the general population, tumor development in gastric mucosa is a rare and late event preceded by a multistep constellation of preneoplastic changes [3]. Mucosal transformation to cancer takes years and its highly variable regional prevalence has also been associated with other environmental events [4].

H. pylori gastric cancer causality was probed in chronically infected gerbils (*Meriones unguiculatus*), with the development of all the associated gastric mucosal changes recognized adjacent to human gastric carcinomas [5–7]. However, in most of the reported studies, animals were also treated with chemical carcinogens obscuring the effect of the bacteria, although synergizing the inflammatory and epithelial damage [8]. Since the clear-cut dysplastic glandular invasion through the stomach wall defining gastric

carcinoma is observed only at very long postinfection follow-ups [7], and its development is highly increased with pretreatment with chemical carcinogens [9], *H. pylori* should be considered a gastric cancer promoter in animal models.

The hypothesis that salt is a cofactor in gastric carcinogenesis has a long and debated history, without a final consensus [10], although recent prospective studies concur in considering it to be significantly associated with gastric cancer [11, 12], and a consensus conference concluded that salt-preserved food and salt probably increase the risk of gastric cancer [13]. In gerbils, salt induces foveolar hyperplasia and mucosal atrophy without inflammation in lamina propria [14], and it is associated with a strong inflammatory damage in *H. pylori*-infected gerbils [15], but a clear synergism is not established in this model.

Lifestyle and habits hypothetically predispose to gastric lesions [16, 17] and stress is a well-known inductor of gastric mucosal damage in animals [18]. In mice, psychological stress produces mucosal erosion and inflammation without a clear synergy with *H. pylori* inoculation [19]. However, these animals do not reproduce faithfully the morphological changes commonly observed in humans infected with *H. pylori*. In a 12-week post-*H. pylori* infection follow-up, gerbils submitted to water stress for 30 min developed greater damage than those uninfected or submitted to the stressful event longer [20]. However, the effects of chronic and repetitive stress on inflammatory response and epithelial cell kinetics have not been evaluated in the presence of *H. pylori*.

Changes in gastric epithelial kinetic in gerbils infected with *H. pylori* *CagA*+, have been associated with gastrin secretion levels inducing early increases in the apoptosis/proliferation ratio. After 16 weeks postinfection (WPI) the ratio is not different from that of controls and a higher proliferative profile is observed in infected animals [21]. Longer follow-ups showed a decrease in apoptosis and sustained proliferation rates [22]. In this scenario, p53 alterations or activation of its pathway could be involved in the evolution to dysplasia or carcinoma [5].

The aim of this study was to identify a synergism between *H. pylori* infection and salt intake or stress in the inflammatory response, preneoplastic development, cell cycle alterations, or p53/p21 accumulation in Mongolian gerbils.

Materials and Methods

Bacteria

H. pylori Sydney strain (a gift from Dr. Adrian Lee, University of New South Wales, Australia) were inoculated on *Brucella* agar plates (Becton Dickinson, Cockysville, MD) containing 7% heat-inactivated fetal bovine serum and incubated at 37°C under microaerobic conditions at a

high humidity. Inocula contained 10⁶ bacteria/ml and saline solution.

Animals and experimental design

Two hundred seventy eight 8-week-old female pathogen-free gerbils (*M. unguiculatus*; derivation Harlan; USA), maintained in microisolators with free access to water and food under a 12:12-hr light:dark cycle, were allocated to seven groups: *H. pylori* (Hp) Sydney strain ($n = 45$), 8% higher-salt diet ($n = 38$), stress (60% reduction of cage space and in the chronic phases, immersion in water once a week, 7 weeks before sacrifice; $n = 36$), Hp + salt ($n = 33$), Hp + stress ($n = 34$), *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine ingestion, 20 ppm in drinking water ad libitum, prepared three times a week (MNNG; $n = 34$), and sham ($n = 58$). Intragastric *H. pylori* infection was carried out after 24 hr of fasting, under anesthesia with zoletil (80 mg/kg). An *H. pylori* standardized SS1 strain (*cagA*+, *vacA*+) culture suspension in saline solution with 1×10^6 CFU was administered to each gerbil. The 8% higher-salt diet, stress, MNNG, and sham groups received only saline solution. Euthanasia was performed at 1 ($n = 67$), 12 ($n = 73$), 52 ($n = 65$), and 68 ($n = 73$) WPI, after bleeding by intracardiac puncture under ether anesthesia.

H. pylori detection

Infection was confirmed by PCR for *cagA* amplification of DNA extracted from feces collected a week after inoculation from each group. Feces were suspended in PBS, digested with proteinase K (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Invitrogen, Carlsbad, CA), and centrifuged (1500 rpm for 3 min and 5000 rpm for 3 min, 4°C). DNA was extracted with phenol-chloroform-isopropyl alcohol, and PCR was performed using the primers 5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG-3' and 5'-CTGCAAAGATTGTTTGGCAGA-3' [23]. After a denaturation step at 94°C for 3 min, 35 cycles were carried out for PCR amplification. The cycle profile was 93°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min. A final extension was performed at 72°C for 5 min and kept at 4°C. DNA extracted from *H. pylori* inocula was used as a positive control, and the negative control included sterile water instead of DNA. PCR products were separated on 2.5% agarose gels using $\phi\text{X}174$ DNA-*Hae*III (New England BioLabs, Beverly, MA) as a molecular weight marker. Amplified DNA was 352 bp. Additional *H. pylori* infection confirmation was performed by immunohistochemistry (IHC) on formalin (10%)-fixed, paraffin-embedded gastric tissue, with heat antigen retrieval, using anti-*H. pylori* polyclonal antibody (1:50; Dako Cytomation; Denmark A/S) with the avidin-biotin-peroxidase detection system and diaminobenzidine in the NexES

automated IHC system (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ).

Histopathological examination

The stomach was obtained from all animals and longitudinally sectioned; one-half was processed for morphologic evaluation and the other half frozen. All procedures used in these experiments were approved by the local ethical committee for animal use in research (INF-074-00/02-1). HE sections were blindly reviewed by one observer with experience in human and animal gastric pathology (A.G-D.). Antral morphology was evaluated using the Sydney updated visual analog scale to identify and grade acute and chronic inflammation, atrophy, and metaplasia [24]. Dysplastic changes were graded following the morphologic criteria illustrated in the Padova classification [25] without considering atypical glandular pseudoinvasion to the submucosa as intestinal carcinoma [26]. The severity of the inflammatory infiltrate was graded and the presence of lymphoepithelial lesions recorded [27].

Immunohistochemistry and TUNEL

IHC was performed to detect proliferative cell nuclear antigen (PCNA) in gastric tissues using anti-PCNA clone PC10 (1:150; Dako A/S), a primary antibody that has shown reactivity in gerbil tissues, also for p53, clone DO7 and, for p21, clone SX118 detection (Dakocytomation, Denmark A/S, 1:50). Briefly, 4- μ m sections of formalin-fixed, paraffin-embedded gastric tissue were mounted on positive charged glass slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Tissues were deparaffinized and dehydrated with xylene, ethanol, and Tris (0.05 M), pH 7.6, consecutive baths. Antigen retrieval was performed with EDTA (10 mM) buffer, pH 8.0, in a microwave pressure cooker for 12 min. IHC was carried out in a NexES automated system (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), using iView DAB detection system (Ventana Medical Systems). Tonsil and human gastric adenocarcinoma were used as positive controls. In all cases, the negative control consisted of omitting primary antibody. All antibodies used in this study had been previously tested and standardized in gerbil tissues in our laboratory.

Apoptosis was detected by terminal deoxynucleotide nick end labeling (TUNEL) assay using Apoptag Plus Peroxidase kit (S7101; Chemicon International, Temecula, CA), following the manufacturer's instructions. Slides were prepared following the procedures described above, except for antigen retrieval.

Proliferation and apoptotic indexes were determined by counting positive epithelial cells for PCNA and TUNEL, respectively, in 10 well-oriented antral glands per animal.

p53 and p21 immunopositive cells were also counted in 10 oriented antral glands per animal.

Analysis

Data were analyzed with ANOVA and Student's t test and Bonferroni correction. All comparisons were done using SPSS 12.0 for Windows, considering a two-sided value of $P < 0.05$ as statistically significant.

Results

H. pylori colonization

DNA extracted from feces collected from microisolators showed a 352-bp band revealing the presence of *cagA* by PCR in inoculated groups. All inoculated animals had spiral bacterial structures in the surface mucous layer reacting with the anti-*H. pylori* antibody by IHC. The infection rate in the inoculated animals was 100%, and no reinfection was required.

Stress development

Feces distribution in cages (in a restricted zone vs diffuse distribution), skin lesions, number of seizures, premature death, and postmortem cannibalism were used as stress indicators. The number of recorded events per week was predominantly observed in groups submitted to space reduction and water immersion for 52 and 68 WPI (data not shown).

Histopathological changes

Acute inflammation with glandular destruction (grade 2) or with surface epithelial disruption or erosion (grade 3) was predominantly observed in *H. pylori*-inoculated groups, although the MNNG group showed grade 3 acute lesions at 1 and 12 weeks post treatment, and the stressed animals at 68 weeks. An earlier acute inflammatory response was identified in *H. pylori* groups with additional salt or stress and a higher grade of acute gastritis after 52 and 68 weeks of treatments (Fig. 1).

Scant mononuclear inflammatory infiltrate in lamina propria was observed in 4, 11, and 6 control gerbils at 1, 52, and 68 weeks of follow-up, respectively. Grade 2 chronic gastritis was observed earlier in Hp + stress animals, but the intensity of chronic inflammation thereafter was similar between *H. pylori*-infected and those groups with added salt or stress (Fig. 2). Moderate to intense chronic follicular gastritis with active damage (grade 2 or 3) was observed in the third and fourth phases of the experiments, at a higher frequency in the synergized groups: 10% in Hp group, 38%

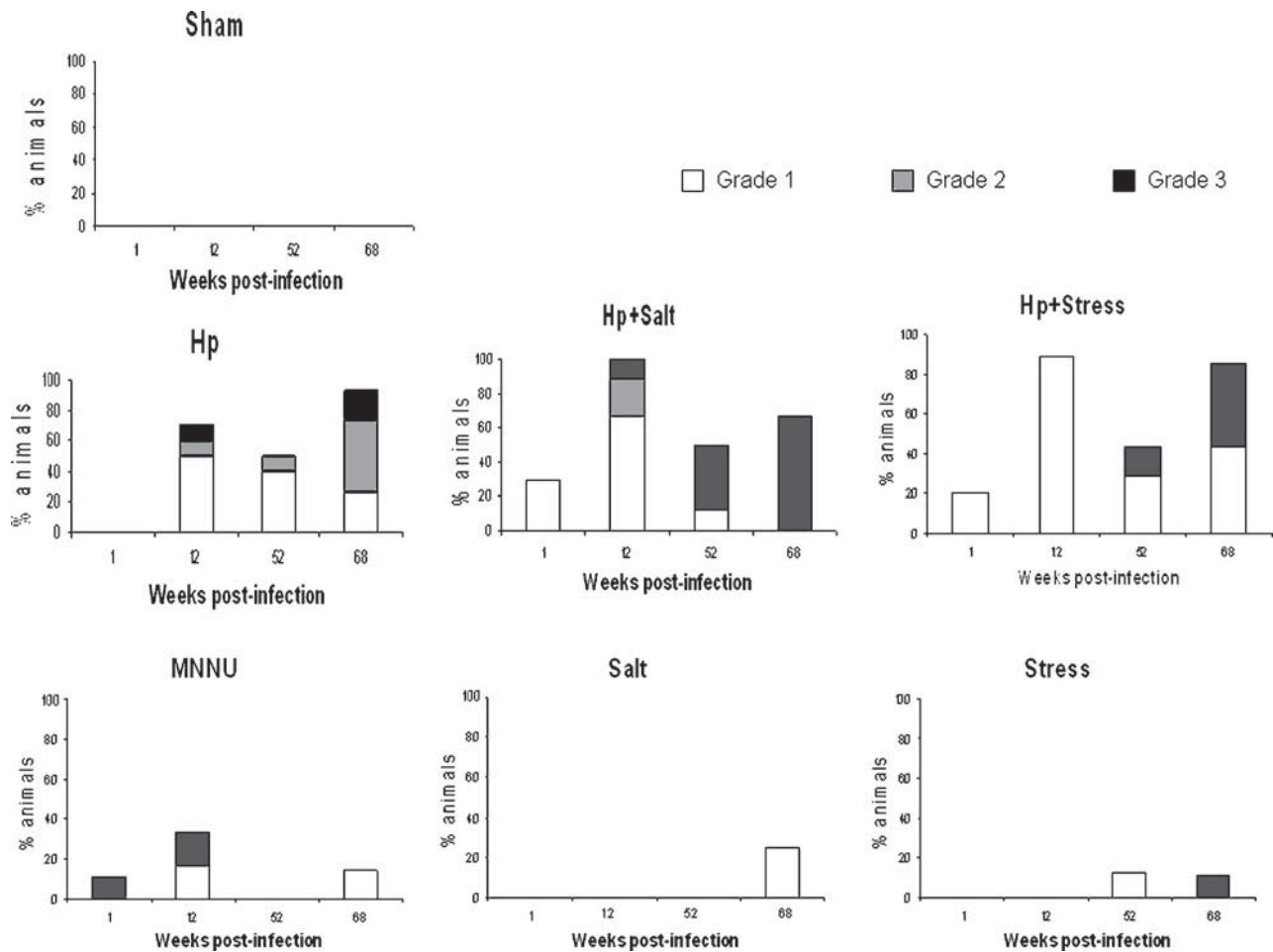


Fig. 1 Polymorphonuclear infiltrate with foveolar/glandular disruption (grade 2) or gastric surface erosion was mainly observed in *H. pylori*-infected gerbils having 8% higher salt intake since 52 WPI.

in Hp + salt group, and 29% in Hp + stress group at 52 weeks, and 67%, 83%, and 43% at 68 weeks, respectively ($P < 0.05$). Until week 68 the stress group presented intense (grade 3) chronic gastritis, while the MNNG-treated animals presented it at 12 weeks and then showed less chronic inflammation. Chronic inflammation of gastric mucosa in the salt group was insignificant, but more frequent until week 68 posttreatment.

Clear dysplastic changes were observed in the MNNG groups from 12 weeks posttreatment and increased thereafter, with development of diffuse gastric carcinoma in one animal. None of the infected animals or the synergy groups developed dysplasia according to established criteria [25]; only indefinite dysplastic changes were observed at 12 weeks posttreatment in the Hp, Hp + salt, and Hp + stress groups (Fig. 3). Submucosal glandular pseudoinvasion was only identified in infected animals with added salt or stress, and not in the Hp-only group, at 52 and 68 WPI (Fig. 4).

An increase in grade 3 acute gastritis was observed in infected animals submitted to stress at 68 weeks postinfection

Immunohistochemical and TUNEL analysis

Cell proliferation (mean PCNA nuclear staining per gland) was time dependent, reaching significant differences by week 52 in the Hp and Hp + salt groups, as well as in the Hp, Hp + salt, and Hp + stress groups at 68 weeks compared with the sham groups (all P 's < 0.005). However, among infected animals, the only group showing synergism in cell proliferation was Hp + salt at 68 weeks, compared with Hp-infected gerbils ($P < 0.0001$; Fig. 5).

p53 was overexpressed by 68 weeks in the Hp, Hp + stress, Hp + salt, and MNNG groups compared with the sham (all P 's < 0.002), but its nuclear staining was similar between synergy groups and Hp-infected animals (Fig. 6). On the other hand, an increase in p21 nuclear expression was observed in the infected and synergized groups compared with the sham (both P 's < 0.0001), and the differences persisted when both synergy groups were compared with infected gerbils (both P 's < 0.001 ; Figs. 6 and 7).

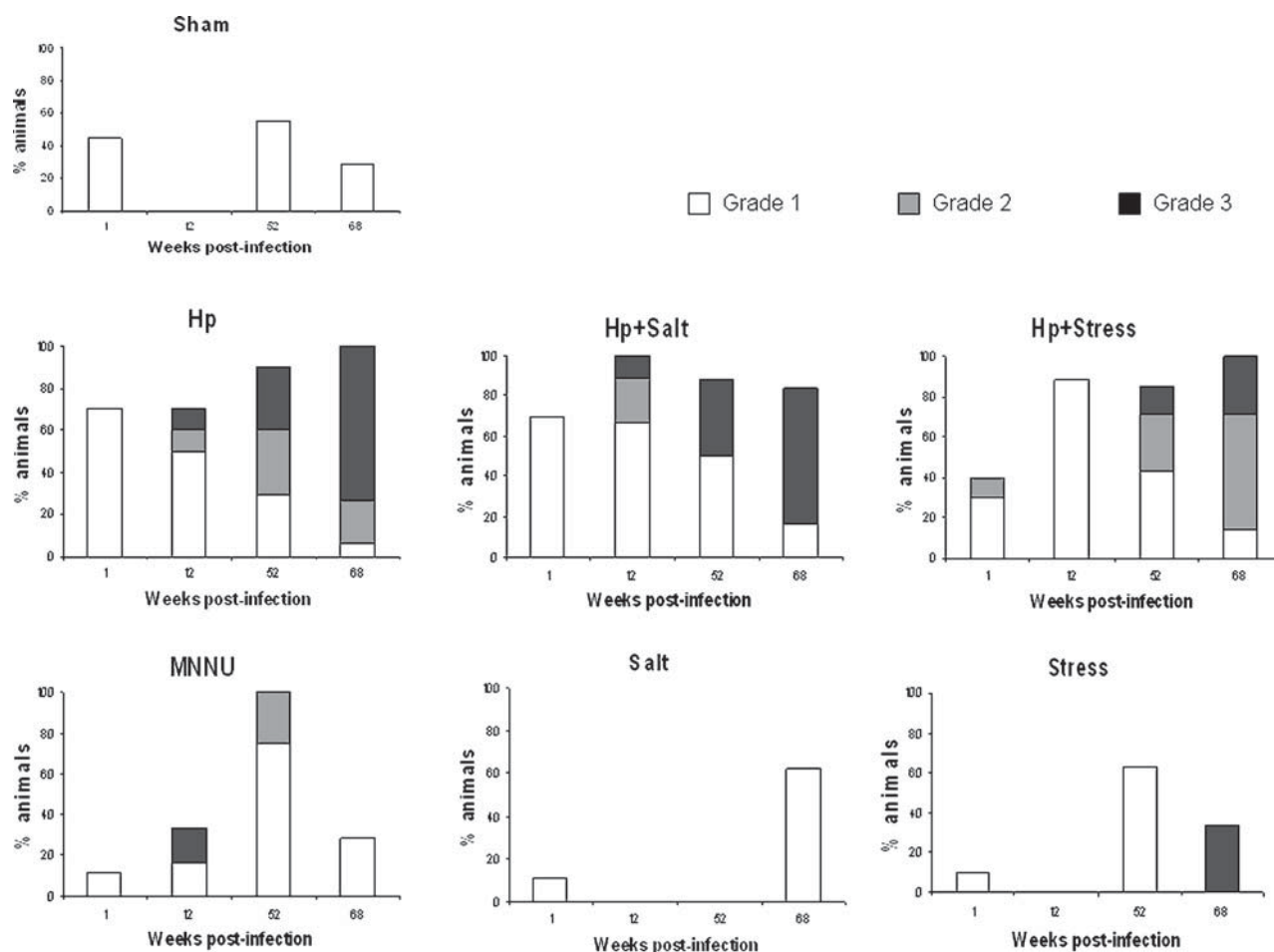


Fig. 2 Minimal increase in lymphoplasmocytic gastric infiltrate was observed in the *H. pylori* + salt group. Chronic infiltrate in the MNNU, salt, and stress groups could be related to mucosal erosion or ulceration

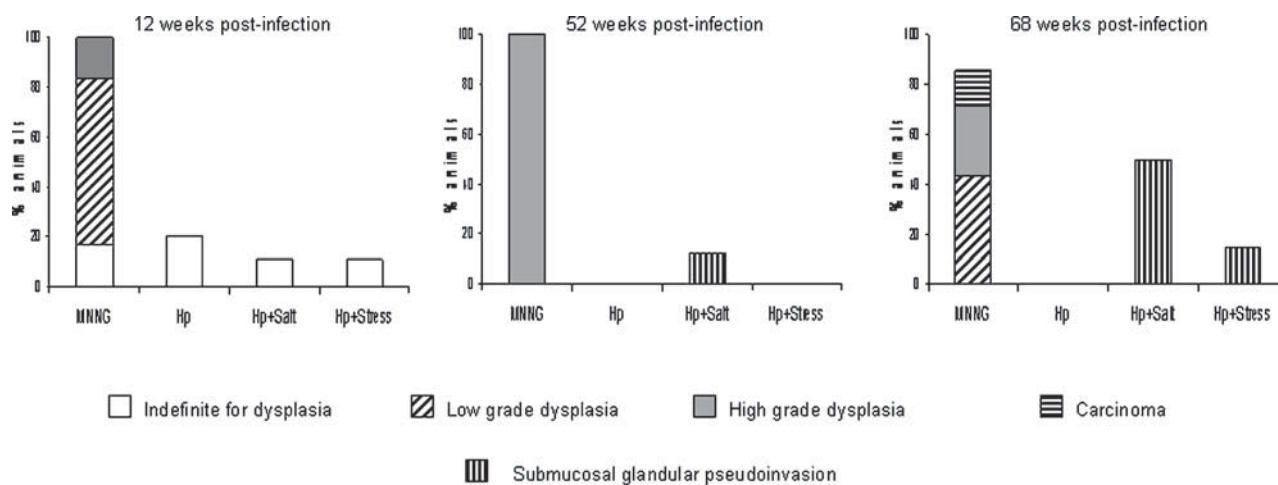


Fig. 3 Gastric mucosal lesions. Chemical carcinogenesis was clearly demonstrated for MNNU. Indefinite dysplasia in *H. pylori*-infected and synergized groups at 12 weeks is probably related to the dense acute and chronic inflammatory infiltrate. Salt and stress added to *H. pylori*-infected groups were associated with increases in heterotopic proliferative glands in gastric submucosa at 52 and 68 weeks

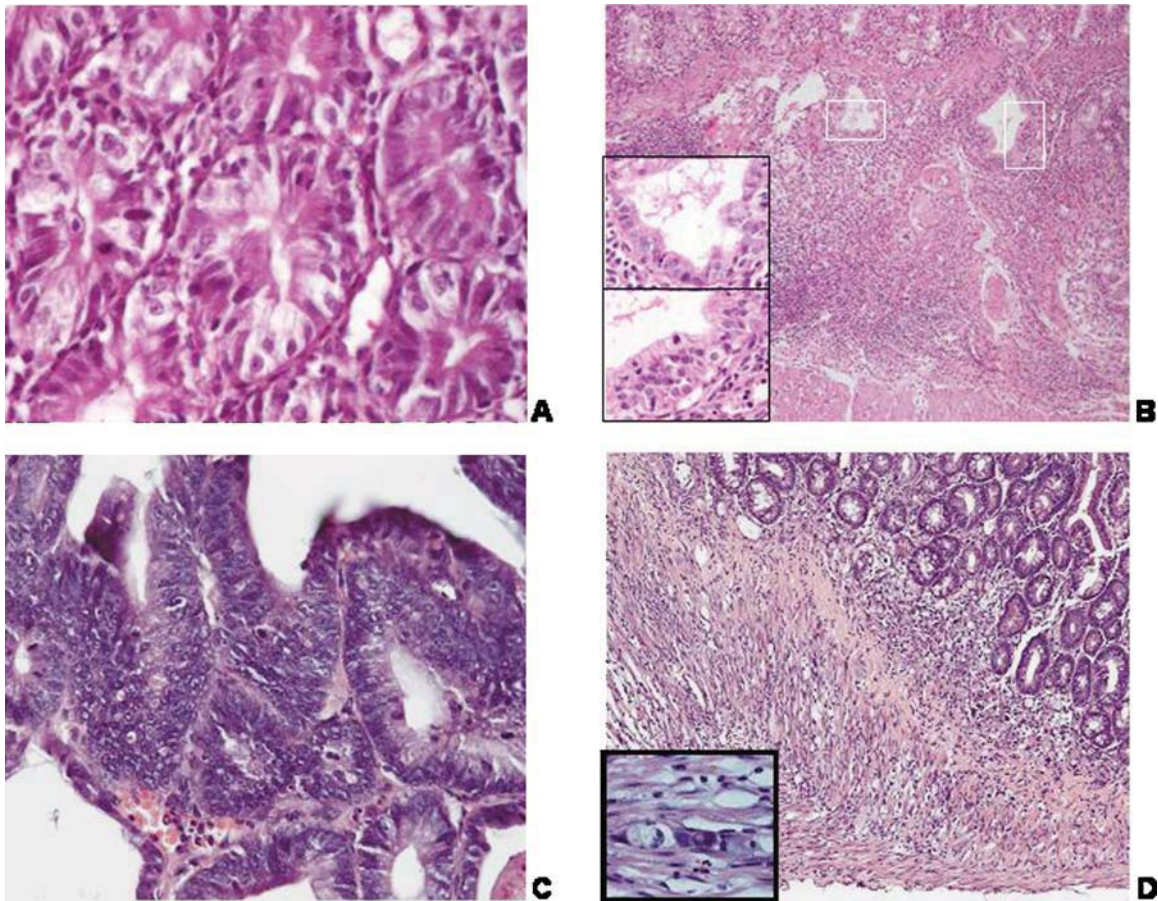


Fig. 4 Gastric morphology in gerbils. (A) Nuclear enlargement and minimal polarity loss with glandular crowding characterized indefinite dysplastic changes in *H. pylori*-infected animals. (Original magnification, $\times 200$.) (B) Submucosal glands with a hyperplastic aspect—stratification, nuclear variability, small nucleoli, and scattered mitotic figures (insets)—qualified as heterotopic proliferative glands, but not

as invasive intestinal adenocarcinoma. (Original magnification, $\times 100$; insets, $\times 1000$.) (C) High-grade dysplasia in MNNG-treated animals and (D) diffuse carcinoma infiltrating through the muscularis propria. (Original magnifications: C, $\times 200$; D, $\times 100$.) The inset shows mucous vacuoles and signet ring morphology with the use of the chemical carcinogen. (Original magnification, $\times 1000$.)

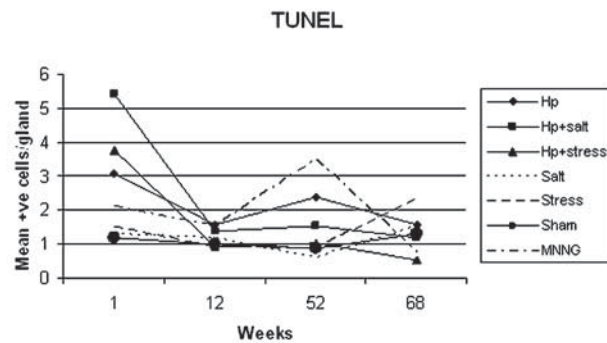
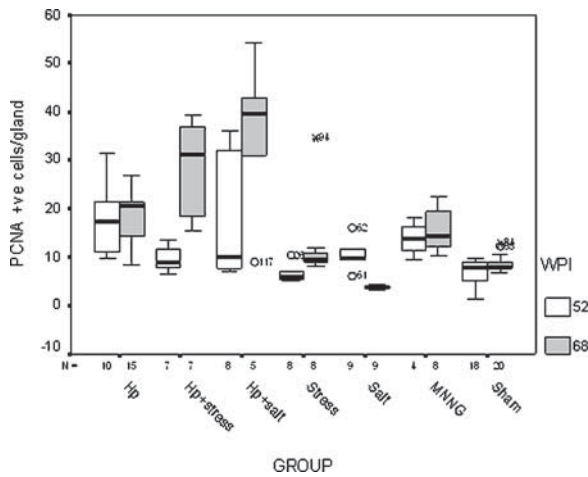


Fig. 5 Epithelial cell proliferation and apoptosis. An increase in PCNA-positive cells was only documented at 68 weeks in *H. pylori*-infected gerbils with 8% higher salt added compared with the *H. pylori*-

only animals ($P < 0.0001$). A global decrease in TUNEL-positive cells compared with earlier experiments was observed at 52 and 68 weeks

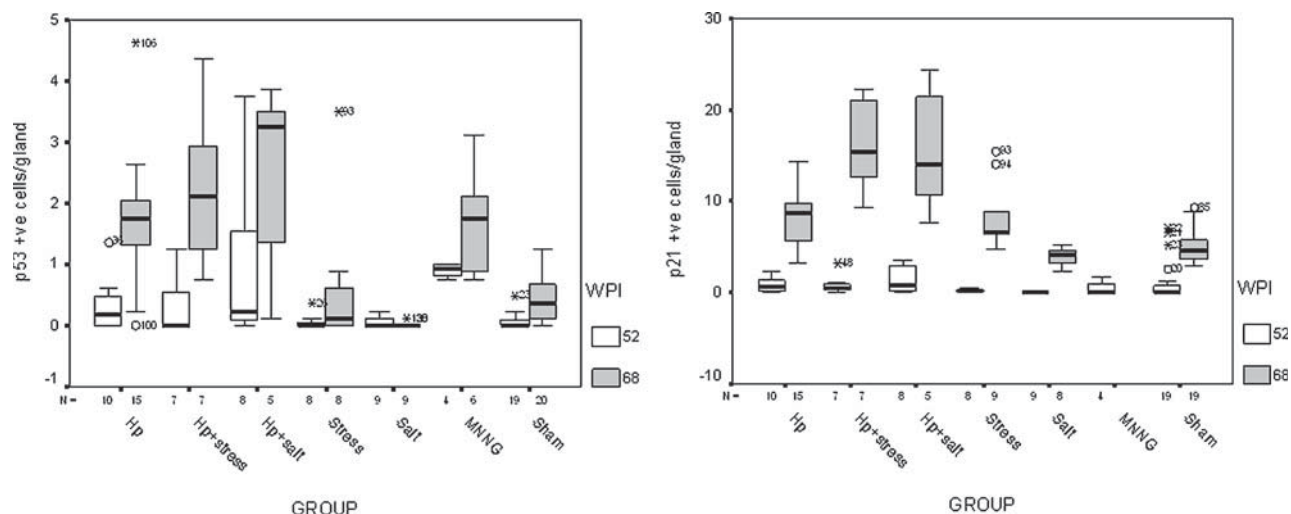


Fig. 6 The trend of increased p53 staining in synergized animals. However, a significant increase in p21 nuclear expression was identified in stress and salt synergized *H. pylori*-infected gerbils compared with infected-only animals (both P 's < 0.0001)

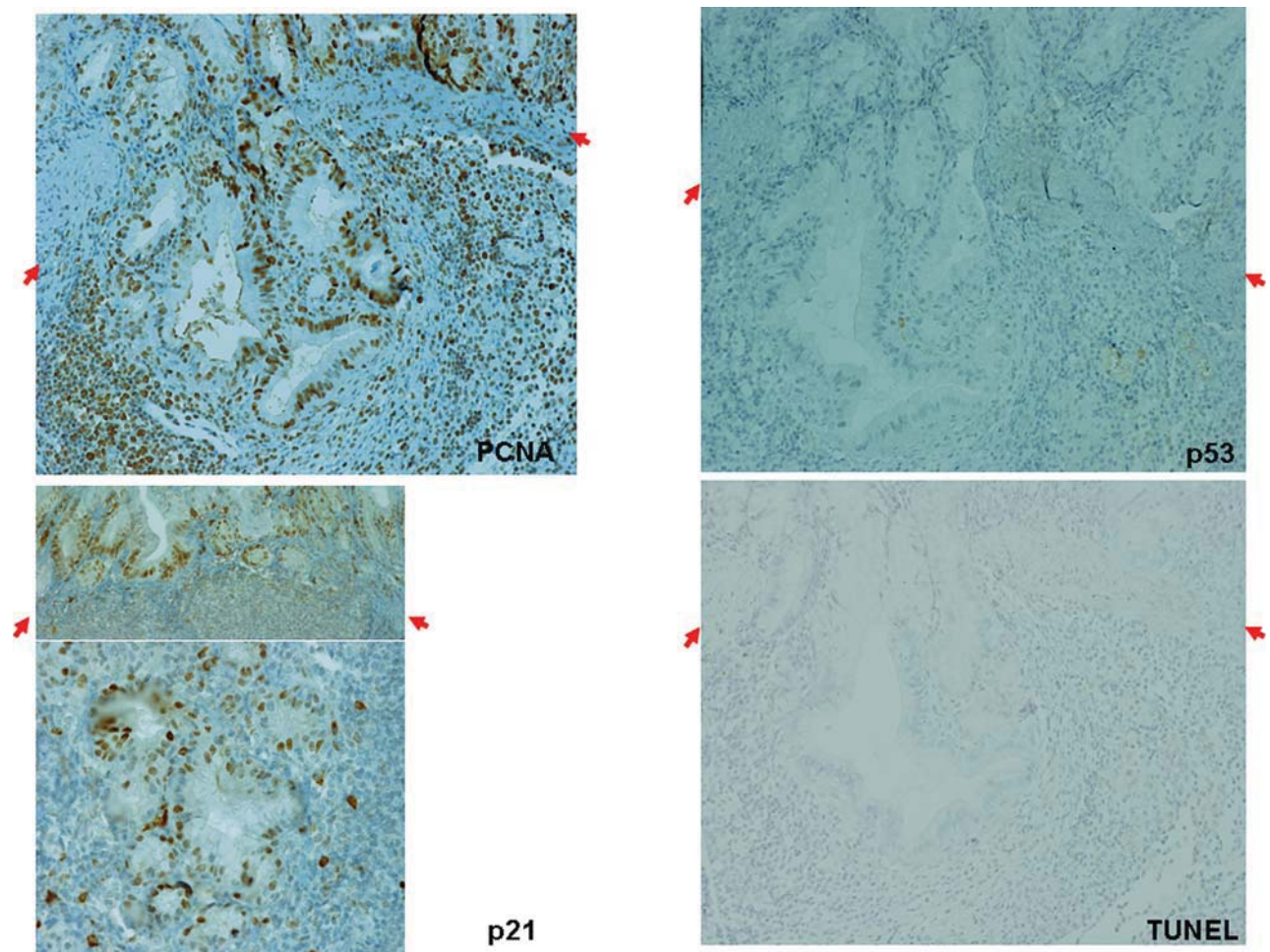


Fig. 7 Submucosal gland invasion showed extensive nuclear PCNA expression in epithelial cells and background lymphocytes. p21 nuclear staining is observed at the base of antral glands and in submucosal glandular clusters admixed with scattered positive inflammatory cells. Consecutive sections of the PCNA-positive slide are seen without p53 or TUNEL reactivity. Arrows indicate muscularis mucosae

Compared with sham treatment, *H. pylori* alone induced a higher rate of proliferation from 52 weeks that persisted at 68 weeks of follow-up (both P 's = 0.001), and in the longest experiment it was also associated with greater p53 nuclear expression ($P < 0.001$). p53 expression occurred earlier in MNNG-treated gerbils, with p21 increases ($P = 0.02$) but without effect on cell proliferation. Comparing *H. pylori* and MNNG effects, the only difference was greater p21 expression in the latter at 52 weeks ($P < 0.001$).

Chronic 8% salt intake or stress alone was not enough to significantly increase PCNA, p53, or p21 nuclear staining compared with that of intact animals.

The numbers of TUNEL-positive cells were lower in the chronic phases (52 and 68 WPI) than in the acute and subacute phases of the experiments (Fig. 5).

Discussion

A synergism in inflammatory response, heterotopic glandular pseudoinvasion, epithelial cell proliferation, and p21 expression was observed in *H. pylori*-infected gerbils submitted to stressors or to high salt intake in a long follow-up experiment, without the use of a chemical initiator. *H. pylori* infection per se was not enough to induce either epithelial dysplasia or gastric carcinoma at 68 weeks of follow-up.

After 30 min of water immersion, *H. pylori*-infected gerbils developed gastric bleeds and ulcers in a 12-week experiment, without synergy with inflammatory lesions [20]. Our results at 52 and 68 weeks showed greater acute inflammatory infiltrate and epithelial cell proliferation in the Hp + stress group compared with the *H. pylori*-infected group. No clear synergy in this group was observed regarding chronic inflammation, but at 68 weeks a gerbil with grade 3 chronic gastritis showed a focus of heterotopic proliferative glands. The increase in mucosal lesions in stressed animals could be explained by the use of two stressors, chronically and acutely administered to avoid gerbils adaptation, a maneuver not included in the previous report [20].

Minimal acute and chronic inflammatory infiltrate was observed in animals supplemented with salt, a known dose-dependent event [28]. Greater acute and chronic inflammatory infiltrate in a shorter time was observed in those *H. pylori*-infected animals with 8% salt added to their diet (Figs. 1 and 2). The presence of the morphologic hallmark of *H. pylori* gastric infection, active chronic follicular gastritis, was synergized by a higher salt content in the gerbils' diet. The expected changes associated with the intense acute and chronic inflammation in salt-treated gerbils included a higher epithelial proliferative rate with a decrease in apoptotic indexes, both findings previously described in shorter

experiments [14, 15] and confirmed in the present study at the 68-week follow-up.

Should we interpret heterotopic proliferative glands (HPGs) as an early step in gastric carcinogenesis in gerbils? There is not a clear answer. Current evidence showing a higher proliferative rate and the absence of complete regression of HPGs with intestinal phenotype [29], as well as its presence in chronically damaged gastric mucosa, suggests so. In the present study, HPGs were observed in the synergy groups; more than a focus of HPG in two infected animals with 8% higher salt intake and a focus in a gerbil in the Hp + stress group, with higher proliferative rates and p21 overexpression, but without dysplastic changes or abnormal mitosis in epithelial cells (Figs. 4 and 7). This intriguing profile—high proliferation and high p21 expression in the absence of p53 expression—has been observed in terminally differentiated or senescent gastric epithelial cells [30], rather than in neoplastic lesions. However, p21 increases could be related to the effect of nuclear factor- κ B, a product of *H. pylori*/epithelium interaction that induces p21 expression [31].

Genotoxic damage precluded a stronger and diffuse reactivity for p53 in the MNNG-treated group at 12 and 52 weeks, with a modest increase in p21 expression, confirming previous reports of independent activation of p53 and p21 [32]. None of the gerbils in the *H. pylori*-only group developed HPGs at either 52 or 68 WPI. The apoptotic rate decreased globally at 68 weeks in all infected animals, more pronounced in the synergy groups (Fig. 5)

The search for cofactors in gastric carcinogenesis should be made using standardized and reliable criteria for preneoplastic and neoplastic lesions in animal models. It is clear to our group and some others [26] that the once published invasive lesions are probably not carcinomas, and in this study, the developed carcinoma was identified in a MNNG-treated gerbil after 68 weeks and its phenotype was diffuse, with signet ring cells. Besides the biological differences in both studies using the *cagA* + *H. pylori* strain, an explanation for the result contrasting with the previous reports [5, 6] is the use of a different nomenclature for noninvasive neoplastic lesions and well-differentiated carcinomas in the gastric mucosa, a recognized difference between the Japanese and the Occidental approaches in the study of gastric pathology in humans [33, 34]. Pathologists using the Eastern approach tend to overgrade dysplastic changes and easily reach a diagnosis of gastric carcinoma [33]. Beyond the semantic differences, it has been shown that the pseudoinvasive glandular changes observed in gerbil gastric submucosa regresses once *H. pylori* infection is eradicated [29, 35]. However, these proliferative glands can show atypical morphology related to the coexistent acute and chronic inflammation, contributing to their overdiagnosis as gastric adenocarcinoma.

In summary, salt or stress synergizes the inflammatory damage, gastric mucosa proliferation, and apoptosis

decrement in chronically infected gerbils. Heterotopic proliferative gastric glands were observed only in the Hp + salt and Hp + stress groups, and its cytological appearance as well as p21 expression suggests degenerative changes in terminally differentiated cells. No gastric cancer development was observed in *H. pylori*-infected or synergized groups. The sequence metaplasia-dysplasia-carcinoma and p53 accumulation was only observed in MNNG-treated gerbils.

References

- IARC (1994) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Press, Lyon, France, p 61
- Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray ChJL (2002) Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site. II. Results for the global burden of disease. *BMC Can* 2:37
- Correa P (1988) A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 48:3554–3560
- Yamaguchi N, Kakizoe T (2001) Synergistic interaction between *Helicobacter pylori* gastritis and diet in gastric cancer. *Lancet Oncol* 2:84–9
- Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M (1998) *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 115:642–648
- Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M (1998) Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in mongolian gerbils. *Cancer Res* 58:4255–4259
- Hirayama F, Takagi S, Iwao E, Yokoyama Y, Haga K, Hanada S (1999) Development of poorly differentiated adenocarcinoma and carcinoid due to long-term *Helicobacter pylori* colonization in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol* 34:450–454
- Shimizu N, Inada K, Nakanishi H, Tsukamoto T, Ikehara Y, Kaminishi M, Kuramoto S, Sugiyama A, Katsuyama T, Tatematsu M (1999) *Helicobacter pylori* infection enhances glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils treated with chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 20:669–676
- Tokieda M, Honda S, Fujioka T, Nasu M (1999) Effects of *Helicobacter pylori* infection on the *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Carcinogenesis* 20:1261–1266
- Joossens JV, Geboers J (1981) Nutrition and gastric cancer. *Nutr Cancer* 2:250–261
- Tsugane S, Sasazuki S, Kobayashi M, Sasaki S (2004) Salt and salted food intake and subsequent risk of gastric cancer among middle-aged Japanese men and women. *Br J Cancer* 90:128–134
- De Stefani E, Correa P, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Mendilaharsu M (2004) Dietary patterns and risk of gastric cancer: a case-control study in Uruguay. *Gastric Cancer* 7:211–220
- World Health Organization (2003) Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO Technical Report Series 916. World Health Organization, Geneva
- Bergin IL, Sheppard BJ, Fox JG (2003) *Helicobacter pylori* infection and high dietary salt independently induce atrophic gastritis and intestinal metaplasia in commercially available outbred mongolian gerbils. *Dig Dis Sci* 48:475–485
- Nozaki K, Shimizu N, Inada K, Tsukamoto T, Inoue M, Kumagai T, Sugiyama A, Mizoshita T, Kaminishi M, Tatematsu M (2002) Synergistic promoting effects of *Helicobacter pylori* infection and high-salt diet on gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Jpn J Cancer Res* 93:1083–1089
- Peters MN, Richardson CT (1983) Stressful life events, acid hypersecretion, and ulcer disease. *Gastroenterology* 84:114–119
- Ngoan LT, Yoshimura T (2003) Work, salt intake and the development of stomach cancer. *Med Hypotheses* 60:552–556
- Kitagawa H, Fujiwara M, Osumi Y (1979) Effects of water-immersion stress on gastric secretion and mucosal blood flow in rats. *Gastroenterology* 77:298–302
- Kim Y-H, Lee SS, Cho EY, Oh YL, Son HJ, Rhee P-L, Kim JJ, Koh KC, Paiks SW, Rhee JC, Choi KW (2002) Long-term stress and *Helicobacter pylori* infection independently induce gastric mucosal lesions in C57BL/6 mice. *Scand J Gastroenterol* 37:1259–1264
- Yamamoto N, Sakagami T, Fukuda Y, Koizuka H, Hori K, Sawada Y, Hikasa Y, Tanida N, Shimoyama T (2000) Influence of *Helicobacter pylori* infection on development of stress-induced gastric mucosal injury. *J Gastroenterol* 35:332–340
- Peek Jr RM, Wirth H-P, Moss SF, Yang M, Abdalla AM, Tham KT, Zhang T, Tang LH, Modlin IM, Blaser MJ (2000) *Helicobacter pylori* alters gastric epithelial cell cycle events and gastrin secretion in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 118:48–59
- Suzuki H, Miyazawa M, Nagahashi S, Mori M, Seto K, Kai A, Suzuki M, Miura S, Ishii H (2002) Attenuated apoptosis in *H. pylori*-colonized gastric mucosa of Mongolian gerbils in comparison with mice. *Dig Dis Sci* 47:90–99
- Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY (1999) Relationship between *Helicobacter pylori* *ice A*, *cag A*, and *vac A* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 3:2274–2279
- Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P (1996) Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system. *Am J Surg Pathol* 20:1161–1181
- Rugge M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, Leandro G, Lewin K, Riddell RH, Sipponen P, Watanabe H (2000) Gastric dysplasia. The Padova international classification. *Am J Surg Pathol* 24:167–176
- Elfvin A, Bölin I, von Bothmer C, Stolte M, Watanabe H, Fändriks L, Vieth M (2005) *Helicobacter pylori* induces gastritis and intestinal metaplasia but no gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils. *Scand J Gastroenterol* 40:1313–1320
- Arista-Nasr J, Jimenez A, Keirns C, Larraza O, Larriva-Sahd J (1981) The role of endoscopic biopsy in the diagnosis of gastric lymphoma: a morphologic and immunohistochemical reappraisal. *Hum Pathol* 22:339–348
- Vences Mejía A, Caballero Ortega H, Dorado González V, Gamboa-Dominguez A, Gómez Ruiz C, Camacho-Carranza R, Espinosa-Aguirre JJ (2005) Cytochrome P450 expression in rat gastric epithelium with intestinal metaplasia induced by high dietary NaCl levels. *Env Toxicol Pharmacol* 20:57–64
- Nozaki K, Shimizu N, Tsukamoto T, Inada K, Cao X, Ikehara Y, Kaminishi M, Sugiyama A, Tatematsu M (2002) Reversibility of heterotopic proliferative glands in glandular stomach of *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils on eradication. *Jpn J Cancer Res* 93:374–381
- Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, Yokozaki H, Semba S, Shimamoto F, Tahara E (1996) Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the stomach: Relationship with p53 status and proliferative activity. *J Pathol* 180:122–128
- Basak Ch, Pathak SK, Bhattacharyya A, Mandal D, Pathak S, Kundus M (2005) NF- κ B- and C/EBP β -driven interleukin-1 β gene expression and PAK1-mediated caspase-1 activation play essential roles in interleukin-1 β release from *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Biol Chem* 280:4279–4288

32. Craanen ME, Blok P, Offerhaus GJA, Meijer GA, Dekker W, Kuipers EJ, Meuwissen SGM (1999) p21^{waf1/cip1} expression and the p53/MDM2 feedback loop in gastric carcinogenesis. *J Pathol* 189:481–486
33. Ridell RH, Iwafuchi M (1998) Problems arising from Eastern and Western classifications systems for gastrointestinal dysplasia and carcinoma: Are they resolvable? *Histopathology* 33:197–202
34. Lawers GY, Shimizu M, Correa P, Riddell RH, Kato Y, Lewin KJ, Yamabe H, Sheahan DG, Lewin D, Sipponen P, Kubilis PS, Watanabe H (1999) Evaluation of gastric biopsies for neoplasias: differences between Japanese and Western pathologists. *Am J Surg Pathol* 23:511–518
35. Cao X, Tsukamoto T, Nozaki K, Shimizu N, Mizoshita T, Kumagai T, Kaminishi M, Tatematsu M (2004) Eradication of *Helicobacter pylori* induces apoptosis and inhibits proliferation of heterotopic proliferative glands in infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci* 95:872–877