Instituto Nacional de Salud Pública

Escuela de Salud Pública de México

Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas

"Desarrollo de un modelo murino de infección aguda por *Helicobacter pylori*: comparación de las cepas de ratón BALB/c y C57BL/6"

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias de la Salud

Área de Concentración en Enfermedades Infecciosas

Presenta:

Q.B.C. Francisco Eduardo Egurrola Delgado

Director de Tesis:

Dra. Guadalupe Ayala Aguilar

Asesores:

Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales

Dra. Vera Lucía Petricevich

Dra. Wendy Itzel Escobedo Hinojosa

Cuernavaca, Morelos. Noviembre 2013

A mi madre,
Indudablemente el universo marcha como debiera…

A mi padre,
¿Por qué estarías fuera de mi mente?

A mi esposa e hija…
Las dos son todo para mí,
Mis palabras y su significado,
Mi oración y mi bendición,
Mi luna y mi sol,
Mi amor y mi vida,
Mi alma gemela y una parte de mi alma.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por haberme puesto en este camino lleno de obstáculos, enseñanzas y bendiciones.

A mi madre, por apoyarme en cada momento de mi vida, por creer en mí y por siempre tener un "te quiero"... ¡ahora entiendo, te amo!

A mi padre, por las valiosas lecciones y por su gran amor. Te extraño día con día… tu recuerdo sigue vivo.

A mi hermano Julio, por estar ahí desde el día 1, por tu gran apoyo y consejos... eres un gran ejemplo, ¡gracias!

A mi esposa e hija, por su compañía, apoyo incondicional y sacrificio realizado, pero sobre todo por el inmenso amor que me dan. Son, sin duda, lo mejor de mi vida y las amo con todas mis fuerzas, mi alma y mi ser.

A mis suegros Dina y Luis, por toda su ayuda en todos los sentidos, pero sobre todo gracias por recibirme y hacerme sentir como en mi propia casa. A mi cuñado Jorge Iván, por ser no solo un amigo más, sino un hermano.

A la Dra. Guadalupe Ayala, por permitirme realizar este proyecto, por toda su paciencia, consejo y tiempo invertido. Al Dr. Víctor Bermúdez, por su grandísima ayuda y asesoría en el trabajo experimental y de escritura. A la Dra. Irma Romero Álvarez y la Dra. Wendy Escobedo, por su asesoría y colaboración en la producción de resultados.

A la técnico académico Raquel Guerrero Alquicira del Departamento de Biología Celular y Tisular, por su destacable asistencia en la realización de las técnicas histológicas.

A la M. en C. Eva Hernández, por su apoyo con técnicas y actitud entusiasta. A Emmanuel Ramírez, por todo su tiempo y apoyo. A la Dra. Gaby Martínez por su aporte con la sección estadística. Gracias a todos los que de alguna manera u otra contribuyeron al presente trabajo.

Al M. en C. Herbey Padilla, por tu gran amistad, por los buenos momentos que pasamos y sobre todo por el amor que le demuestras a mi pequeña hija.

A todos mis compañeros de maestría, por su invaluable amistad. En Sonora tienen su casa.

RECONOCIMIENTOS

La realización de este trabajo de tesis de maestría se llevó a cabo en el Laboratorio 2 Planta Baja del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas en el Instituto Nacional de Salud Pública, bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Ayala Aguilar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través de la beca para estudios de posgrado número: 259406.

Al Instituto Nacional de Salud Pública, por recibirme como estudiante y prepararme académicamente.

RESUMEN

El 50% de la población mundial se encuentra colonizada por *Helicobacter pylori*. La mayoría de los infectados son asintomáticos, no obstante, se estima que entre estos, el 10% es propenso a padecer úlcera péptica, y el 1% a desarrollar cáncer gástrico. La infección por *H. pylori in vivo* se ha investigado utilizando modelos animales, ya que ofrecen la posibilidad de examinar mecanismos de transmisión, patogénesis y para desarrollo de terapias y vacunas. Sin embargo, las cepas adaptadas a ratón disponibles actualmente se consideran de baja virulencia. Por lo anterior, utilizamos la cepa 019-07MX la cual cuenta con un genotipo *vacA s1m1* y *cagA+,* considerada de alta virulencia pues expresa estas 2 toxinas relacionadas con los resultados severos de la infección. Se establecieron las condiciones óptimas de crecimiento de *H. pylori* para la generación del inóculo, el cual fue administrado a ratones BALB/c y C57BL/6. Los niveles de colonización fueron distintos en las dos cepas de ratón, siendo más elevados en los ratones C57BL/6. Asimismo, los cambios histopatológicos observados en los ratones C57BL/6 fueron más severos que en los ratones BALB/c, en estos últimos solo se observó una inflamación leve. Por otra parte, los perfiles de citocinas mostraron que los niveles de expresión de las distintas citocinas eran más elevados en ratones BALB/c a la primera semana post-inóculo, mientras que esto ocurría en los ratones C57BL/6 a la segunda semana. Por los mayores niveles de infección, cambios histológicos y menor expresión de citocinas a la primera semana, los ratones C57BL/6 se consideran como la mejor cepa para establecer una infección.

Palabras Clave: *Helicobacter pylori,* BALB/c, C57BL/6, modelo murino

INDICE

RECONOCIMIENTOS iii

RESUMEN iv

INDICE v

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS vii

Lista de Tablas vii

Lista de Figuras vii

Lista de Gráficas vii

ABREVIATURAS viii

INTRODUCCIÓN 1

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 3

ANTECEDENTES 5

Epidemiología 5

Transmisión 7

Helicobacter pylori 7

Factores de colonización 11

Factores de virulencia 14

Respuesta inmune contra *H. pylori* 19

Modelo animal 23

Cepas de ratón 25

H. pylori cepa 019-97MX 26

MAPA CONCEPTUAL 27

JUSTIFICACIÓN 28

HIPOTESIS 29
OBJETIVOS GENERALES 30
Objetivos Específicos 30
MATERIALES Y MÉTODOS 31
Microrganismo y condiciones de cultivo 31
Experimentación con Animales 33
Análisis Histopatológico 40
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 42
RESULTADOS 43
DISCUSIÓN 59
CONCLUSIONES 66
PERSPECTIVAS 67
REFERENCIAS 68

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Lista de Tablas

Tabla 1.- Infección por *Helicobacter pylori* a nivel mundial. 6

Tabla 2.- Oligonucleótidos utilizados en el análisis de la expresión de citocinas por RT-PCR 39

Tabla 3. UFC/g de tejido en las distintas cepas de ratón a diferentes tiempos 51

Lista de Figuras

Figura 1. Micrografía electrónica de *Helicobacter pylori*. 8

Figura 2. Alteraciones en la señalización molecular inducida por la entrega intracelular de CagA. 18

Figura 3. Cultivo de estómago de ratones y tinciones Gram. 47

Figura 4. Perfil del epitelio gástrico de ratones control y de ratones inoculados sacrificados a las 24 y 48 horas. 52

Figura 5. Figura 5. Perfil del epitelio gástrico de ratones inoculados sacrificados a las 72 horas y 7 días. 54

Figura 6. Tinción Warthin-Starry del epitelio gástrico de ratones control y ratones sacrificados a los 7 días post-inóculo. 55

Lista de Gráficas

Gráfica 1. Prueba de motilidad. 44

Gráfica 2. Comparación de promedios de peso entre ratones control y experimentales 45

Gráfica 3. Niveles de expresión de las diferentes citocinas. 58

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Células presentadoras de antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	Cultivo de colección de tipo americano
cADN	ADN complementario
CagA	Gen asociado a citotoxina A
CV	Convencionales
D.O.	Densidad óptica
DAF	Factor de deterioro acelerado
EPIYA	Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala
GPI	Glicofosfatidilinositol
Hop	Proteínas de membrana externa de Helicobacter
Hsp	Proteína de choque térmico
IARC	Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer
IFN-γ	interferón-γ
IL	Interleucina

LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NF-κB	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	Células asesinas naturales
NOD	Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
OMP	Proteínas de membrana externa
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
SPF	Libres de patógenos específicos
SS1	Cepa Sidney 1
Tfh	Células Th foliculares
TFSS	Sistema de secreción tipo IV
TGF-β	Factor de crecimiento transformante-β
Th	Células T cooperadoras
TLR	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
Tregs	Células T reguladoras
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
URE	Unidades relativas de expresión
VacA	Citotoxina Vacuolizante A

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa que infecta aproximadamente al 50% de la población alrededor del mundo y se especializa en la colonización del estómago humano; después de la primera infección, la cual ocurre comúnmente en etapas tempranas de la vida, se establece una infección crónica. La mayoría de las personas infectadas son asintomáticas, sin embargo, entre el 15 y el 20% de ellos desarrollan patologías gastroduodenales severas, como lo son úlcera estomacal y duodenal, adenocarcinoma y linfoma estomacal.[1-4]

H. pylori ha desarrollado un repertorio de factores de colonización y virulencia, los cuales le permiten sobrevivir a las condiciones hostiles del estómago. Dentro de los factores de colonización, la bacteria produce ureasa para neutralizar el pH del medio que la rodea, su forma helicoidal y la acción de su flagelo le permiten cruzar la gruesa capa de moco que cubre el estómago. También cuenta con la capacidad de unirse a los antígenos de Lewis y otros receptores presentes en las células gástricas del hospedero y secreta factores que atraen y estimulan células inflamatorias. Por otro lado, cuenta con la toxina multifuncional VacA y contiene también la isla de patogenicidad *cag*PAI, la cual codifica para un sistema de secreción tipo IV, el cual parece ser necesario para su adaptación óptima y la aparición de rasgos de patogenicidad.[1]

La colonización del estómago por *H. pylori* induce una respuesta inmune innata que en general es un proceso no específico, que reconoce varias moléculas bacterianas. Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa se retrasa, es antígeno específica, conduce a la activación de células T, B y células de memoria[5], sin embargo, estas respuestas en general no resultan en la eliminación de la bacteria.[4] En ausencia de terapia con antibióticos, *H. pylori* puede persistir en el estómago humano por décadas o durante la vida entera.[6]

Los factores de virulencia de la bacteria y la respuesta inmune del hospedero juegan un papel importante para la colonización del epitelio gástrico y el desarrollo

de patologías como gastritis, úlcera y cáncer gástrico. Hasta ahora, los factores específicos de *H. pylori* necesarios para la infección no han sido estudiados por la ausencia de modelos experimentales fácilmente disponibles.[7] Los modelos de infección de *H. pylori* que existen actualmente simulan las enfermedades en el humano. Sin embargo, estos modelos animales, los cuales, a pesar de sus complicaciones y limitaciones, empiezan a proveer información valiosa con respecto a los factores implicados en la colonización de la mucosa gástrica y la importancia de los factores del hospedero en el desarrollo de atrofia gástrica, así como la participación de la respuesta inmune por parte del hospedero. Cada modelo tiene sus desventajas y limitaciones, entre las que se encuentran el costo y la dificultad del mantenimiento de los animales utilizados, por lo que es importante que esto sea tomado en cuenta si se planea usar animales para experimentación *in vivo.*[8]

El modelo murino proporciona una excelente oportunidad para analizar la génesis y la regulación de la gastritis crónica inducida por *Helicobacter* y permite la manipulación de diversos factores putativos patológicos, así como las células y sus efectores, tales como citocinas y anticuerpos, todo esto gracias a la disponibilidad de mutantes transgénicos, asimismo proporciona la oportunidad de trabajar en el desarrollo de vacunas contra la bacteria.[9]

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Helicobacter pylori es un patógeno gástrico humano que cumple con cada uno de los postulados de Koch relacionados con la etiología de la gastritis activa y crónica. La infección con *H. pylori* causa varias complicaciones como úlceras, linfomas y adenocarcinomas gástricos. Sin embargo, sólo una pequeña parte de las personas colonizadas llegan a desarrollar estas complicaciones. Los diversos resultados pueden estar relacionados con los cambios seculares que se han producido en el genoma del agente bacteriano, así como en los cambios ecológicos que tienen lugar en el entorno del huésped humano.[10, 11]

La inflamación inducida por *H. pylori* es la responsable del deterioro del epitelio gástrico, que va desde la gastritis crónica/activa a gastritis atrófica lo cual ahora es aceptado como el escenario que lleva al desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico.[12]

Los modelos animales ofrecen la posibilidad para examinar los mecanismos de transmisión, patogénesis y para el desarrollo de nuevas terapias y vacunas.[13] Los primeros modelos de infección por *Helicobacter* involucraron animales grandes, como los primates no humanos, cerdos, entre otros, los cuales dieron lugar a información importante, sin embargo, son modelos complejos, costosos, y sólo estaban disponibles para algunos investigadores.[14]

Posteriormente, se logró crear un modelo de infección mediante el uso de cepas de *Helicobacter felis;* dicho modelo lograba colonizar el estómago de ratones y generaba gastritis, el cual fue de gran utilidad para el desarrollo de compuestos antimicrobianos.[13] Fue entonces, en el año de 1996, que investigadores japoneses lograron infectar ratones BALB/c atímicos, y se mantuvo una infección por hasta 20 semanas, considerándose este modelo como un sustituto para probar compuestos antimicrobianos.[13]

En 1997, Lee y colaboradores[14], lograron aislar una cepa, a la cual denominaron cepa Sydney 1 (SS1), que fue capaz de infectar ratones C57BL/6 y BALB/c. A partir de entonces, es esta cepa la que se ha utilizado en la mayoría de los estudios. No obstante, es considerada de baja virulencia ya que a pesar de tener la habilidad de infectar ratones, no estimula la expresión de interleucina (IL)-8, citocina involucrada en el reclutamiento de neutrófilos en las etapas iniciales del proceso inflamatorio; de igual forma, no produce la citotoxina vacuolizante, factor de virulencia implicado en la ulceración del epitelio gástrico.[15]

Existe por lo tanto, la carencia de una cepa virulenta de *H. pylori* que a su vez esté adaptada para colonizar el epitelio gástrico de los ratones y que cuente con el fenotipo de VacA capaz de generar vacuolización, estimular la expresión de IL-8 y que cuente con la isla de patogenicidad completa. La cepa 019-97MX, la cual fue aislada de un paciente con adenocarcinoma gástrico, cuenta con el genotipo *vacA s1m1*, la isla cagPAI y la citotoxina CagA, una de sus características particulares es su habilidad para crecer en medios libres de proteínas exógenas, siendo esta cepa sensible a todos los antibióticos utilizados en el tratamiento de esta bacteria. La utilización de dicha cepa en un modelo murino puede ser utilizado para investigar el desarrollo de la respuesta inmune, así como para llevar a cabo estudios sobre generación de nuevos fármacos y vacunas dirigidos a cepas de alta virulencia.

ANTECEDENTES

Epidemiología

Más de la mitad de la población mundial se encuentra infectada por la bacteria *Helicobacter pylori,* considerada la infección más ampliamente distribuida alrededor del mundo, la cual causa gastritis aguda y crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico.[3, 16]

Las tasas de infección varían de país a país, en 1997 se calculaban frecuencias del 25% para países desarrollados y de más del 90% en países en vías de desarrollo.[17] En la tabla 1 se muestra la prevalencia de la infección en los diferentes países alrededor del mundo.[18] En algunas subpoblaciones de Estados Unidos, la prevalencia es más elevada comparada con la población en general, y varía de acuerdo al trasfondo étnico, estatus socioeconómico y la edad.[19-21] Se ha observado que la infección se adquiere en la niñez temprana en todos los países, y en algunos de estos, hasta el 90% de los niños a la edad de 10 años se encuentran infectados, con reportes de infección en los primeros meses de vida.[7, 22] En este sentido, en 1997, Torres y colaboradores, llevaron a cabo un estudio seroepidemiológico en México donde se trabajó con un banco de sueros, en donde los resultados mostraron que el 20% de los niños de 1 año de edad presentaban anticuerpos contra la bacteria y que la seropositividad aumentó a 50% en niños de 10 años, lo que sugiere que la infección por este microrganismo ocurre en edades tempranas.[23] Asimismo, se ha observado que la tasa de infección en niños es más alta en países en desarrollo que en países industrializados, lo que probablemente se deba a las bajas condiciones de sanidad e higiene.[16] Las tasas de infección más bajas son atribuidas ampliamente a las bajas probabilidades de los niños de infectarse, a estándares de higiene más altos y al tratamiento con antibióticos contra *H. pylori*. A pesar de las altas tasas de infección en ciertas partes del mundo, la frecuencia total de la infección por *H. pylori* ha disminuido.[22]

País	Edad	Prevalencia	País	Edad	Prevalencia
África			Siberia	5	30%
Etiopía	2-4	48%	Siberia	15-20	63%
Etiopía	6	80%	Siberia	Adultos	85%
Etiopía	Adultos	>95%	Corea del Sur	16	56%
Nigeria	5-9	82%	Corea del Sur	>=16	40.6%
Nigeria	Adultos	91%	Sri Lanka	6-19	67%
Nigeria	Adultos	70%-90%	Sri Lanka	Adultos	72%
			Taiwán	9-12	11%
América Central			Taiwán	13-15	12-3%
Guatemala	5-10	51%	Taiwán	>=25	45.1%
Guatemala	Adultos	65%	Taiwán	Adultos	80%
México	5-9	43%	Australia	1-59	15.4%
México	Adultos	70%-90%	Australia	Adultos	20%
América del Norte			**Europa**		
Canadá	5-18	7.1%	Oriental	Adultos	70%
Canadá	50-80	23.1%	Occidental	Adultos	30-50%
EEUU y Canadá	Adultos	30%	Albania	16-64	70.7%
			Bulgaria	1-17	61.7%
América del Sur			Republica Checa	5-100	42.1%
Bolivia	5	54%	Estonia	25-69	69%
Brasil	6-8	30%	Alemania	50-74	48.8%
Brasil	10-19	78%	Islandia	25-50	36%
Brasil	Adultos	82%	Países Bajos	2-4	41.2%
Chile	3-9	36%	Serbia	7-18	36.4%
Chile	Adultos	72%	Suecia	25-50	11%
Chile	Adultos	70%-90%	Suiza	18-85	26.6%
			Suiza	18-85	11.9%
Asia					
Bangladesh	0-2	60%	**Medio Oriente**		
Bangladesh	0-4	58%	Egipto	3	50%
Bangladesh	8-9	82%	Egipto	Adultos	90%
Bangladesh	Adultos	>90%	Libia	1-9	50%
Hong Kong	6-19	13.1%	Libia	10-19	84%
India	0-4	22%	Libia	Adultos	94%
India	10-19	87%	Arabia Saudita	5-9	40%
India	88	88%	Arabia Saudita	Adultos	80%
India, Sur	30-79	80%	Turquía	6-17	64%
Japón, 3 áreas	20-70	55.4%	Turquía	Adultos	80%
Japón, Occidental	Adultos	70.1%			

Tabla 1. Infección por *Helicobacter pylori* a nivel mundial.[18]

En estudios realizados en Latinoamérica, en países como Costa Rica y Brasil, se ha reportado una incidencia anual de 45 enfermos de cáncer gástrico asociado a *H. pylori* por cada 100,000 habitantes.[24] En México, en las últimas décadas se ha informado un incremento de 4.43 a 9 casos por cada 100 000 habitantes.[25]

Transmisión

H. pylori es contagiosa, aunque la ruta exacta de transmisión es desconocida. La transmisión de persona a persona, ya sea por vía oral-oral o fecal-oral son las más probables. Siendo consistente con estos datos, la bacteria ha sido detectada en heces, saliva y placa dental de personas infectadas, sin embargo, la bacteria no se ha logrado cultivar a partir de estos. *Helicobacter pylori* puede ser transmitida por la vía oral mediante materia fecal ingerida en agua contaminada, así que un ambiente higiénico podría ayudar a disminuir el riesgo de infección por *H. pylori*. Estudios epidemiológicos de la transmisión muestran que la mayoría de las infecciones tienden a ocurrir dentro del núcleo familiar a través de contacto cercano de persona a persona, en donde, el riesgo de adquirir la infección se correlaciona altamente con el estatus de infección de la madre y hermanos, siendo los de mayor edad los que infectan a los menores,[26] asimismo, se relaciona con las condiciones de sobrepoblación en el hogar.[7] Contrario a esto, y de acuerdo a análisis realizados por Delport y colaboradores, se observó que la transmisión tiene un fuerte componente no familiar, y que la infección está dada en gran proporción por aquellas infecciones adquiridas en la comunidad.[26, 27] Hasta ahora, los factores específicos de *H. pylori* necesarios para la transmisión no han sido estudiados por la ausencia de modelos experimentales fácilmente disponibles.[7]

Helicobacter pylori

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo el cual tiene de dos a seis flagelos que le confieren movilidad para resistir las contracciones gástricas y penetrar el moco gástrico (Figura 1).[6] Mide de 2.4 a 4µm de largo y de 0.5 a 1µm. La mucosa gástrica del ser humano es el reservorio principal.[6, 26]

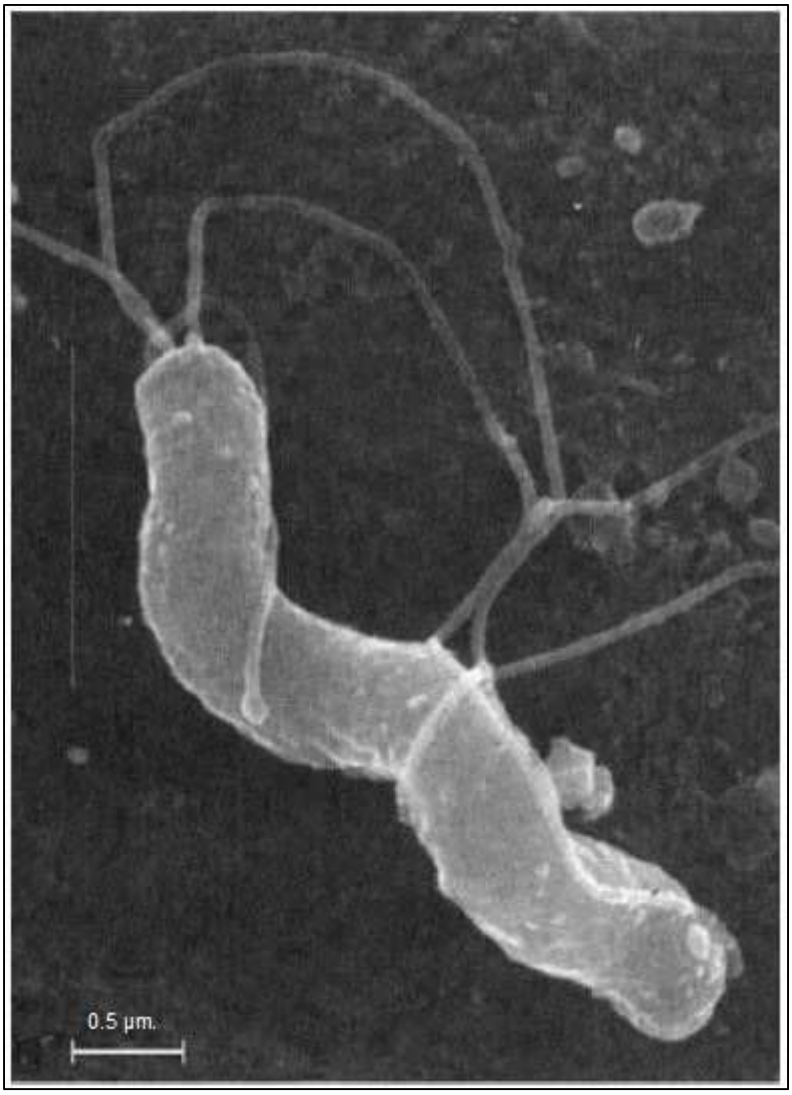


Figura 1. Micrografía electrónica de *Helicobacter pylori.* Imagen donada a Atherton por Lucinda Thompson[6]

H. pylori es una bacteria microaerofílica, y necesita bajas concentraciones de oxígeno, con óptimo crecimiento a niveles de O_2 de 2 a 5%, requiere además un 10% de CO_2 y una alta humedad. Además es positiva para las pruebas de catalasa, oxidasa, contando también con la enzima arginasa, las cuales están involucradas en proteger a la bacteria contra metabolitos tóxicos reactivos del oxígeno.[22, 28-30]

A pesar de que *H. pylori* generalmente tiene una forma en espiral, puede aparecer como bastón, mientras que las formas cocoides aparecen después de cultivos prolongados *in vitro,* condiciones de estrés, privación de nutrientes o bajo tratamiento con antibióticos.[22] Hasta ahora, no hay evidencia experimental definitiva que muestre que *H. pylori* puede revertir su forma de coco a bacilos con capacidad de infectar. En contraste, hay bastante evidencia experimental que muestra que las bacterias cultivables son infecciosas en modelos animales, en estudios de voluntarios e incluso hay reportes de transmisión accidental por uso de endoscopios contaminados.[7]

La infección por *Helicobacter pylori* es usualmente adquirida en la niñez temprana y dura por el resto de la vida en ausencia de tratamiento con antibióticos[31], y la mayoría de aquellos infectados (80%-90%) llevarán y transmitirán *H. pylori* sin presentar algún síntoma de la enfermedad.[7]

La gastritis asociada a la infección por *H. pylori* involucra la inflamación tanto aguda como crónica, lo que sugiere que las citocinas derivadas de las células T pueden ser responsables de la respuesta de inflamación aguda en curso asociada con el reclutamiento de neutrófilos al estómago.[32] La gastritis se caracteriza por una infiltración de leucocitos mononucleares y neutrófilos polimorfonucleares, con una respuesta Th1 predominantemente, acompañado de citocinas proinflamatorias como IL-1β, factor de necrosis tumoral (TNF)-α e interferón (IFN)-γ.[33] Estudios han mostrado que el contacto directo de las células epiteliales con *H. pylori* resulta en una producción de C_2-ceramida con la activación subsecuente del factor de

transcripción Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas NF-κB e IL-8. La lista de productos de *H. pylori* que inician o exacerban la inflamación de la mucosa es amplia. La respuesta inmune del hospedero a las molécula de la ureasa, lipopolisacárido, proteínas de choque térmico de *H. pylori* (Hsp60 y Hsp70) y la citotoxina vacuolizante conducen al desarrollo de una gastritis antral marcada, daño severo a la mucosa, sobreexpresión de citocinas proinflamatorias y función alterada de la barrera epitelial con cambio en la toma de macromoléculas.[34]

La gastritis en los humanos se puede clasificar por puntajes, lo cual facilita la interpretación de la inflamación y la infiltración en el tejido gástrico. La infección de modelos murinos con *H. pylori* simula varios aspectos de dicha enfermedad, como lo es el desarrollo de una inflamación crónica, caracterizada por células T que expresan citocinas Th1. El modelo murino, por lo tanto, proporciona una excelente oportunidad para analizar la génesis y la regulación de la gastritis crónica inducida por *Helicobacter* y permite el estudio de diversos factores putativos patológicos, como las células y sus efectores, tales como citocinas y anticuerpos, mediante mutantes transgénicos. Asimismo, llevar a cabo estudios sobre generación de nuevos fármacos y vacunas dirigidos a cepas de alta virulencia.[9]

Helicobacter pylori fue la primera bacteria relacionada a cáncer humano y categorizada como cancerígeno tipo I por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés). Los mecanismos exactos los cuales llevan a la inducción de cáncer no son claros, pero se sabe que la inflamación inducida por *H. pylori* es la responsable del deterioro del epitelio gástrico, que va desde la gastritis activa/crónica a gastritis atrófica y lo cual es aceptado como el escenario que lleva al desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico.[12] En ese mismo sentido, los factores de colonización y virulencia de la bacteria y la respuesta inmune del hospedero juegan un papel importante para la colonización del epitelio gástrico y el desarrollo de estas patologías.

Factores de colonización

Son múltiples los factores de colonización que contribuyen en la habilidad de *H. pylori* para instalarse en el estómago. *H. pylori* evita el lumen ácido del estómago pues nada hacia la superficie mucosa celular, usa sus flagelos polares y mecanismos quimio-tácticos.[7]

Ureasa. Primeramente, para colonizar el estómago, *H. pylori* debe sobrevivir al medio ácido. Esta bacteria dedica varios genes a la biosíntesis de ureasa, la cual hidroliza urea a NH_3 y CO_2 creando un microambiente alcalino en el citoplasma y periplasma.[1, 26, 35] Dado que el amoniaco es un componente clave en el metabolismo del nitrógeno, así como de resistencia al ácido, la ruta principal de producción de éste es a través de la elevada actividad de la enzima ureasa.[22] La cantidad de ureasa producida por la bacteria varía con las condiciones del cultivo y puede alcanzar hasta el 10% del total de las proteínas de la bacteria. La ureasa es una enzima que contiene níquel y consiste en 6 subunidades UreA y 6 subunidades UreB, las cuales tienen un peso molecular de 26.5 y 60.7 kDa respectivamente, y se encuentran organizadas en forma de anillo de 13 nm.[1, 22]

El papel esencial de la ureasa como factor de colonización y supervivencia se observa en el hecho de que cepas mutantes de *H. pylori* que tienen ureasa defectuosa no son capaces de colonizar el estómago.[1, 22]

Adhesinas. Aproximadamente el 20% de *H. pylori* en el estómago se encuentran adheridas a las superficies de células epiteliales y el resto se encuentra suspendida en la capa de moco que recubre el epitelio gástrico.[2] Estudios de microscopia electrónica de muestras de biopsias gástricas muestran que la adhesión de la bacteria incluye un tropismo específico por las uniones intercelulares, y en ocasiones se ha observado a la bacteria en espacios intercelulares profundos, asociado a cambios del citoesqueleto en los sitios de adhesión o en ocasiones internalizadas en células epiteliales.[7] En este sentido, existen 3 distintas hipótesis que tratan de explicar la razón por la cual la bacteria se adhiere al epitelio gástrico.

La primera de ellas es que la bacteria se adhiere al epitelio para liberar sus toxinas las cuales inducen inflamación y causan daño. Varios investigadores especulan que estos efectos causados por la adhesión son eventos adaptativos por *H. pylori* ya que esto libera nutrientes al lumen gástrico. Una segunda hipótesis explica que la adhesión de *H. pylori* es una forma de evitar la eliminación mecánica. Una tercera posibilidad es que la bacteria usa la superficie celular para replicarse activamente, no obstante, no existe evidencia experimental directa para probar esta teoría.[7] Hay estudios en los que se ha demostrado que *H. pylori* permanece viable dentro de células por varios días, aun en presencia de antibióticos extracelulares, y es capaz de repoblar el medio extracelular. La evidencia clínica muestra que las infecciones por *H. pylori* no pueden ser erradicadas con antibióticos que tienen poca penetración intracelular, lo que sugiere que pequeños números de bacterias que se internalizan en las células epiteliales pueden tener un papel importante en la persistencia del organismo.[7, 36]

A pesar de tener un genoma relativamente pequeño, *H. pylori* tiene más de 30 genes dedicados a la expresión de proteínas de membrana externa (OMP). Varias de estas han sido clasificadas como adhesinas, lo que sugiere que puede haber múltiples y quizá modos redundantes de unión a la superficie celular.[7] Mediante el análisis de genomas completos de la bacteria se ha confirmado la presencia de 5 familias de OMP principales, las cuales comprenden aproximadamente el 4% del genoma de *H. pylori*. Dentro de estas familias, las de la familia Hop (proteínas de membrana externa de *Helicobacter*) fueron las primeras OMPs caracterizadas.[37] Se han reportado varias OMPs de la familia Hop que actúan como moléculas de adhesión dentro de las que se incluyen BabA, SabA, AlpA, AlpB, y HopZ, y éstas pueden mediar la adherencia de la bacteria a las células del epitelio gástrico, aunque la mayoría de los organismos de *H. pylori* nadan libremente en el moco gástrico, una pequeña porción se adhiere fuertemente a las células gástricas, y su unión está mediada probablemente por varias proteínas y glicolípidos.[4]

BabA, es una proteína de la membrana externa, que se une a los antígenos Lewis-B de las células humanas. La adhesina BabA contiene dos copias del gen *babA* denominados como *babA1 y babA2.* Se piensa que esta adhesina juega un papel importante en la virulencia de la bacteria y que el alelo *babA2* está fuertemente asociado al desarrollo de úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico.[6, 22]

La unión a los antígenos Lewis X está mediada por la adhesina de unión a ácido siálico, SabA. En estudios realizados por Aspholm y colaboradores se observó que la adhesina SabA actúa como hemaglutinina y es capaz de anclarse a los eritrocitos.[6, 38]

AlpA y AlpB son adhesinas que se adhieren a la laminina del hospedero y se ha observado que en jerbos están involucradas en la inflamación del epitelio gástrico. Estas adhesinas se encuentran codificadas en el locus *alpAB*. Senkovich y colaboradores reportaron que la eliminación de AlpA y AlpB reduce la capacidad de adhesión de *Helicobacter pylori* a la laminina.[39]

Desde la perspectiva del hospedero, un reporte reciente mostró que *H. pylori* se puede adherir a las células vía factor de deterioro acelerado (DAF), una glicoproteína anclada a glicofosfatidilinositol (GPI) del hospedero que está normalmente involucrada en la protección de las células de la activación del complemento en sus superficies. Sin embargo, no se ha determinado cuál es la adhesina de *H. pylori* involucrada en la unión a DAF.[7]

A pesar del gran conjunto de adhesinas, ninguna de ellas es individualmente esencial para la unión a la mucosa gástrica, lo que indica la redundancia de los mecanismos de adhesión. Además, la expresión de adhesinas es diversa entre las diferentes cepas y variable dentro de una sola cepa durante el tiempo, y que estos mecanismos de adaptación están controlados a nivel genético por encendido/apagado de expresión génica, inactivación génica, o recombinación.[7]

Factores de virulencia

Se considera que los eventos que llevan a la inflamación crónica y enfermedad de la mucosa gástrica probablemente son secundarios al reconocimiento de la bacteria por el sistema inmune. No obstante, existen productos de *H. pylori* que han sido identificados en el contexto de enfermedad y que se han clasificado como toxinas por su actividad biológica, estos factores son el gen asociado a citotoxina A (CagA) y la citotoxina Vacuolizante (VacA).[7]

VacA. Aparte de que todas las adhesinas mencionadas anteriormente están involucradas en la colonización del epitelio gástrico. Otro factor de virulencia que juega un papel importante durante este proceso es la citotoxina vacuolizante A (VacA), la cual es una proteína de 90 kDa de *H. pylori* que induce la formación de grandes vacuolas citoplasmáticas en cultivos celulares. A pesar de que las cepas mutantes de *H. pylori* que carecen del gen *vacA* no son diferentes de las bacterias silvestres cuando se cultivan *in vitro.*[7] La importancia de este factor de virulencia en la colonización quedo manifiesto cuando cepas mutantes que carecían de dicho gen no lograban causar la infección en un modelo murino.[40] Por otro lado, la inoculación de gerbos con una cepa deficiente en *vacA* causó inflamación similar a aquellos infectados con la bacteria silvestre isogénica, no obstante, los individuos infectados con la cepa mutante mostraban menos ulceración gástrica.[7]

Todas las cepas de *H. pylori* contienen el gen *vacA*, pero hay una marcada diferencia entre las cepas en cuanto a la cantidad y la actividad de la toxina que producen.[2] Aproximadamente el 50% de todas las cepas secretan VacA, la cual es una proteína altamente inmunogénica. VacA es primeramente sintetizada como un polipéptido largo de 140 kDa que es cortado en ambos extremos durante su secreción. El amino terminal contiene una secuencia señal (o región "s" del gen) la cual muestra variabilidad alélica localizada cerca del extremo 5’ (alelos tipo s1a, s1b, s1c, o s2), la región media del gen es clasificada como “m”, la cual, igualmente cuenta con variabilidad alélica (alelos tipo m1 o m2), asimismo, cuenta con una región intermedia “i” (alelos tipo i1 o i2) localizada entre las regiones *s* y

m.[7] El carboxilo terminal del péptido pro-VacA está involucrado en el autotransporte de la toxina fuera de la membrana externa de la bacteria y también es removido de la toxina madura.[7] Se ha propuesto que la toxina VacA es secretada por un mecanismo específico denominado de autotransporte, en el cual la toxina es transportada al medio extracelular como monómero que tiende a oligomerizarce en rosetas.[1] Esta forma tiene poca actividad vacuolizante, pero se activa cuando se expone a medios con pH extremo, y permanece activa aún a un pH de 1.5. Además es inusualmente resistente a la digestión por pepsina.[1]

VacA tiene varios efectos tóxicos que pueden alterar el resultado de la infección y la colonización por *H. pylori*. Se cree que cuando VacA se inserta en las membranas y forma los poros con actividad de canal iónico, este proceso lleva subsecuentemente a hinchazón osmótica. Se ha observado que la actividad de esta toxina *in vitro* lleva a la formación de vacuolas en células HeLa.[41] Sin embargo, no se conoce cuál es su principal papel *in vivo*. Se ha observado también que VacA induce muerte de las células epiteliales del hospedero mediante apoptosis. Se ha propuesto que VacA induce la formación de poros en la membrana mitocondrial, lo que promueve la liberación de citocromo c y también puede activar moléculas de señalización pro-apoptótica.[2, 7]

Adicionalmente a la formación del canal iónico, las actividades de VacA incluyen la interrupción de actividad endosomal y lisosomal, tiene efectos en la señalización celular inducida por receptores de integrinas, y modula la respuesta inmune.[22] VacA induce alteraciones en las uniones estrechas en las células epiteliales del estómago de humanos y ratones.[1]

CagA. Otro factor de virulencia importante en la biología de *H. pylori*, es la proteína CagA (gen asociado a citotoxina A), llamada así ya que se pensaba que estaba asociada con la expresión de la citotoxina VacA. Sin embargo, posteriormente se observó que los dos factores VacA y CagA eran independientes.[42] CagA es el producto del gen *cagA*, el cual está presente en

cepas virulentas del tipo I de *H. pylori*. Su importancia recae en que se ha documentado una correlación entre la expresión de CagA y la virulencia de *H. pylori*, observándose que en los portadores de cepas que expresan CagA se encuentra con mayor frecuencia en pacientes con carcinoma gástrico y linfoma MALT; también en algunas poblaciones, los pacientes con anticuerpos contra esta proteína mostraban altas tasas de úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico por lo que CagA se utilizó inicialmente como un marcador de enfermedad.[7] A pesar de que el riesgo relativo asociado con la infección de cepas *cagA+* varía entre poblaciones, algunos autores han encontrado mayor riesgo de cáncer cuando la infección es causada por cepas CagA+, asimismo, estas cepas se han asociado con aumento en la inflamación[43], proliferación celular[44], y metaplasia[39] de la mucosa gástrica.[7]

Uno de los principales hallazgos fue el entendimiento de que el gen *cagA* forma parte de una larga isla de patogenicidad, una región de ADN adquirido de forma horizontal y que se insertó en el genoma, incrementando así la virulencia de las cepas.[7]

Las cepas de *H. pylori* aisladas de diferentes individuos son extremadamente diversas, y un determinante genético que aumenta el riesgo de cáncer es la isla de patogenicidad *cag*PAI, un locus de 40 kb presente en el 60% de los aislamientos en los Estados Unidos.[2] El papel que juega la isla de patogenicidad en el proceso de inflamación se muestra en el hecho que en los jerbos infectados con cepas *cag*PAI $^{(-)}$ sólo causa inflamación moderada del estómago, mientras que cepas *cag*PAI $^{(+)}$ causan inflamación severa, úlceras gástricas y tumores gástricos.[22, 45]

Cerca de una docena de genes de la isla de patogenicidad *cag*PAI codifican para proteínas que forman, el sistema de secreción tipo IV (TFSS). Este sistema contiene proteínas que funcionan como adhesinas que se unen a las integrinas de la células, para posteriormente transportar el peptidoglicano y CagA al interior de las células epiteliales, aunque también se ha reportado que este último se puede

localizar en la superficie de la membrana plasmática.[46] Una vez que la proteína CagA se encuentra en el citoplasma es fosforilada en un residuo específico de tirosina, que forma parte del motivo Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA), por proteínas de membrana de las células epiteliales del huésped. Higashi y colaboradores demostraron que al hacer depleciones específicas de motivos EPIYA se elimina la capacidad de CagA para asociarse a la membrana.[47] Los análisis estructurales han demostrado que la proteína CagA varía en tamaño entre cepas. La variación en el tamaño se correlaciona con la presencia de un número variable de secuencias de repetición situadas en la región C-terminal de CagA y también implica la diversidad de secuencia de aminoácidos dentro y fuera de la región de repetición. Estas variaciones en la secuencia potencialmente darían lugar a que la actividad biológica de CagA pueda variar de una cepa a otra, lo que resultaría en diferencias en la patogenicidad de las diferentes cepas de *H. pylori*.[48]

La proteína CagA en el medio intracelular es fosforilada en una tirosina por Src y cinasas Abl, y activa una fosfatasa eucariota (SHP-2) lo cual lleva a cambios morfológicos que asemejan la estimulación sin restricciones por factores de crecimiento, lo que provoca que estas células se alarguen y adquieran una estructura denominada "nido de colibrí".[47] Por otro lado, CagA no fosforilada también ejerce efectos dentro de la célula, tales como la activación aberrante de β-catenina provocando la regulación positiva transcripcional de genes blancos implicados en la carcinogénesis (Figura 2).[46]

Actualmente sabemos que CagA puede activar un número de vías de transducción de señales que asemejan la señalización por receptores de factores de crecimiento, y, simultáneamente, está involucrada en la perturbación de la función de uniones

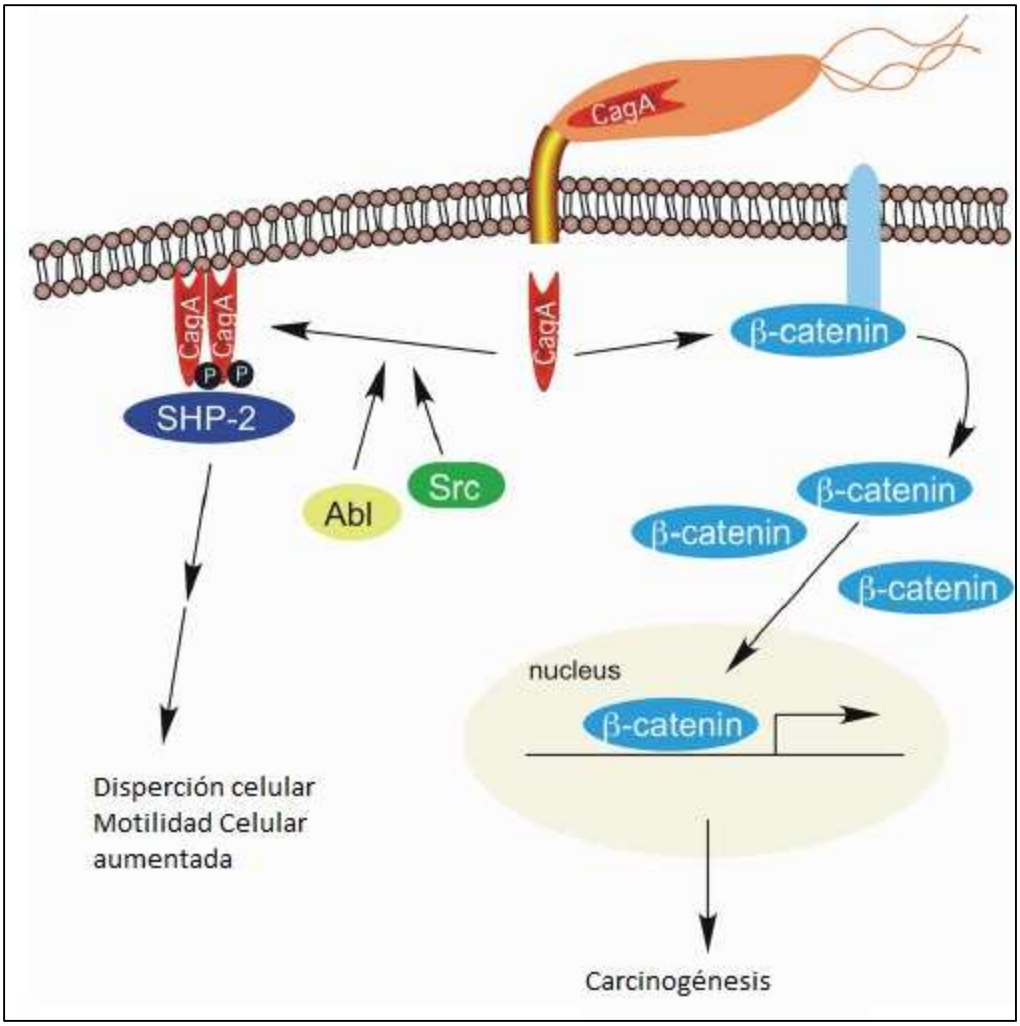


Figura 2. Alteraciones en la señalización molecular inducida por la entrega intracelular de CagA.[46]
Después de la unión bacteriana, el sistema de secreción tipo IV transloca CagA al citoplasma de las células epiteliales del hospedero. CagA intracelular sufre fosforilación de tirosina por las quinasas Src y Abl, y activa una fosfatasa eucariota (SHP-2) que conduce a los cambios morfológicos. CagA no fosforilada también ejerce efectos dentro de la célula, tales como la activación aberrante de β-catenina, que conduce a la regulación positiva transcripcional de genes específicos implicados en la carcinogénesis.

entre las células epiteliales, lo que resulta en aberraciones en las funciones de las uniones estrechas, polaridad celular, y diferenciación celular.[7] Sin embargo, se ha observado que aunque CagA es un factor de virulencia, no es suficiente para que se desarrollen enfermedades severas.[47]

Keates y colaboradores, en 1997, mostraron que la infección por *H. pylori* con cepas que contienen la isla *cag*PAI se asocia con incremento en la expresión de NF-κB y la producción de IL-8 en las células epiteliales gástricas *in vitro* e *in vivo.*[49] Aunado a los datos anteriores, se ha mostrado en jerbos, que las cepas carentes de CagA o de la función secretora del TFSS producen una inflamación mucho menor, lo que sugiere que la inflamación inducida por *H. pylori* puede ser causada por la respuesta inmune innata del epitelio a la presencia de CagA en el citosol y la activación de receptores de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD)-1 por el TFSS.[7]

Respuesta inmune contra *H. pylori*

La infección de la mucosa gástrica por *Helicobacter pylori* induce una respuesta inmune que involucra componentes de la respuesta inmune innata y adquirida. La respuesta inmune innata contra la infección depende del reconocimiento de estructuras invariantes en los microorganismos llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).[34] Las células dendríticas, macrófagos, células cebadas y células epiteliales pueden llevar a cabo el reconocimiento de estos patrones a través de receptores tipo Toll (TLR); dicho reconocimiento conduce a la producción de citocinas proinflamatorias como IL-8, la cual es una señal para el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos.[4] Además, el peptidoglicano de *H. pylori* que es introducido al citoplasma por el sistema de secreción tipo IV puede ser reconocido por los receptores intracelulares NOD, y esta interacción conduce a la activación del factor de transcripción NF-κB y a la síntesis de IL-8.[4] No obstante, la bacteria utiliza múltiples mecanismos de evasión y modulación de la respuesta inmune, como son la variación alélica de OMP, mimetismo molecular de sus glicanos que semejan a los del hospedero, modificación del lipopolisacárido (LPS) y

flagelos lo cual reduce el reconocimiento por el sistema inmune innato del hospedero.[7] Entonces, el huésped monta una respuesta inflamatoria aguda que conduce a una gastritis activa crónica.[50] En respuesta a las infecciones crónicas, como la de *H. pylori*, se estimula una respuesta adaptativa caracterizada por la expansión de células T y células B. Las células T CD4+ cooperadoras (Th) son claves para dirigir la respuesta inmune y ejecutar sus funciones, produciendo así varias citocinas y quimiocinas, como IL-2, IL-4, IL-8 IL-10, IL-18, IL-12, TNF-α, e INF-γ que modulan el tipo y potencia de la respuesta inmune activada.[31] Una función fundamental de las células Th es proporcionar "ayuda" a las células B y regular su proliferación y cambio de clase de inmunoglobulina. Además, su producción de citocinas regula las respuestas antimicrobianas/antivirales.[32] La mezcla de citocinas en el microambiente es el mayor determinante en la diferenciación de células Th, siendo las Th1 y Th2 las más estudiadas. Se ha propuesto que el tipo de respuesta Th, es dependiente del patrón diferente de citocinas pro- y anti-inflamatorias en respuesta a la infección por *H. pylori* juega un papel importante en el desarrollo de las patologías graves asociadas a la infección.[51]

En la última década se han caracterizado nuevos subtipos de células T CD4+ incluyendo células Th17, células T reguladoras (Tregs), células Th foliculares (Tfh), y las células Th-9.[32] Las células Treg median la tolerancia inmune que permite la persistencia de *H. pylori* y minimiza el daño inmunopatológico causado por respuestas excesivas de células T.[50]

En este sentido, clásicamente, las células Th1 son importantes en la eliminación de patógenos intracelulares, mientras que las células Th2 se asocian comúnmente con las respuestas a las infecciones parasitarias. La separación en células T cooperadoras Th1 o Th2 depende principalmente de las citocinas liberadas por las células presentadoras de antígenos (APC) que responden a los agentes patógenos a través de PAMPs.

El INF-γ es la citocina distintiva de las células Th1 y es importante para la diferenciación de estas células. Las principales fuentes de INF-γ son las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), células T citotóxicas y Th1. Las células T vírgenes y las células B también pueden producir INF-γ.[34] Se ha observado además que IFN-γ activa macrófagos y estimula las respuestas de células T CD8+ citotóxicas, mientras que la IL-17 induce la migración de neutrófilos para la eliminación de patógenos extracelulares, tales como *H. pylori.*[32] Las células Th2 se definen de acuerdo a la producción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y se asocia con una respuesta humoral.[34] La IL-4 fue inicialmente identificada y ha permanecido como la citocina más dominante, sino es que la única, que tiene la mayor influencia en la diferenciación de las células Th2 [34, 52] Las células T reguladoras naturales pueden producir Factor de crecimiento transformante (TGF)-β, el cual a su vez, también controla la inflamación mediante la inducción de expresión Foxp3 en las células T cooperadoras que estimulan la producción de Tregs inducibles. TGF-β inhibe la respuesta de células Th1 a través de efectos en factores de transcripción. Asimismo, TGF-β induce la producción de IL-10 por parte de células Th1.[53] El linaje Th17 puede ser importante para el control de la infección y el desarrollo de gastritis durante la infección por *H. pylori.*[32]

En la infección por *H. pylori* las respuestas inmune Th1, Th2 y células T reguladoras se encuentran activas, pero el balance de estas respuestas varía de persona a persona por factores desconocidos. No obstante, se ha observado en modelos animales y con datos suplementarios en humanos que una fuerte respuesta inmune Th1 incrementa la severidad de la gastritis y el riesgo de cáncer. Tanto el hospedero, como la bacteria regulan negativamente esta respuesta Th1. Esto beneficia potencialmente a la bacteria ya que le permite una colonización más densa, y beneficia al hospedero al disminuir la inflamación de la mucosa.[6, 31]

La patogenia de la infección por *H. pylori* se ha investigado con la utilización de algunos modelos animales que pretenden simular las enfermedades humanas. En

un estudio utilizando ratones infectados con una cepa adaptada a ratón, se encontró que la gastritis es más severa en ratones pronos a una respuesta Th-1 comparados con aquellos ratones en los que prevalece una respuesta Th-2.[12]

El uso de modelos animales, ha mostrado ser útil para obtener información valiosa que permite entender como la interacción hospedero, la bacteria y el ambiente, modula la patogénesis que promueve *H. pylori* y que puede llevar al desarrollo de enfermedades gástricas graves, como por ejemplo, los involucrados en la carcinogénesis gástrica. Esto es posible, ya que se pueden manipular la cepa infectante así como ciertos factores del hospedero.[46]

Patologías asociadas a la infección por *H. pylori*

A pesar de que la colonización del epitelio gástrico por *H. pylori* induce gastritis en todos los individuos infectados, solo una minoría manifiesta enfermedades severas. Dicha colonización conlleva a la infiltración de neutrófilos y células mononucleares a la mucosa gástrica, siendo la gastritis aguda crónica la primera manifestación relacionada con la colonización.[22] La patogénesis causada por esta bacteria depende de la virulencia de las cepas, la inflamación, una respuesta inmune adquirida y factores ambientales. La inflamación antral conduce al aumento de la producción de ácido en el cuerpo no inflamado y predispone a la ulceración duodenal; mientras que la gastritis en el cuerpo conduce a hipoclorhidria, lo que predispone a la ulceración gástrica y al adenocarcinoma.[6]

La inflamación crónica inducida por *H. pylori* con el tiempo puede conducir a la pérdida de la arquitectura de la mucosa gástrica normal y destrucción de las glándulas gástricas, proceso conocido como gastritis atrófica, esta a su vez evoluciona a metaplasia intestinal, que es el cambio fenotípico de la mucosa del epitelio por células de tipo intestinal, dichos procesos se producen en aproximadamente la mitad de la población colonizada por *H. pylori*.[22, 54, 55] Durante la gastritis atrófica y la metaplasia gástrica hay reclutamiento de células troncales, por lo que el daño al tejido es reversible si se erradica la infección, restableciendo

así la integridad de la mucosa. Por otra parte, cuando el individuo infectado se encuentra en la etapa de displasia, hay progresión al cáncer gástrico a pesar de que el paciente reciba tratamiento, probablemente debido a que la célula troncal ya porta alteraciones genéticas irreversibles.[25]

Se considera que la colonización con *H. pylori* no es una enfermedad como tal, sino una condición que afecta el riesgo relativo de desarrollar desordenes clínicos en el tracto gastrointestinal, ya que en infecciones experimentales usando una variedad de modelos animales se ha demostrado claramente que las interacciones sostenidas entre *H. pylori* y el hospedero aumentan significativamente el riesgo de padecer úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico distal.[46]

Modelo animal

Los primeros reportes de infección experimental de *H. pylori* fueron con el uso de cerdos nacidos por cesárea y puestos en unidades estériles aisladas. Estos podían ser retados con *H. pylori* y mantenidos por hasta 2 meses en condiciones libres de patógenos, tiempo durante el cual se monitoreaba la infección. Una de las desventajas de este modelo fue que se encontraba una distribución relativamente irregular de la bacteria en la mucosa gástrica lo que podía resultar en un falso-negativo en cultivos de biopsia obtenidos por endoscopia.[8, 13]

Se han reportado estudios en donde se logró infectar a perros de raza Beagle, los cuales fueron infectados por cepas de *H. pylori* que se sabía que infectaban a cerdos; este modelo fue utilizado principalmente para establecer una relación en la transmisión de la bacteria de perros infectados a no infectados, en donde se encontró que los perros no infectados adquieren la infección por contacto con perros inoculados con la bacteria, sin embargo, en la actualidad la forma de transmisión no se ha determinado de manera concreta.[8, 13, 56]

Dentro de los hospederos naturales para la infección por *H. pylori* se encuentran los gatos, en los que se observa que estos desarrollan una gastritis multifocal, con agregados linfoides y nódulos en la mucosa antral. Los gatos son la única especie

aparte de algunos primates no-humanos en los que se ha mostrado que adquieren la infección de manera natural.[13, 57] No obstante, no se consideran buenos modelos debido a que los resultados tanto de biopsias, PCR y cultivo fueron consistentes, de acuerdo a lo reportado por Fox en 1995.[58]

Los animales pequeños como los ratones y ratas son hospederos experimentales bien adaptados para muchas infecciones, sin embargo, estudios sugieren que *H. pylori* tiene un rango de hospederos muy pequeño y este no se extiende a otras especies. De acuerdo a los estudios realizados e intentos de infección en distintos modelos Radin y colaboradores, en 1990, afirmaron *H. pylori* no colonizara las especies de animales de laboratorio comunes.[56] Una buena opción para solucionar este problema fue el utilizar a *Helicobacter felis* por sus grandes ventajas, teniendo un mayor espectro de colonización en animales y podía servir de substituto para *H. pylori,* sin embargo, *H. felis* no expresa algunos factores de virulencia como son CagA y VacA.[59, 60]

No fue hasta que en 1991 que Karita y colaboradores, reportaron por primera vez la colonización gástrica en ratones por *H. pylori* ellos lograron que ratones BALB/c atímicos mantuvieran una colonización por más de 20 semanas y que ésta estaba asociada a gastritis, sin embargo, en ratones eutímicos se demostró una infección por solo 2 semanas.[13, 61]

Marchetti y col. en 1995[13] hicieron un avance significativo al demostrar que la colonización de por al menos 8 semanas era posible tanto en ratones CD1 libres de patógenos específicos (SPF), así como en ratones Convencionales (CV) CD1 y BALB/c. En el mismo año McColm y colaboradores establecieron un modelo utilizando los criterios reportados por Karita y colaboradores[13], tal como la calidad del inóculo y las condiciones de alojamiento de los ratones hospederos, debido a que la microbiota presente en estos, interfiere en el proceso de colonización de *Helicobacter pylori* y establecieron el uso de medios con suplementos selectivos con antibióticos de acuerdo a la microbiota presente.[13]

En 1997 Lee y colaboradores[14] introdujeron la cepa Sydney 1 (SS1), la cual es una cepa adaptada a ratón, proveniente de una paciente con metaplasia intestinal. La adaptación se logró debido a la capacidad intrínseca de la cepa utilizada para colonizar el estómago de los ratones, así como las potenciales mutaciones adaptativas que dio como resultado el aislamiento de la cepa SS1.[14, 62] Esta cepa contiene un genotipo *cagA+* y *vacA s2-m2* y un fenotipo no vacuolizante *cagA*.[15]

Van Doorn y colaboradores hicieron una evaluación de diferentes cepas de *H. pylori* para la producción de IL-8, en donde se observó que la cepa SPM326 con un genotipo *vacA s1b-m1*, induce vacuolización y tiene el gen *cagA+* tuvo la capacidad de producir inducir mayores cantidades de IL-8 que la cepa SS1, sin embargo, la colonización por parte de la cepa SPM326 fue mucho menor y tendió a disminuir con respecto al tiempo, y en algunos casos no hubo colonización.[15] También trabajó con la cepa de cultivo de colección de tipo americana (ATCC) 43504 en la cual no se determinaron los genotipos del gen de *vacA* pero su producto si generaba vacuolización, y contiene el gen *cagA*.[15] En la actualidad no existe un modelo murino para la infección de *H. pylori* con una cepa que cuente con los factores de virulencia implicados en el desarrollo de las enfermedades más severas como la úlcera péptica, el adenocarcinoma gástrico y linfoma tipo MALT.

Cepas de ratón

Las cepas de ratones de laboratorio son altamente divergentes en sus patrones de respuesta inmune como resultado de las mutaciones y polimorfismos. La susceptibilidad a las enfermedades está definida por el trasfondo genético de la cepa, así como los factores ambientales y epigenéticos.[63]

Se ha demostrado que los ratones C57BL/6 tienen un sesgo de tipo Th1 contra los patógenos, mientras que los ratones de otros orígenes como BALB/C tienden hacia una respuesta predominantemente Th2. Estas diferencias también se reflejan en las respuestas de macrófagos M-1 y M-2 a la estimulación de antígeno. Los macrófagos M-1 producen más óxido nítrico (a través de la óxido nítrico sintasa

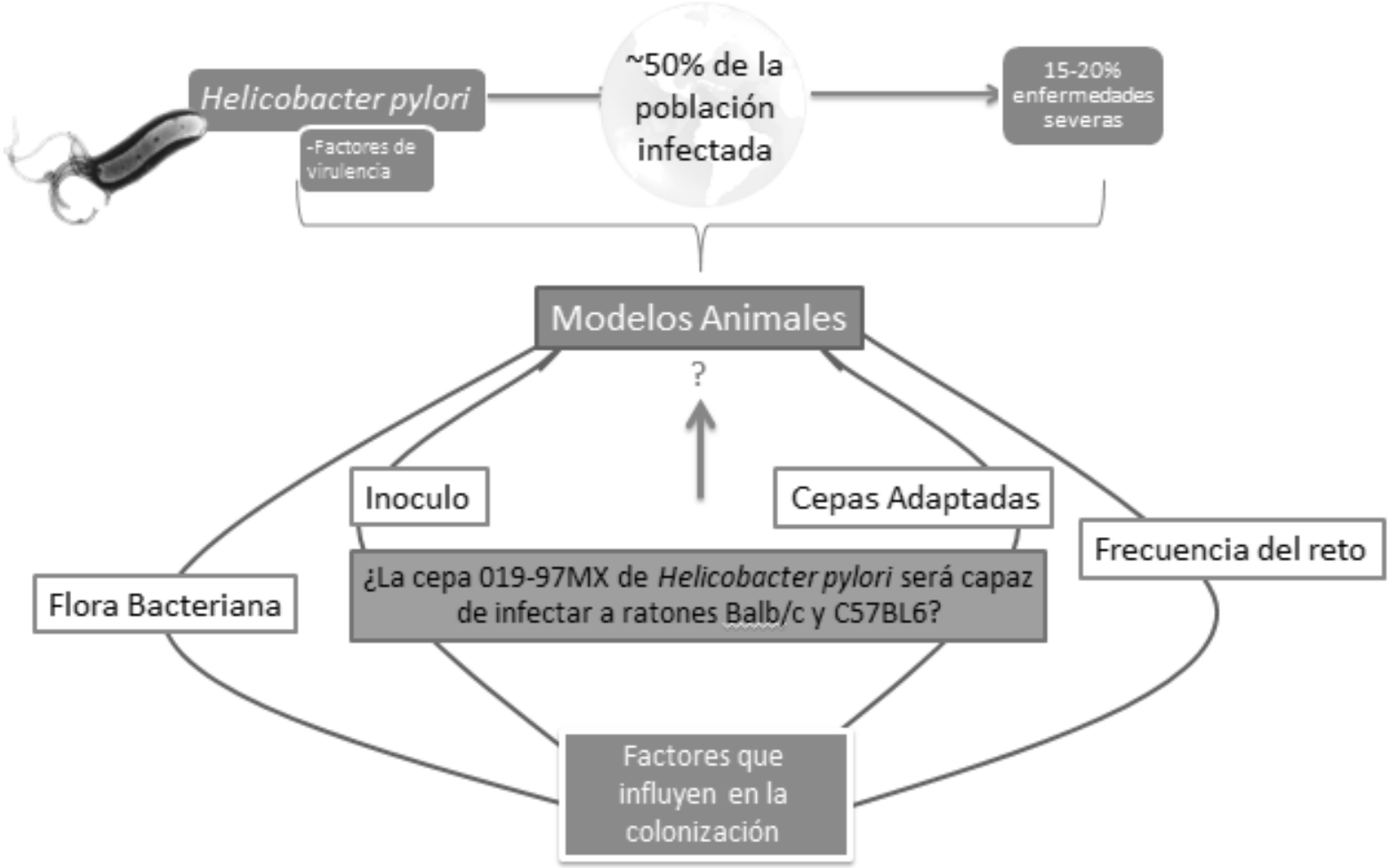
inducible) que los macrófagos M-2 cuando se exponen a IFN o LPS. Los macrófagos M-1 tienen generalmente una respuesta activa de tipo Th1, mientras que los M-2 tienden a ser responder a Th2.[63]

El tipo de respuesta Th1 o Th2 puede afectar la sensibilidad de los patógenos, en particular con organismos intracelulares y parásitos. Por ejemplo, los ratones C57BL/6 son relativamente resistentes a la infección con *Leishmania major* en comparación con ratones BALB/c que no son capaces de controlar dicha infección. Esto está relacionado con el predominio de células Th2 en ratones BALB/c, así como la deficiencia de IL-12 (que acciona una respuesta Th1) los vuelve altamente susceptibles a *L. major*. Por lo tanto, los ratones C57BL/6 y BALB/c se consideran como cepas de ratón Th1 y Th2-dominante respectivamente.[64]

H. pylori cepa 019-97MX

La cepa 019-97MX de *Helicobacter pylori* es un aislado clínico obtenido a partir de un paciente con adenocarcinoma difuso. Dentro de las características más importantes de esta cepa es que cuenta con un genotipo *vacA s1a/m1*, que como se mencionó anteriormente produce diversos efectos en las células del hospedero, entre ellos la vacuolización, por medio de diluciones seriales en células HeLa se determinó el nivel de vacuolización, el cual correspondió a un título mayor o igual a 1:640. Esta cepa cuenta a su vez con el gen *cagA,* y la isla cagPAI completa por lo que puede sintetizar esta proteína y el sistema de secreción tipo IV. Además de las características anteriores, una particularidad destacable de la cepa es que resulta fácil de cultivar en medios libre de proteínas exógenas.[65]

MAPA CONCEPTUAL



JUSTIFICACIÓN

La infección por *H. pylori* está presente en más del 50% de la población del mundo y puede dar como resultado varias manifestaciones clínicas de importancia, entre las que se encuentran, gastritis aguda y crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico. Los modelos animales son muy útiles para el entendimiento de los mecanismos de transmisión, los factores asociados a la colonización y patogénesis causada por la bacteria, para la investigación de la respuesta inmunológica por parte del hospedero, asimismo, los modelos animales ofrecen la posibilidad para examinar desarrollo de nuevas terapias y vacunas. Una limitación del modelo del ratón es que sólo unos pocos aislamientos clínicos de *H. pylori* han sido correctamente adaptados para permitir la colonización eficiente del estómago del ratón. Si bien se han utilizado varias cepas para tratar de establecer una infección por *H. pylori* en ratones, en la mayoría de los estudios han utilizado la cepa Sidney 1 (SS1) la cual está adaptada para ratón. Sin embargo, esta cepa se puede considerar de baja virulencia ya que carece de la capacidad de inducir la producción de IL-8, potente quimiotáctico implicado en las etapas iniciales del proceso inflamatorio, y no produce la citotoxina vacuolizante, factor de virulencia implicado en la ulceración del epitelio gástrico.

Por lo cual se propone utilizar como cepa 019-97MX, la cual fue aislada de un paciente con adenocarcinoma gástrico, cuenta con el genotipo *vacA s1m1*, la isla cagPAI y la citotoxina CagA, una de sus características particulares es su habilidad para crecer en medios libres de proteínas exógenas, siendo esta cepa sensible a todos los antibióticos utilizados en el tratamiento de esta bacteria. La utilización de dicha cepa en ratones C57BL/6 y BALB/c puede ser utilizado para investigar el desarrollo de la respuesta inmune por parte del hospedero, debido al sesgo en su tipo de respuesta dirigido a Th1 y Th2 respectivamente.

HIPOTESIS

La cepa 019-97MX de *H. pylori* será capaz de causar infección aguda en el epitelio gástrico de los ratones BALB/c y C57BL/6, lo cual se verá reflejado en los cambios histológicos, estatus inflamatorio y el perfil de citocinas.

OBJETIVOS GENERALES

Desarrollar un modelo de infección aguda con la cepa 019-97MX de *H. pylori* que permita estudiar los cambios en la estructura del epitelio gástrico y la producción de citocinas a nivel local.

Objetivos Específicos

Investigar las condiciones para el desarrollo de la infección con *H. pylori* en las cepas de ratón BALB/c y C57BL/6

Investigar los cambios histológicos en el epitelio gástrico inducidos por la presencia de *H. pylori,* analizar el estatus inflamatorio y la producción de citocinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microrganismo y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa de *H. pylori* 019-97MX, la cual se encontraba conservada en glicerol a -70 °C, para reactivarla se tomaron 150 µl que se cultivaron en medio Agar Soya Tripticasa (BD) suplementado con 5% de sangre de carnero y 0.2% de β-ciclodextrina (Sigma). Además se adicionaron antibióticos para hacer un medio selectivo para *H. pylori*, éstos fueron, 10mg/L de Vancomicina (Strides Arcolab) y 2mg/L de Anfotericina (Sigma); la muestra se incubó a 37 °C con 5% de CO_2 por 48 horas. Una vez obtenido el cultivo de bacterias se realizaron pases con la técnica de estriado en cajas agar sangre nuevas para amplificar la cepa.

Optimización de cultivo

Se cultivó la cepa 019-97MX en 30 ml de los medios líquidos Caldo Glucosa (BD) sin antibióticos con 0.2% de β-ciclodextrina, Caldo Glucosa con 10mg/L de Vancomicina y 2mg/L de Anfotericina y 0.2% de β-ciclodextrina, Caldo Mueller-Hinton (BD) sin antibióticos y 0.2% de β-ciclodextrina, Caldo Mueller-Hinton con 10mg/L de Vancomicina y 2mg/L de Anfotericina y 0.2% de β-ciclodextrina los cuales se incubaron a 37 °C con 5% de CO_2. Los cultivos líquidos se incubaron tanto de manera estática como en agitación a 150 rpm en la estufa con las mismas condiciones de temperatura y concentración de CO_2. Del crecimiento de todos estos cultivos se tomaron muestras para realizar cuentas viables, pruebas de actividad de ureasa, catalasa, oxidasa, y tinción de Gram, donde se comprobaron sus características específicas y morfológicas de *H. pylori.*

Cuentas viables

La cuenta en placa se llevó a cabo por la difusión de un pequeño volumen, 0.1 ml, de suspensión diluida sobre un medio Mueller-Hinton en una placa Petri de 90 mm con ayuda de un difusor de vidrio esterilizado. Se analizaron diluciones de 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6} por triplicado, para contabilizar de manera más exacta el número de

unidades formadoras de colonias (UFC). Luego las placas fueron incubadas por 5 días a 37°C con 5% de CO_2. Las colonias desarrolladas sobre el agar se contaron y registraron.[66]

Motilidad en agar suave

La prueba de motilidad se llevó a cabo en una placa de agar semisólido, el cual contenía medio con una cantidad reducida de agar (0.2%). El estado semisólido le permitió a la bacteria moverse libremente a través del medio. Se inocularon con una pipeta las muestras en agar semisólido con medio Mueller-Hinton o Brucella (BD), cuidadosamente se retiró la pipeta por la misma línea por donde se inoculó. Se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 y cada 24 horas se midió el halo de movimiento con un vernier digital y se registraron los datos diariamente por 5 días para comparar la motilidad de las diferentes muestras y determinar cuál de las cepas inoculadas tenía una mayor actividad de los flagelos.[67]

Medio de reaislamiento

Para el reaislamiento de *H. pylori* a partir tejido gástrico del ratón se probaron diferentes medios suplementados con diferentes antibióticos. Primero se probó un medio suplementado con 4 antibióticos con el uso de Soya Tripticasa con 5% de sangre de carnero como agar base. Este fue suplemento Skirrow (que consiste en 10mg/L de Vancomicina, 5mg/L de Anfotericina B, 5mg/L de Trimetroprim y 3.3 mg/L de Polimixina B). El segundo medio se suplementó con VAPAT (que consiste en 10mg/L de Vancomicina, 5mg/L de Anfotericina B, 3.3 mg/L de Polimixina B, 10.7mg/L de Ácido Nalidíxico y 5mg/L de Trimetroprim). El tercero fue el suplemento selectivo de Glaxo A, GSSA (10mg/L de Vancomicina, 5mg/L de Anfotericina, 10.7mg/L de Ácido Nalidixico, 3.3mg/L de Polimixina B y 200mg/L Bacitracina) y por último se usó suplemento selectivo de Glaxo modificado, GSSAM (10mg/L de Vancomicina, 5mg/L de Anfotericina, 10.7mg/L de Ácido Nalidixico, 3.3mg/L de Polimixina B y 30mg/L Bacitracina). Además de los suplementos que se añadieron a las cajas Petri, estas se introdujeron a jarras de CO_2, dentro de las

cuales se incubaron con sobres CampyPack (BD) los cuales crean una atmosfera selectiva para *H. pylori* pues proporcionan H_2 y CO_2, y simulan las condiciones microaerofílicas del estómago. Al cabo de 5 a 7 días de incubación se seleccionaron aquellas colonias que podrían corresponder a *H. pylori* y se les determinó la actividad de ureasa, oxidasa y catalasa, así como también se realizó tinción Gram para analizarlas al microscópico óptico.

Pruebas Bioquímicas

Catalasa. Para llevar a cabo esta prueba, con un asa estéril se tomaron colonias de los cultivos, ya sean de cultivo en placa de la bacteria o a partir de estómagos de ratones, las cuales fueron colocadas en una gota de H_2O_2, al generar burbujas la prueba es considerada como positiva.

Oxidasa. Para esta prueba se utilizaron microplacas de prueba de oxidasa DrySlide (DIFCO Laboratories) en donde se colocaron colonias de los cultivos de estómagos de ratón, la prueba se considera positiva al observarse un cambio de color a negro o azul marino.

Ureasa. Esta prueba se lleva a cabo utilizando una solución de Urea que se acidifica con HCl, dicha solución cuenta con indicador Rojo Fenol, el cual en medio ácido es amarillo, mientras que en medio alcalino es rosa o fucsia, por lo que, al administrar colonias del cultivo la prueba se considera positiva al utilizar la Urea presente en la solución para alcalinizar el medio.

Experimentación con Animales

Cepas de ratones

Se utilizaron ratones BALB/C machos de 6 a 9 semanas de vida y ratones C57BL/6 machos de 6 a 9 semanas de vida, ambas cepas provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública, en donde se mantuvieron mientras se llevaban a cabo los experimentos, bajo condiciones de limpieza. Los animales fueron alimentados con dieta comercial.

Inoculación de ratones con cultivos de *H. pylori* 019-97MX

Se administró el inóculo que creció bajo las condiciones de cultivo en las que se obtuvo un mayor número de UFC y mayor halo de motilidad.

Previo al inóculo, en todos los experimentos se mantuvieron a todos los ratones en ayuno por 12 horas para que el estómago de los ratones se encontrara vacío y de ese modo, las bacterias tuvieran mayor contacto con el epitelio gástrico.

Obtención de estómagos

Los animales se dejaron en ayuno por 12 horas previo al sacrificio. El sacrificio se llevó a cabo utilizando una cámara de CO_2. En un ambiente estéril, cuidadosamente se extrajo el estómago y se abrió por la curvatura mayor, de acuerdo al experimento en proceso esté fue divido en diferentes secciones para su posterior análisis.

Experimento 1. Para determinar si los ratones se veían afectados por la inoculación con *H. pylori*, se crearon grupos de 10 ratones BALB/c controles y 20 ratones BALB/c experimentales, a los cuales se les pesó diariamente por 14 días, iniciando el pesaje desde el primer día de inoculación, considerándose este como el día 0. Los ratones experimentales fueron inoculados con 2mg de bacteria de manera intra-gástrica 1 vez por dos días consecutivos con la cepa de *H. pylori* 019-97MX, mientras que el grupo control fue inoculado con medio infusión cerebro corazón (BHI) (BD) sin bacteria. Dichos grupos fueron sacrificados a los 7 y 15 días post-inóculo. Los estómagos extraídos se sembraron en cajas con suplemento Skirrow y posteriormente en cajas con suplemento VAPAT.

Experimento 2. Para determinar si *H. pylori* lograba ser aislada a partir de ratones sacrificados, se crearon grupos de 6 ratones BALB/c y 6 ratones C57BL/6, donde la mitad de cada grupo fue inoculado con 2mg de bacteria de manera intra-gástrica 3 veces (por un periodo de 5 días) con la cepa de *H. pylori* 019-97MX y la otra mitad, el grupo control, inoculado con medio BHI sin bacteria. Dichos grupos

fueron sacrificados 1 y 2 horas post-inóculo. Los estómagos extraídos se sembraron en cajas con suplemento Skirrow y posteriormente en cajas con suplemento VAPAT.

Experimento 3. Para promover la colonización se planteó el uso de ranitidina previo al inóculo en donde, se crearon grupos de 6 ratones BALB/c y 6 ratones C57BL/6. Previo a la inoculación, los ratones fueron administrados 100 µl de ranitidina para inhibir la producción de ácido del estómago de los ratones. Nuevamente la mitad de cada grupo fue inoculado con 2mg de bacteria de manera intra-gástrica 3 veces (por un periodo de 5 días) con la cepa de *H. pylori* 019-97MX y la otra mitad, el grupo control, inoculado con medio BHI sin bacteria. Dichos grupos fueron sacrificados 1 y 2 horas post-inóculo. Los estómagos extraídos se sembraron en cajas con suplemento GSSA seguido de una siembra en cajas con suplemento Skirrow.

Experimento 4. Para evitar el crecimiento de la flora normal del estómago del ratón y facilitar la colonización por la cepa 019-997MX se crearon grupos de 6 ratones BALB/c y 6 ratones C57BL/6. Previo a la inoculación, los ratones fueron administrados oralmente con un tratamiento de antibióticos (4 mg de Bacitracina, 0.5 mg de Polimixina B por ratón y Ceftriaxona al 0.1% en el agua que bebían). La mitad de cada grupo fue inoculado con 2mg de bacteria de manera intra-gástrica 3 veces (por un periodo de 5 días) con la cepa de *H. pylori* 019-97MX y la otra mitad, el grupo control, inoculado con medio BHI sin bacteria. Dichos grupos fueron sacrificados 1 y 2 horas post-inóculo. Los estómagos extraídos se sembraron en cajas con suplemento GSSA.

Experimento 5. Para determinar si la bacteria se podía detectar por PCR se formaron 4 grupos de 3 ratones BALB/c experimentales, siguiendo el mismo procedimiento de inoculación, asimismo, se formaron 4 grupos de 3 ratones control BALB/c. Cada grupo fue sacrificado en diferentes tiempo, el primer grupo el día 0 (día del ultimo inóculo), y los días 3, 5 y 7. Los estómagos extraídos se

sembraron en cajas con suplemento GSSAM, y posteriormente se hizo un raspado de la mucosa gástrica para de ella aislar ADN y buscar la presencia de la bacteria por PCR.

Experimento 6. Para investigar las diferencias en los perfiles histológicos de los ratones y la expresión de citocinas, dos grupos de 36 ratones BALB/c y C57BL/6 cada uno fueron inoculados 5 veces (en un periodo de 5 días) con la cepa 019-97MX de *H. pylori* aislada obtenida a partir del experimento 2, mientras que dos grupos control de 30 ratones BALB/c y C57BL/6 fueron administrados con medio BHI. Se generaron 2 grupos de sacrificio, el primero fue utilizando 18 ratones experimentales de cada cepa y 18 ratones control de cada cepa, dichos sacrificios se realizaron a diferentes tiempos (1, 2, 3, 7 y 15 días post-inóculo). Los estómagos extraídos de los ratones sacrificados fueron pesados y registrados, para después sembrarse en cajas con suplemento VAPAT. La cosecha de estos cultivos se almacenó a en medio BHI/glicerol y posteriormente fue sembrado en cajas con suplemento GSSAM en donde se realizaron diluciones seriales para obtener las UFC/g de tejido. El segundo grupo de sacrificio utilizó 18 ratones experimentales de cada cepa y 12 ratones control de cada cepa, este grupo fue sacrificado a los 7 y 15 días post-inóculo. Los estómagos de este grupo de ratones fueron utilizados para llevar a cabo cultivo, y extracción de ARNm para con ello generar la cadena complementaria de ADN (cADN) y con esta cuantificar la producción de citocinas Asimismo, con estos estómagos se realizó el análisis histopatológico, por lo tanto, una vez sacrificados los ratones sus estómagos fueron extraídos y se almacenaron en formaldehido al 10% para su posterior análisis por histología.

Aislamiento de ADN bacteriano

La extracción del ADN bacteriano se llevó a cabo con el protocolo establecido en Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Se agregaron 600µl de solución de lisis núcleos y se pipeteó suavemente hasta que las células se resuspendieron. Se incubó a 80 °C durante 5 minutos para lisar las células, a continuación, se dejó

atemperar al ambiente. Se añadieron 3µl de RNasa a la solución de células lisadas. Se invirtió el tubo 2-5 veces para mezclar. Se incubó a 37 °C durante 15-60 minutos y se dejó atemperar al ambiente. Se agregaron 200µl de solución de precipitación proteína al lisado de células tratadas con RNasa. Se vortexeó vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar la solución de precipitación de proteína con el lisado celular. Se incubó la muestra en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó de 13,000 rpm durante 3 minutos. Se transfirió el sobrenadante que contenía el ADN a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpio que contenía 600µl isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló suavemente por inversión hasta que las hebras tipo hilo de ADN formaran una masa visible. Se centrifugó de 13,000 rpm durante 2 minutos. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante y se escurrió el tubo en papel absorbente limpio. Se agregaron 600µl de etanol al 70% a temperatura ambiente y se invirtió suavemente el tubo varias veces para lavar el precipitado de ADN. Se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos. Se aspiró con cuidado el etanol y el tubo se dejó secar en papel absorbente limpio para posteriormente dejar que el precipitado se secara al aire durante 10-15 minutos. Se añadieron 100µl de solución de rehidratación de ADN y se dejó rehidratar el ADN, para esto se incubó a 65 °C durante 1 hora, posteriormente se agitó para solubilizar el ADN presente. Una vez terminada la extracción se almacenó el ADN a -20 ° C hasta su uso.

Extracción de ARN

La muestra de estómago se homogenizó, se agregó 1ml de trizol (Invitrogen) y se mezcló. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min. Se agregó 200µl de cloroformo, se vortexeó brevemente hasta que la mezcla se mostraba lechosa y se mantuvo nuevamente a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa de la capa superior a un nuevo tubo eppendorf, y se adicionaron 600 µl de isopropanol frío. El tubo se mantuvo en incubación a -20°C por 20 min. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a 4°C. El ARN se precipitó hasta formar un pellet. Se decantó, y desechó el

sobrenadante lentamente para mantener el pellet. Se adicionaron 500 µl de etanol al 70% y se resuspendió el pellet por golpes suaves. Se centrifugó nuevamente a 13000 rpm por 10 min a 4°C. Se decantó y descartó el sobrenadante. Se secó el pellet al aire, y finalmente se resuspendió en 30µl de agua libre de nucleasas.[68] El ARN se almacenó a -20° C hasta su uso posterior para la generación de la cadena complementaria de ADN (cDNA).

Síntesis de cDNA

A partir del ARN extraído de las biopsias se añadió 1µl de oligo de T, y de acuerdo a la cantidad de ARN presente en la muestra se aforó con agua a 10.5µl, la muestra se incubó a 70°C durante 10 minutos. Posteriormente, en la segunda etapa de la reacción se añaden 4µl de Buffer 5x, 4µl de dNTPs 2.5mM, 0.5µl de inhibidor de RNAsa y 1µl de transcriptasa reversa y se dejó incubar por 1 hora a 37 °C. La muestra se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Cuantificación de citocinas por RT-PCR

La evaluación de la expresión de las distintas citocinas como IFN-γ, IL-2, e IL-4 se realizó por RT-PCR tiempo real mediante el uso de SYBER GREEN MasterMix (Applied Biosystems) en el equipo ABI-PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) siendo los primers diseñados con el software Universal Probe Library (Roche). Las reacciones se realizaron usando 5 µl de MasterMix, 0.5 µl de sonda Taqman y primers, 1 µl de cADN y el resto con agua libre de DNAsas a un volumen final de 10 µl. Las condiciones de reacción el primer paso fue 5 min. a 94°C; el segundo paso fueron 40 ciclos de 94 °C durante 15 seg., posteriormente 15 seg. a 60 °C y un paso final de 72 °C durante 5 min. La expresión de la citocina se calculó sobre el Ct (ciclo de amplificación) del gen, y se normalizó con GAPDH como gen endógeno de control interno mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, en donde se usó ratones inoculados con medio BHI como calibrador. Los resultados del análisis se muestran como unidades relativas de expresión (URE). Los oligonucleótidos que se utilizaron para la cuantificación de citocinas se encuentran en la tabla 2.

		Longitud	Posición	Tm	%GC	Secuencia
IL-2	Forward	21	197-217	60	52	5′-GCT GTT GAT GGA CCT ACA GGA-3′
	Reverse	20	291-310	60	45	5′-TTC AAT TCT GTG GCC TGC TT-3′
TGF-β	Forward	20	1358-1377	59	50	5′-TGG AGC AAC ATG TGG AAC TC-3′
	Reverse	18	1413-1430	60	61	5′-GTC AGC AGC CGG TTA CCA-3′
IL-4	Forward	21	179-199	60	43	5′-GAG AGA TCA TCG GCA TTT TGA-3′
	Reverse	20	259-278	59	50	5′-TCT GTG GTG TTC TTC GTT GC-3′
IFN-γ	Forward	20	266-285	59	45	5′-ATC TGG AGG AAC TGG CAA AA-3′
	Reverse	26	329-354	59	38	5′-TTC AAG ACT TCA AAG AGT CTG AGG TA-3′

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en el análisis de la expresión de citocinas por RT-PCR[69]

Análisis Histopatológico

Las biopsias gástricas se fijaron en formaldehído al 10%, 30 segundos después de la obtención. Para llevar a cabo la fijación, las muestras se deshidrataron por 3 horas en etanol y 3 horas en xilol. Posteriormente fueron fijadas por 3 horas en parafina a 60 ° C. Una vez hecho esto, se incluyeron en un bloque de parafina, en donde se cortaron secciones del tejido, tanto del antro como del cuerpo del estómago de los ratones. Dichos cortes fueron teñidos por diferentes técnicas.

Tinción con Hematoxilina Eosina.

Las muestras se sumergieron en xilol para eliminar excesos de parafina. Luego se pasaron por alcoholes en concentración decreciente para rehidratar la muestra (100°, 95° y 70°) y se lavaron para eliminar exceso de alcohol. Se sumergieron en hematoxilina por 5 minutos, se lavaron y se pasaron rápidamente por alcohol ácido. Se lavaron nuevamente y se sumergieron por 30 segundos en eosina. Se pasaron nuevamente por otra serie de alcoholes, esta vez en orden creciente (70°, 95° y 100°) para deshidratar la muestra y realizar el montaje con un pegamento no soluble en agua. Finalmente se dejó remojar 10 minutos en xilol.

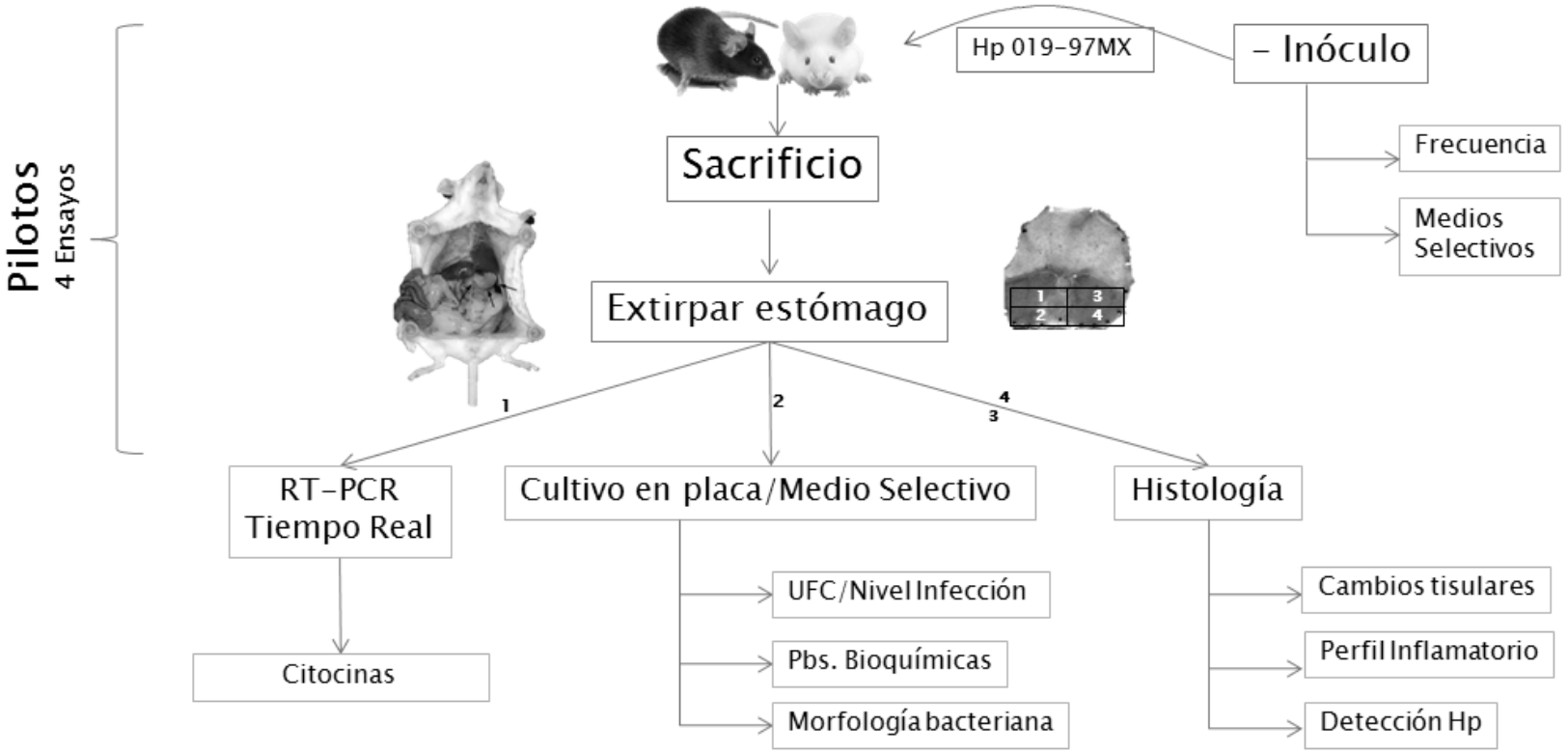
Tinción Warthin-Starry

Se colocaron las laminillas en una solución de 1% de nitrato de plata por 30 min a 43°C. En frascos separados se añadieron: 2% de nitrato de plata, 5% de gelatina, 0.15% de hidroquinona. Los frascos se atemperaron a 56°C. Se preparó la solución desarrolladora mezclando 1.5ml de nitrato de plata 2% en buffer de fosfatos, 3.75 ml gelatina en buffer de fosfatos 5%, 2 ml de hidroquinona 0.15%. Las laminillas se cubrieron con la solución desarrolladora. Se permitió que las secciones se desarrollaran hasta que se tornaron ligeramente doradas, cafés o amarillas. Se enjuagó rápidamente en agua destilada. Para finalizar se deshidrató en 95% alcohol y etanol absoluto, se secó y montó en medio sintético.[70]

Análisis estadístico

Las diferencias de los halos de crecimiento entre los 3 tipos de cultivo y las diferencias de los pesos de los ratones controles y experimentales fueron analizadas mediante un estudio de varianza (ANOVA) de tres vías. Asimismo para analizar las diferencias en los niveles de colonización de las cepas de ratones, así como la expresión de citocinas entre los diferentes grupos experimentales se utilizó ANOVA de dos vías. Dichos análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico STATA12. La gráfica de los distintos halos de crecimiento en los diferentes medios de cultivo se realizó en el programa GraphPad Prism 6, en donde las barras representan un grupo experimental y su respectiva error estándar. Mientras que las gráficas de la expresión de comparación de los pesos de ratones control y experimentales, y la gráfica de los distintos niveles de expresión de citocinas se llevaron a cabo en la hoja de cálculo Excel (Microsoft Office).

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



RESULTADOS

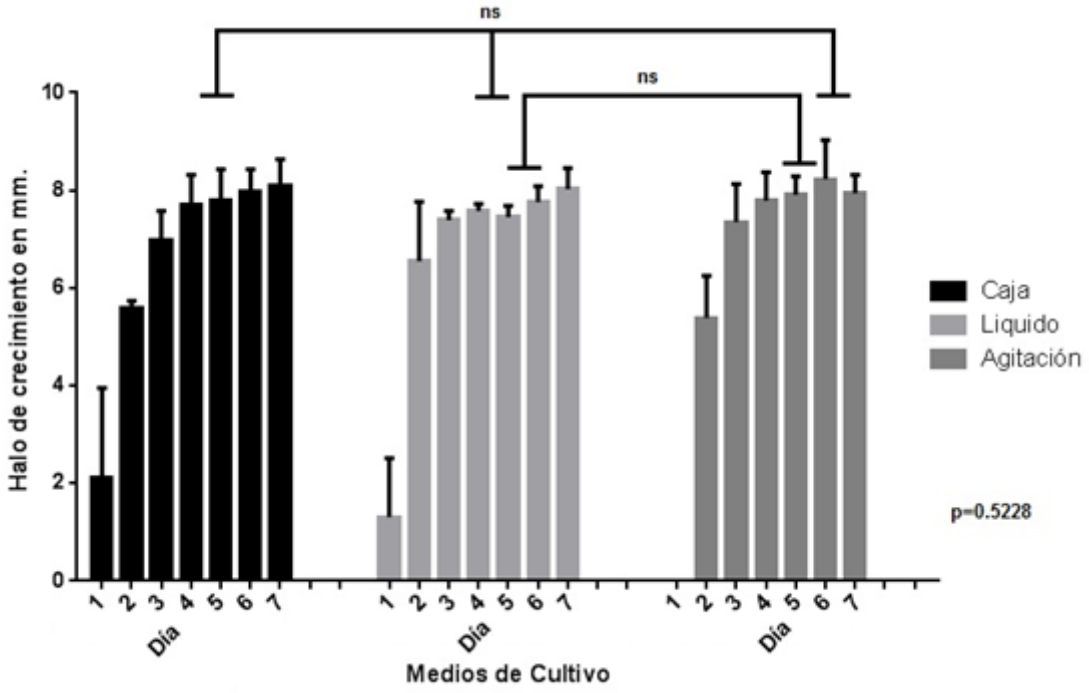
Optimización del cultivo

Cuentas viables. Se observó que cuando los medios líquidos alcanzan una densidad óptica (D.O.) de 2.15 las cuentas viables alcanzan aproximadamente de $1x10^8$ hasta $1x10^9$ UFC, cumpliendo así con uno de los requisitos establecidos por McColm en 1996[13], ya que según los reportes, las UFC mínimas suficiente para lograr la infección es de $1x10^6$. Ya que se sabía la relación entre densidad óptica y las UFC se pudo establecer que disolviendo 2mg de bacterias en 400 µl de solución se obtenía una D.O. de 2.15 que correspondía a $1x10^9$ UFC.

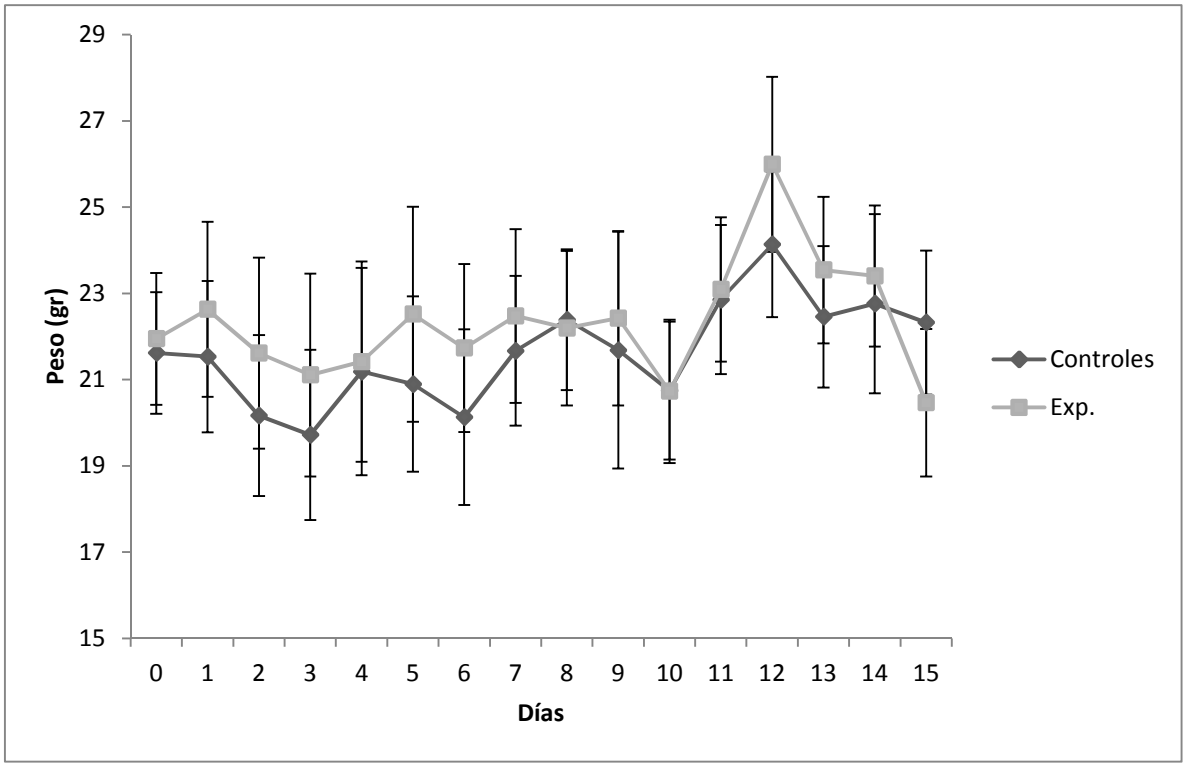
Prueba de motilidad. Posterior a la obtención de las UFC necesarias para alcanzar la infección, se buscaba investigar las diferencias en motilidad entre las bacterias crecidas en medio solido comparadas con las que crecieron en medios líquidos, para lo que se prepararon 3 diferentes medios para el cultivo de la bacteria. El primero fue cultivo en placa de agar soya, el segundo y tercer cultivo fueron medios líquidos. Como se puede observar en la gráfica 1, los resultados son similares para los 3 tipos de cultivo, y en ninguno de los días se encontraron diferencias significativas en los diámetros de halos de crecimiento al realizar un análisis de varianza en el programa STATA12, en donde se encontró una p=0.55, por lo tanto, se optó por cultivo proveniente de placa para preparar el inóculo.

Experimentación con animales

Experimento 1. Para determinar si los ratones se veían afectados por la inoculación con *H. pylori*, dos grupos (control y experimental) fueron pesados diariamente durante 15 días. Las diferencias de los pesos de los distintos grupos de ratones se muestran en la gráfica 2, en donde, de acuerdo a los análisis estadísticos el inóculo no afecta el peso de los ratones ya que al analizar estas variables se encontró un $p>0.5$. En el cultivo de los estómagos no fue posible lograr el aislamiento de la bacteria a ninguno de los tiempos de sacrificio.



Gráfica 1. Prueba de motilidad
Se muestra la variación de los halos de crecimiento de los distintos medios de cultivo en función del tiempo, en donde la comparación entre grupos mediante análisis de varianza (ANOVA) no arrojó diferencias significativas con una *p=0.5228*.



Gráfica 2. Comparación de promedios de peso entre ratones control y experimentales
Se muestra el promedio del peso de los ratones controles comparados con el peso promedio de los ratones experimentales con respecto al tiempo, en donde no se encontraron diferencias significativas (*p>0.05)*.

Experimento 2. Para determinar si *H. pylori* lograba ser aislada a partir de ratones sacrificados 1 y 2 horas después de haber sido inoculados con la cepa 019-97MX se llevaron a cabo cultivo de los estómagos extraídos, en donde se logró aislar dos cepas de *H. pylori,* las cuales fueron resembradas en placas nuevas para un aislamiento más puro. Las cepas obtenidas fueron una pasada por ratón BALB/c y la otra pasada por ratón C57BL/6 (Figura 3a, 3b), las cuales se expandieron en cajas Agar Soya Tripticasa con 5% de sangre de carnero, suplementadas con Vancomicina y Anfotericina para posteriormente ser congeladas a -20°C.

Experimento 3. Para promover la colonización de *H. pylori* 019-97MX se administraron 100 µl de ranitidina previo a la inoculación de los ratones, en los cultivos obtenidos a partir de los estómagos, los cuales se dejaron 7 días en incubación, el uso del medio GSSA redujo el crecimiento de la contaminación del bacilo con características microscópicas de Gram (+/-). Al igual que el experimento 1, se observaron colonias que presentaban pruebas bioquímicas positivas para catalasa y ureasa sin embargo, no se logró aislar *H. pylori* con los medios selectivos que se utilizaron. En la imagen D de la figura 3, se muestra el frotis de tinción Gram en donde se pueden observar los resultados de la bacteria tomada de la caja del cultivo de estómago.

Experimento 4. Con el objetivo de eliminar la flora bacteriana en el estómago de los ratones se administró un tratamiento previo a la inoculación para así promover la colonización por parte de las bacterias inoculadas, sin embargo, al igual que el experimento anterior, no fue posible lograr el aislamiento de *H. pylori,* no obstante, mediante el tratamiento con antibióticos previo a la inoculación se logró eliminar por completo la contaminación por el bacilo con morfología de colonia similar a *H. pylori* y que causa hemolisis en el medio de cultivo.

Experimento 5. Para determinar si la bacteria se podía detectar por PCR los distintos grupos fueron sacrificados a diferentes tiempos. Se logró aislar *H. pylori*

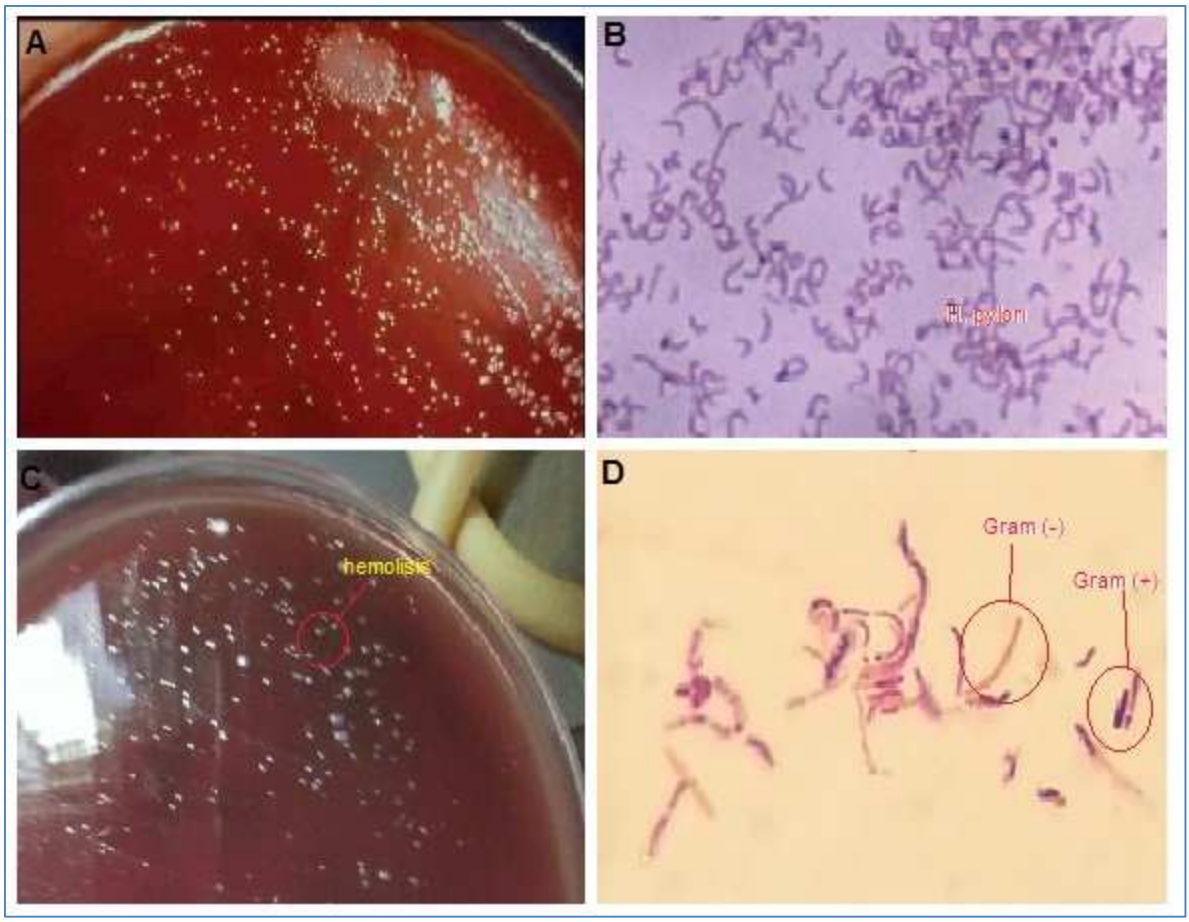


Figura 3. Cultivo de estómago de ratones y tinciones Gram
(A) Crecimiento de *H. pylori* en Agar Soya Tripticasa con suplemento Skirrow. (B)Fotografía de frotis tinción Gram de la cepa reaislada del estómago de ratón. (C) Caja con contaminación en la que se presenta hemolisis y colonias con morfología similar a *H. pylori*. (D) Fotografía de frotis teñido con Gram de las colonias con morfología similar a *H. pylori* causantes de hemolisis.

en medio GSSAM a partir de ratones sacrificados 2 horas después del último día de inoculación. Respecto al resto de los tiempos de sacrificio no fue posible aislar la bacteria. No obstante, se almacenó el tejido y posteriormente se llevó a cabo la extracción de ADN, en donde se realizaron PCR para detectar la bacteria, sin embargo, se obtuvieron resultados negativos para estas muestras.

Experimento 6. Se inocularon grupos experimentales que fueron sacrificados a diferentes tiempos, a partir de los estómagos de estos ratones se intentó el aislamiento de *H. pylori*. Fue posible observar colonias que presentaban pruebas bioquímicas positivas para Catalasa y Ureasa, mientras que para la oxidasa fueron negativas. Asimismo, se pudieron observar colonias con morfología similar a *H. pylori* pero al realizar la tinción Gram se observaron bacilos que presentaban una tinción tanto positiva como negativa y aunque se vieron bacilos similares a *H. pylori* no fue posible aislar la bacteria con el medio VAPAT. Por lo anterior, se decidió cosechar las bacterias y almacenarlas a -20°C en BHI/glicerol para su posterior resembrado. Consecutivamente, estas bacterias se sembraron en cajas que contenían 20mg de Bacitracina (suplemento GSSAM), probando diluciones seriales en placa para determinar las UFC de *H. pylori* por gramo de tejido gástrico. En los ratones BALB/c sacrificados 24 horas post-inóculo se obtuvieron $4.22x10^7$ UFC/g de tejido, a las 48 horas post-inóculo se observó una disminución a $7.50x10^6$ UFC/g, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa, a pesar de que las UFC disminuyeron casi 1 orden de magnitud, por otra parte, cuando se comparó el número de UFC obtenidas en el primer tiempo de sacrificio con aquellas obtenidas de los ratones sacrificados a las 72 y 96 horas post-inóculo se obtienen diferencias significativas para ambos tiempos ($p<0.05$) de $2.83x10^6$ y $8.33x10^5$ UFC/g de tejido respectivamente. Las UFC/g de tejido se mantienen a los tiempos de sacrificio de 1 y 2 semanas post-inóculo ($2.83x10^6$ y $2.67x10^6$ respectivamente). Cabe resaltar que cuando se compara el grupo de sacrificio 48 horas post-inóculo con el resto de los tiempos de sacrificio posteriores se observó que las UFC/g de tejido fueron muy similares partir de las 96 horas

post-inóculo y las diferencias observadas no resultan estadísticamente significativas (*p>0.05*).

Con respecto a los ratones C57BL/6 las UFC/g de tejido obtenidas a las 24 horas post-inóculo fueron $1.06x10^8$, y cuando estas se compararon con las UFC obtenidas en los cultivos provenientes de los ratones sacrificados 48 horas post-inóculo ($1.55x10^7$) se encontró una diferencia significativa (*p<0.001*). La misma diferencia estadística (*p<0.001*) se encontró cuando las UFC obtenidas a las 24 horas post-inóculo se compararon con las UFC obtenidas a partir de los cultivos de los estómagos de ratones sacrificados a las 72 y 96 horas post-inóculo, $8.83x10^6$ y $6.50x10^6$ UFC/g de tejido respectivamente. Cuando se compararon las UFC/g de tejido obtenidas a las 24 horas post-inóculo con aquellas UFC obtenidas a los tiempos de sacrificio de 1 y 2 semanas post-inóculo se obtuvieron diferencias significativas (*p<0.001*), igual a lo observado en los ratones BALB/c. Nuevamente, pudiéndose explicar esto por la disminución de las UFC/g de tejido de más de un orden de magnitud. Por otra parte, cuando se comparan las UFC obtenidas a partir del cultivo de los ratones sacrificados a las 48 horas post-inóculo con el resto de los tiempos de sacrificio posteriores las diferencias no resultan estadísticamente significativas (*p>0.05*). Al igual a lo observado en los ratones BALB/c, es que las UFC/g de tejido obtenidas a partir de ratones C57BL/6 se mantienen constantes a partir de las 96 horas post-inóculo.

Un dato que resulta particularmente interesante es que en los ratones BALB/c sacrificados 24 horas post-inóculo se obtuvieron $4.22x10^7$ UFC/g de tejido mientras que para los ratones C57BL/6 al mismo tiempo de sacrificio se obtuvieron $1.06x10^8$ UFC/g de tejido, siendo esta una diferencia estadísticamente significativa (*p<0.001*) a pesar de que ambos grupos fueron originalmente inoculados con la misma cantidad de bacteria. Contrario a lo anterior, cuando se compararon los distintos tiempos de sacrificio entre cepas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (*p>0.05*). Adicionalmente, es importante resaltar que las UFC/g de tejido obtenidas son mayores en los ratones C57BL/6 en todos

los tiempos de sacrificio. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos y como se puede observar en la tabla 3, el tiempo en el que la cepa 019-97MX de *H. pylori* parece establecer una infección en ambas cepas de ratón es a las 96 horas post-inóculo debido a la constancia de las UFC/g de tejido.

A las colonias resultantes de estos cultivos se les realizaron nuevamente pruebas bioquímicas características de *H. pylori* (Catalasa, Ureasa y Oxidasa), las cuales fueron positivas. Posteriormente se realizaron frotis que se tiñeron por Gram y de esa manera se corroboraron los resultados de re-aislado de colonias de *H. pylori* mediante el uso de placa con suplemento GSSAM. Los resultados de este experimento se observaron de manera similar a los obtenidos en la imagen A y B de la figura 3, en donde se muestra el frotis de tinción Gram con bacilos con características morfológicas de *H. pylori*.

Para estudiar las diferencias en los perfiles histológicos de los ratones, la técnica histológica se realizó en el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM por la histotecnóloga Raquel Guerrero Alquicira. La interpretación y micrografías fueron realizadas por la Dra. Wendy Escobedo Hinojosa. Imágenes mostradas con autorización de la Dra. Irma Romero (Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM) En la figura 4 se muestran los cortes teñidos mediante Hematoxilina-Eosina, en donde los núcleos se tiñen de azul, mientras que el citoplasma celular se tiñe color rosa; en las imágenes a y b de la figura 4 se puede observar el epitelio gástrico de los ratones control, en donde, la alteración tisular es nula, mostrando un perfil completo y sin alteraciones, asimismo, hay un infiltrado inflamatorio moderado, el cual se puede considerar como infiltrado basal. Por otra parte, no se presenta hipercromía causada por la producción de ácido en el tejido. Mientras que en los ratones inoculados sacrificados a las 24 horas (Figura 4c, 4d) se puede observar que la alteración tisular es moderada, mientras que se puede considerar que se presenta un nivel medio de infiltrado inflamatorio.

Tiempo post-inóculo	BALB/c		C57BL/6	
	UFC/g	SEM	UFC/g	SEM
24 horas	$4.22x10^7$	$1.67x10^6$	$1.06x10^8$	$1.63x10^7$
48 horas	$7.50x10^6$	$3.85x10^5$	$1.55x10^7$	$1.15x10^6$
72 horas	$2.83x10^6$	$3.21x10^5$	$8.83x10^6$	$6.42x10^5$
96 horas	$8.33x10^5$	$1.28x10^5$	$6.50x10^6$	$3.85x10^5$
1 semana	$2.83x10^6$	$8.98x10^5$	$4.17x10^6$	$2.57x10^5$
2 semanas	$2.67x10^6$	$4.49x10^5$	$5.33x10^6$	$7.06x10^5$

Tabla 3. UFC/g de tejido en las distintas cepas de ratón a diferentes tiempos

En la tabla se muestran los distintos niveles de UFC/g de tejido obtenidas a partir de cultivo de estómagos de las cepas de ratón BALB/c yC57BL/6 inoculados con la cepa 019-97MX de *H. pylori.* Los sacrificios fueron llevados a cabo en los tiempos mostrados (3 ratones por tiempo, por cepa), asimismo, se presenta el error estándar de la media (SEM) de dichas UFC. Los datos mostrados son parte de los resultados de la colaboración con las Dras. Irma Romero y Wendy Escobedo Hinojosa.

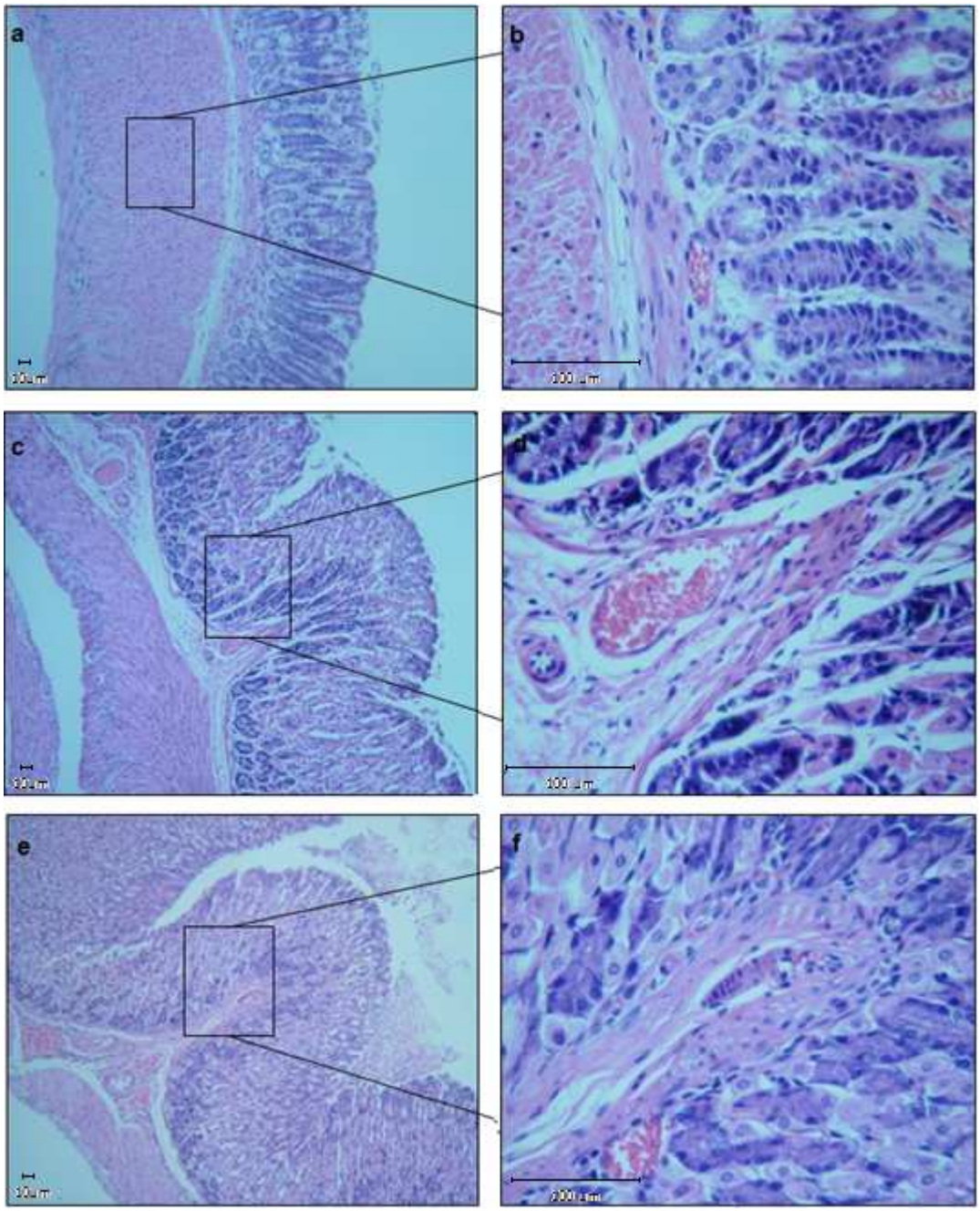


Figura 4. Perfil del epitelio gástrico de ratones control y de ratones inoculados sacrificados a las 24 y 48 horas

Se muestran observaciones microscópicas de cortes sagitales de 5 µm de espesor de la porción glandular del estómago.(a) Tejido normal de ratón control amplificado a 100X. (b) Amplificación a 400X de tejido normal de ratón control. (c) Tejido de ratón sacrificado 24 horas post-inóculo amplificado a 100X. (d) Amplificación a 400X del tejido de ratón sacrificado 24 horas post-inóculo. (e) Tejido de ratón sacrificado 48 horas post-inóculo amplificado a 100X. (f) Amplificación a 400X del tejido de ratón sacrificado 48 horas post-inóculo.

Los cambios en el epitelio a este tiempo de sacrificio también conducen a un nivel de hipercromía moderado/medio, por la producción de ácido por parte de las células parietales en el tejido gástrico.

En cuanto a los sacrificios llevados a cabo 48 horas post-inóculo (Figura 4e, 4f), los perfiles del epitelio muestran una alteración tisular moderada, en donde se logra observar que el nivel de hipercromía ha disminuido en comparación con las 24 horas post-inoculo debido a la disminución en la secreción de ácido por parte del estómago, sin embargo, el infiltrado inflamatorio permanece a niveles medios, siendo estos superiores a los niveles basales.

En la figura 5 se observan los cambios ocurridos en los epitelios de los ratones sacrificados a las 72 horas post-inóculo (a y b) así como a los 7 días post-inóculo (c y d). A las 72 horas post-inóculo se pueden observar moderadas alteraciones tisulares, mientras que se mantiene el infiltrado inflamatorio a niveles similares que los tiempos de sacrificio anteriores, al igual que a las 48 horas post-inóculo, no se detecta hipercromía en el tejido. A los 7 días post-inóculo los resultados son similares, considerándose un infiltrado inflamatorio medio y con moderadas alteraciones tisulares, mientras que la hipercromía a este tiempo es moderada. Respecto a la tinción Warthin-Starry la cual es específica para detectar *H. pylori*, en la figura 6 se puede observar en las imágenes a, b y c, el tejido normal de los ratones C57BL/6 a diferentes amplificaciones, se logra observar el tejido integro, en una tonalidad amarilla-dorada. Por otro lado, en las imágenes 6d, 6e, 6f se observa el tejido de un ratón 1 semana post-inóculo, donde se logran ver bacilos de color café oscuro o negro, con un fondo amarillo-dorado oscuro, los cuales se encuentran encerradas en un círculo rojo teniendo semejanza con lo reportado.

Para investigar los cambios en los perfiles de expresión de citocinas por parte de las dos cepas de ratones, se seleccionaron 3 estómagos al azar en los cuales en los cultivos se lograron aislar colonias de *H. pylori* en cajas con suplemento GSSAM.

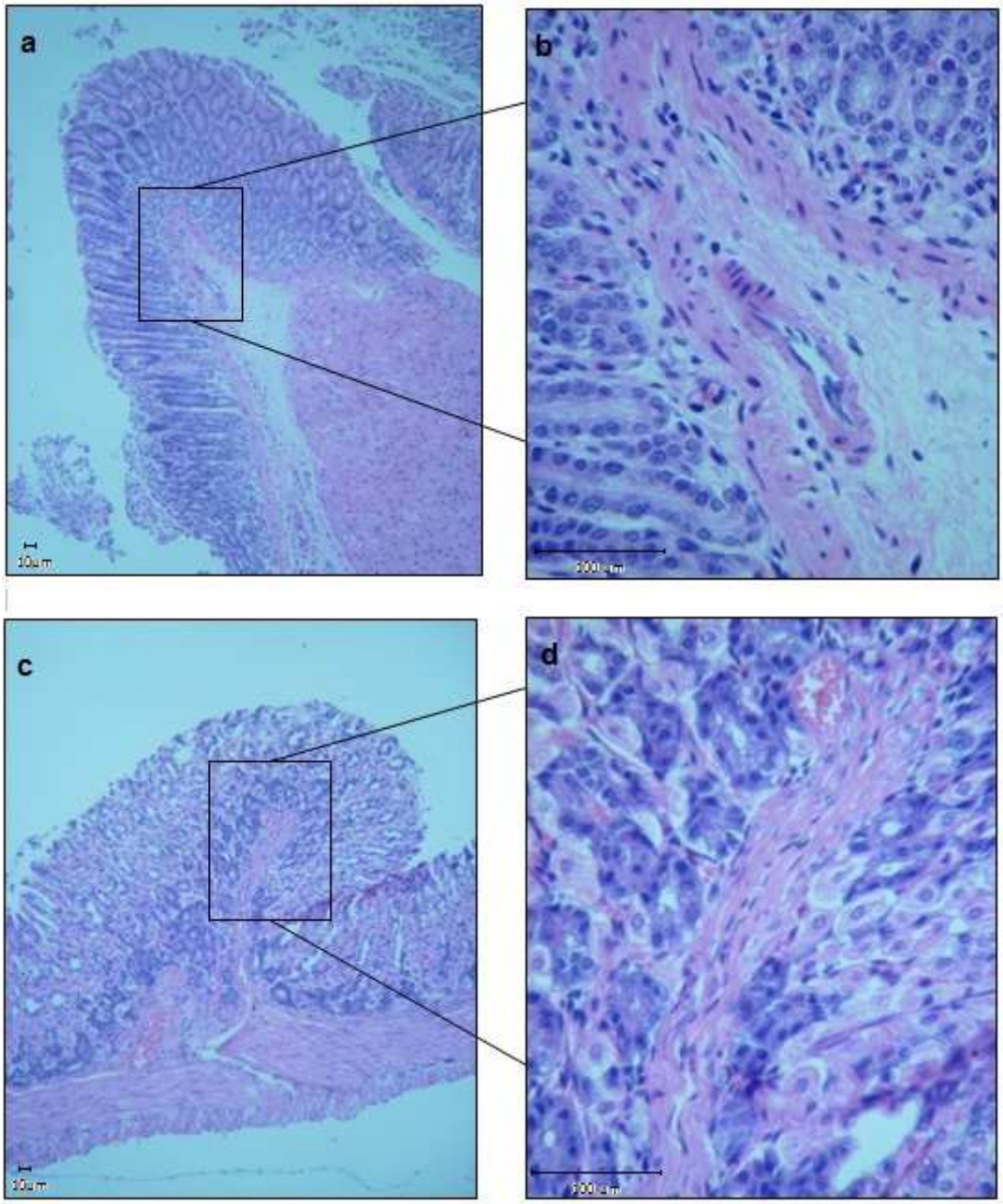


Figura 5. Perfil del epitelio gástrico de ratones inoculados sacrificados a las 72 horas y 7 días. Se muestran observaciones microscópicas de cortes sagitales de 5 µm de espesor de la porción glandular del estómago. (a) Tejido de ratón sacrificado 72 horas post-inóculo amplificado a 100X. (b) Amplificación a 400X del tejido de ratón sacrificado 72 horas post-inóculo. (c) Tejido de ratón sacrificado 7 días post-inóculo amplificado a 100X. (d) Amplificación a 400X del tejido de ratón sacrificado 7 días post-inóculo.

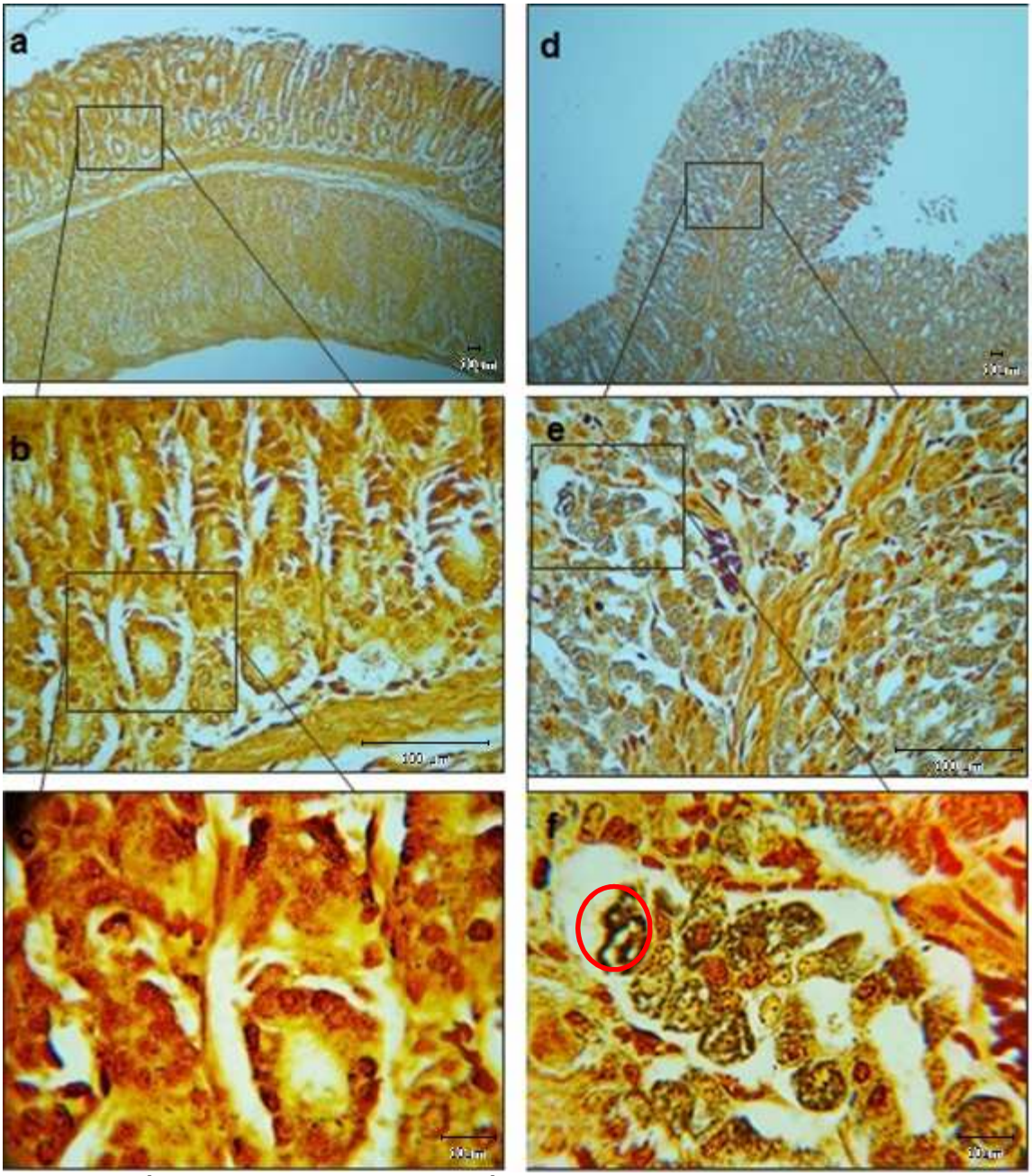


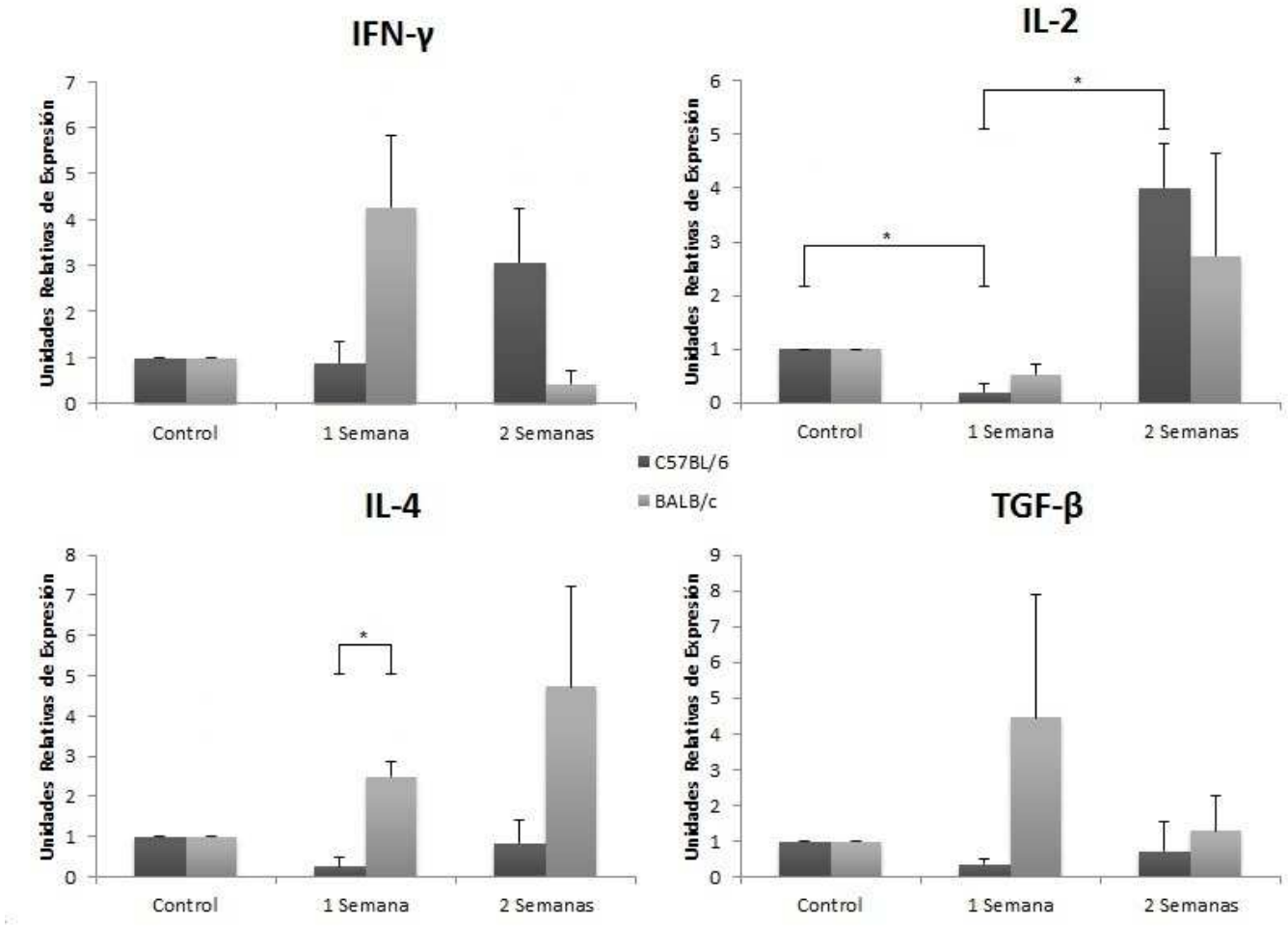
Figura 6. Tinción Warthin-Starry del epitelio gástrico de ratones control y ratones sacrificados a los 7 días post-inóculo.
Se muestran observaciones microscópicas de cortes sagitales de 5 µm de espesor de la porción glandular del estómago. (a) Tejido normal de ratón control amplificado a 100X. (b) Amplificación a 400X de tejido normal de ratón control. (c) Amplificación a 1000X de tejido normal de ratón control. (d) Tejido de ratón inoculado sacrificado 7 días post-inóculo amplificado a 100X. (e) Amplificación a 400X del tejido de ratón inoculado sacrificado 7 días post-inóculo. (f) Amplificación a 1000X del tejido de ratón inoculado sacrificado 7 días post-inóculo.

Los ratones seleccionados para el análisis fueron sacrificados a distintos tiempos (7 y 15 días). Para comparar los perfiles de expresión de citocinas, se normalizó con un gen endógeno (G3PDH) en ratones inoculados con medio BHI. La cuantificación de la expresión de citocinas realizada por PCR tiempo real muestra que en los ratones BALB/c la expresión de IFN-γ en la primera semana post-inóculo fue mayor que en los controles, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Mientras que a las dos semanas post-inóculo se observó que la expresión fue menor que la observada en la primera semana aunque esto no resultó estadísticamente significativo (*p=0.061*). Por otro lado en los ratones C57BL/6 ocurre lo contrario, ya que el nivel de expresión a la primera semana fue menor que la segunda semana post-inóculo, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre estas (*p=0.8517*). Interesantemente no se observó una diferencia significativa cuando se compararon los niveles de expresión de IFN-γ a las 2 semanas post-inóculo entre las dos cepas de ratón, a pesar de que una de estas disminuyó (BALB/c) en comparación al control, mientras que la otra aumentó con respecto al control. Con respecto a los niveles de expresión observados para IL-4, en los ratones BALB/c, dicha expresión no presentó aumento significativo en la primera semana cuando se comparó con el grupo control (*p=0.596*), mientras que, a pesar de que en la segunda semana se observó un aumento adicional en el nivel de expresión este tampoco fue estadísticamente significativo en relación a lo observado al control y a la primera semana post-inóculo. En tanto que en ratones C57BL/6 inoculados sacrificados en la primera semana, la expresión de IL-4 disminuyó a la mitad comparado con el grupo control, y esto no resultó estadísticamente significativo (*p=0.0697*). Resultó interesante que se encontró una diferencia significativa en los niveles de expresión de IL-4 entre los ratones C57BL/6 y BALB/c sacrificados 1 semana post-inóculo (*p=0.0072*).

Por otra parte, la expresión de IL-2 en los ratones BALB/c inoculados y sacrificados a la primera semana fue la mitad de la expresión observada en los ratones control, mientras que para los ratones sacrificados a la segunda semana la expresión

aumentó casi 2 veces a la observada en los ratones control, sin embargo, en ningún punto los niveles de expresión de los ratones BALB/c tuvieron un cambio significativo cuando se comparó entre los distintos tiempos de sacrificio. En C57BL/6, en los ratones sacrificados 1 semana post-inóculo se observó una disminución de casi del 90%, con respecto al grupo control, lo que resulta estadísticamente significativo (*p=0.0343*). Por el contrario, en la segunda semana el nivel de expresión aumentó 3 veces más en relación al grupo control, sin embargo, esto no resultó estadísticamente significativo (*p=0.0687*). Cuando se compararon los ratones C57BL/6 sacrificados 1 y 2 semanas post-inóculo se encontró una diferencia estadísticamente significativa (*p=0.0111*). Como se puede observar en la gráfica 3 la comparación de los niveles de expresión de IL-2 entre las distintas cepas no mostró diferencias significativas.

Por otro lado, la expresión de TGF-β en ratones BALB/c incrementó 3 veces su nivel de expresión a 1 semana post-inóculo comparado con el grupo control. A las 2 semanas hubo una disminución de la expresión comparada con el primer tiempo de sacrificio, sin embargo, el cambio no fue estadísticamente significativo. Los cambios observados en los niveles de expresión para el caso de los ratones C57BL/6 resultaron 0.3 y 0.7 URE para los ratones sacrificados a la primera y segunda semana post-inóculo respectivamente. A pesar de haberse encontrado diferencias en los niveles de expresión, estas no resultaron estadísticamente significativas en ninguno de los grupos comparados en cuanto al nivel de expresión de TGF-β.



Gráfica 3.Niveles de expresión de las diferentes citocinas analizadas

En la gráfica se muestran las medias de expresión de diferentes citocinas de los diferentes grupos experimentales comparados con los ratones control. Los cambios en los niveles de IFN-γ no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos. La expresión de IL-2 mostró cambios significativos en los ratones C57BL/6 cuando se compararon con el grupo control, así como con el segundo grupo de sacrifico para la misma cepa. La expresión de IL-4 tuvo un cambio significativo en las distintas cepas de ratón sacrificadas 1 semana post-inóculo. La expresión de TGF-β no tuvo cambios significativos en las distintas cepas a ningún tiempo de sacrificio. Las barras señalan los grupos entre los que se encontraron diferencias significativas. * $p<0.05$

DISCUSIÓN

Debido a la alta prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* y su relevancia para la salud pública es importante el estudio de las interacciones hospedero-patógeno para entender mejor los mecanismos por los cuales se desarrollan patologías severas como úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma MALT.[1, 31, 35] En la actualidad se ha descrito un modelo de infección con una cepa de *H. pylori,* la cual es considerada de baja virulencia.[71] Por lo que la generación de un modelo murino infección por una cepa considerada de alta virulencia aislada de un paciente con adenocarcinoma difuso, llamada 019-97MX, la cual cuenta con genotipo *s1m1 y cagA+*[65], podría proveer información acerca de los mecanismos de patogénesis y respuesta inmune por parte del hospedero.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, la administración de $1x10^8$ UFC de *H. pylori* a los ratones generaba la infección. Por lo anterior, realizamos cultivos de *H. pylori* en medios líquidos, a partir de los cuales se tomaron alícuotas a diferentes tiempos a las que se les midió su densidad óptica y se les realizaron cuentas viables para determinar las UFC. Se encontró que una densidad óptica de 2.15 producía $1x10^8$ hasta $1x10^9$ UFC, cumpliendo así uno de los requisitos establecidos en la literatura. En una revisión realizada por McColm en 1996, menciona que las UFC mínimas para obtener una infección son de $1x10^6$.[13] Es recomendable obtener el inoculo a partir de medios líquidos estáticos, pues bajo estas condiciones las bacterias tienen una mayor motilidad lo cual facilita la colonización.[13] Sin embargo, dado que los medios líquidos se contaminan con facilidad, decidimos investigar si las bacterias cultivadas en medios sólidos conservaban la motilidad. Nuestros resultados mostraron que las bacterias derivadas de cultivos en caja conservan su actividad de flagelo, ya que no se encontraron diferencias significativas en los halos de crecimiento de las bacterias derivadas de cultivos sólidos comparadas con aquellas obtenidas de medios líquidos.[72] Por lo que se decidió generar el inóculo a partir de medio sólido para tratar de lograr la infección de los ratones.

Para el re-aislamiento de *H. pylori* de los ratones inoculados con la cepa 019-97MX se probaron diferentes combinaciones de antibióticos reportados por distintos grupos de investigación como Lee y col.[14], Karita y col.[61], entre otros.[13, 71] Sin embargo, a pesar de haber utilizado diferentes medios selectivos, solo en 2 de nuestros experimentos fue posible lograr el aislamiento de *H. pylori* a partir de estómagos de ratones sacrificados 1 y 2 horas después del último inóculo, por lo que es probable que estas bacterias podrían provenir de este último inóculo administrado.

Una de las limitantes que se encuentra a la hora de generar una infección en el epitelio gástrico es la presencia de microorganismos de la flora normal de los ratones[13], por lo cual, consideramos que si a los ratones se les administraba un tratamiento previo con antibióticos (experimento 4) previo a la inoculación se podrían eliminar los microorganismos de la flora normal. Efectivamente, sí se logró eliminar la flora bacteriana, no obstante, no fue posible aislar a *H. pylori*. Es importante considerar que en diversos estudios se ha reportado que es posible lograr una taza de infección del 100% a pesar de que a los ratones no se les administre un tratamiento con antibióticos previo a la inoculación.[13, 14]

Para promover la colonización por parte de *H. pylori*, se utilizó ranitidina para inhibir la producción de ácido del estómago de los ratones, sin embargo, a pesar de haber aislado colonias que presentaban 2 pruebas bioquímicas positivas (catalasa, ureasa), no se logró aislar *H. pylori* con los medios selectivos utilizados. En este sentido, es importante mencionar que en la revisión realizada por McColm[13] en 1996 menciona que el uso de antagonistas de la producción ácido en el estómago no mejora la colonización de la bacteria.

En general, en los cultivos provenientes de estómagos de ratones inoculados y sacrificados en tiempos superiores a un día, no se logró aislar *H. pylori* debido a la cantidad de bacterias provenientes del estómago de los ratones, mas no estudiamos si esto se debía a que los antibióticos de los medios utilizados para el

re-aislamiento inhiben el crecimiento de la *H. pylori*. Por otro lado, en los cultivos realizados con estómagos de ratones sacrificados 1 y 2 horas post-inóculo (experimento 2 y 5), si se logró aislar la bacteria, cuando se eliminó la contaminación por el uso de suplemento GSSAM. Cabe mencionar que no se encontraron artículos en los que se haya trabajado a tiempos tan cortos como 7 y 15 días post-inóculo, por lo que la dificultad de lograr el aislamiento de la bacteria a tiempos tan cortos puede ser ocasionado por algún evento de adaptación de la bacteria al epitelio gástrico de los ratones inoculados, como lo mencionan Akopyants y col.[62] De acuerdo a Lee y colaboradores[14], la patología se desarrolla lentamente, y la gastritis se observa 6 meses después de la infección.

Los resultados obtenidos en el experimento 6 mostraron que para las 96 horas post-inóculo se mantienen los niveles de colonización en ambas cepas de ratón, sin embargo, en los ratones BALB/c los niveles de colonización fueron ligeramente menores a los observados en la cepa C57BL/6. Al comparar nuestros resultados con los reportados por Lee y col.[14] podemos observar que son muy similares ya que a las 96 horas post-inóculo obtuvimos $8.33x10^6$ y $6.50x10^6$ UFC/g de tejido en ratones BALB/c y C57BL/6 respectivamente, mientras que ellos reportan $6.65x10^6$ para BALB/c y $4.5x10^6$ para C57BL/6 a 2 meses post-inóculo. Los resultados de las UFC/g de tejido obtenidas en ambas cepas son considerados como altos niveles de colonización por dichos investigadores. Asimismo, sus resultados de colonización correlacionaron con lo observado a nivel microscópico en sus análisis histológicos.[14]

Para investigar si los ratones inoculados con *H. pylori* desarrollaban cambios en el epitelio gástrico, llevamos a cabo cortes histológicos teñidos con 2 técnicas distintas (experimento 6). Cuando se comparó el epitelio gástrico de los ratones inoculados con los ratones control, se observaron cambios en estos perfiles, en donde se crea un daño causado por la inoculación de la bacteria y este incrementa con respecto al tiempo. Por otro lado, en la tinción de Warthin-Starry se logran observar bacilos café oscuros o negros en el epitelio gástrico de los ratones, los

cuales son similares a aquellos observados en el estudio de Smythies[73], utilizando la cepa SPM326 de *H. pylori*. Entonces, a pesar de que en el cultivo no se detectó a la bacteria, en los cortes histológicos si se logran observar los daños y la detección de la bacteria. De acuerdo a Lee y col. aparentemente, hasta ahora, el éxito de lograr la colonización del epitelio gástrico por cualquier cepa es el hecho de poseer la habilidad intrínseca para vivir en el estómago del ratón, y puede ser que el evento de adaptación de una cepa sea a causa de la serendipia.[14]

Cuando investigamos los cambios en la expresión de citocinas a nivel local por parte de los ratones inoculados, los ratones C57BL/6 sacrificados a la primera semana post-inóculo no aumentaron sus niveles de expresión de IFN-γ, sin embargo, a las 2 semanas de sacrificio se observa un incremento. Watanabe y col.[64] en 2004, mencionan que los ratones C57BL/6 producen preferentemente citocinas Th1 como lo es el IFN-γ, es probable que se requiera un tiempo de infección más prolongado para promover una mayor producción del IFN-γ. De acuerdo a los estudios realizados por Gray y colaboradores en 2013, mencionan que la infección es lenta y progresiva, siendo el IFN-γ esencial para la inducción de gastritis pero se requere que transcurran de 5 a 8 meses post-inóculo para observar los cambios histológicos.[74] Mientras que los ratones BALB/c, al tener una respuesta Th2 preferencial, si expresaron mayores cantidades de IFN-γ en respuesta a la infección, comparado con los niveles basales. Sin embargo, a las 2 semanas la expresión de IFN-γ disminuye, probablemente en respuesta al incremento en la producción de IL-4.

La secreción de diferentes factores tales como IFN-γ, IL-17 o IL-1β activa la diferenciación de macrófagos, los cuales ayudan a eliminar la infección por *H. pylori* en la lámina propia gástrica. Al mismo tiempo, los macrófagos infectados por *H. pylori* pueden inducir respuestas celulares de tipo Th17 como un ciclo de control positivo.[75]

En términos generales, las células Th1 y Th17 secretan citocinas proinflamatorias, por ejemplo, IL-2, IL-17, IL-22, e IFN–γ.[50] Mueller y col.[76] en el 2011, sugieren además que *H. pylori* es capaz de sesgar activamente las respuestas de células T CD4+ hacia un fenotipo regulador y suprimir la respuesta Th17, por lo que facilita la colonización. Los mecanismos propuestos por estudios *in vitro* implican la interacción de *H. pylori* con células dendríticas, estas parecen dirigir la diferenciación de células Treg preferentemente sobre respuestas Th17 y así no producir citocinas pro-inflamatorias.[76, 77]

En este mismo sentido, Meyer y col.[78] en el año 2000 y Sundrud[79] en el 2004, mencionan que diversos productos provenientes de *H. pylori,* entre los que se encuentra VacA, pueden inhibir la producción de IL-2 *in vitro*, por lo tanto se evita la proliferación de las células Th1, atenuando así la respuesta inflamatoria.[78, 79] Siendo esto así, se podría explicar porque en ambas cepas de ratones inoculados y sacrificados 1 semana después los niveles de expresión IL-2 son menores, asimismo, este dato es relevante debido a que Meyer y col. mencionan que esta inhibición de la producción de IL-2 se relaciona también con la limitada respuesta general del sistema inmune.[78] A las dos semanas post-inóculo se observa un incremento en la producción de IL-2 lo cual correlaciona con la disminución de la carga bacteriana (Tabla 3).

En cuanto a la expresión de IL-4, los ratones BALB/c inoculados con *H. pylori* tuvieron niveles más elevados que los basales expresados por ratones control, así como mayor expresión en comparación con la cepa C57BL/6, siendo esto congruente con lo que en el año 2004 explican Watanabe y col.[64] en su investigación acerca de los perfiles de respuestas dominantes Th1 o Th2.[64] Wong y col. mencionan que la expresión de IL-4 puede prevenir la gastritis inducida por *H. pylori*, pudiendo ser esta una de las razones por las cuales la inflamación del epitelio gástrico de los ratones BALB/c fue muy baja o nula.[80] Asimismo, y como se explicó anteriormente, la inhibición producida por IL-2 puede influir en la expresión

de IL-4 mediante el bloqueo de la proliferación de linfocitos T vírgenes requeridos para la expansión de la respuesta de citocinas tipo Th2.[78]

En nuestro estudio la expresión de TGF-β no tuvo cambios significativos a ningún tiempo experimental con las cepas estudiadas. No existe mucha información de cómo es que esta citocina interviene en el proceso de infección por *H. pylori*, sin embargo, Horvath y col. mencionan que TGF-β la cual es producida por linfocitos Treg, es capaz de controlar la estimulación de linfocitos Treg inducibles, así como promover el desarrollo de la respuesta de tipo Th17.[32]

De acuerdo a Mills, tanto las células Treg naturales como las Treg inducibles pueden producir IL-10 o TGF-β. Estas citocinas tienen efectos en los diferentes linajes de células Th1, Th2 así como células CD8+ mediante la disminución de la expresión de complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y moléculas coestimuladoras, disminución de la función de APCs, así como disminución de citocinas proinflamatorias.[34, 53] Como ya se mencionó, en nuestro estudio los niveles de expresión de TGF-β no tuvieron cambios significativos, sin embargo, en los cortes histológicos hubo poca o nula inflamación en los ratones BALB/c, pudiendo ser esto consecuencia de la actividad anti-inflamatoria de IL-10. Varios estudios han mostrado que los patógenos causantes de enfermedades crónicas inducen la producción de citocinas regulatorias como IL-10 y TGF-β.[81] Asimismo, se ha reportado que la respuesta inflamatoria es dependiente del hospedero y de la cepa,[15] y en algunos casos algunos ratones no mostraban gastritis en casi toda su vida.[14]

En nuestro estudio logramos generar las condiciones para obtener un inóculo que al ser administrado de manera intra-gástrica a las distintas cepas de ratón se logre aislar *H. pylori* a partir de cultivos provenientes de ratones sacrificados horas después de haber sido inoculados, asimismo, logramos observar como la inoculación de *H. pylori* conduce a cambios histológicos en el perfil del epitelio gástrico de los ratones, así como cambios en los niveles de expresión de las

distintas citocinas analizadas. Podemos decir que la cepa 019-97MX de *H. pylori* es capaz de generar una infección en las cepas de ratones BALB/c y C57BL/6. Sin embargo, como lo mencionan Mueller y col. en el 2011, es poco el entendimiento de las propiedades inmunomoduladoras de la infección temprana por *H. pylori* por lo que existe espacio para una mayor atención.[76]

CONCLUSIONES

Se lograron establecer las condiciones necesarias para la generación del inóculo, la frecuencia de administración de este a los ratones y el sacrificio para la obtención de los estómagos. Asimismo, se establecieron las condiciones de cultivo con la utilización de los distintos suplementos para la generación de medios selectivos.

En ambas cepas de ratón lograron asilarse *H. pylori* a distintos tiempos y con diferentes niveles de colonización. La cepa C57BL/6 fue la que presento niveles de colonización más elevados.

Los cambios histopatológicos observados en los ratones C57BL/6 fueron más severos que en los ratones BALB/c, en donde se logró observar el cambio en el perfil del epitelio gástrico de los ratones, asimismo, se logró detectar la presencia de la bacteria en los cortes histológicos gracias a la tinción de Warthin-Starry, específica para *H. pylori*. Los perfiles de citocinas mostraron que los niveles de expresión de las distintas citocinas eran más elevados en ratones BALB/c a la primera semana post-inóculo, mientras que esto ocurría en los ratones C57BL/6 a la segunda semana.

Por los niveles de infección más elevados, los cambios histológicos, detección de la bacteria en el tejido y menor expresión de citocinas a la primera semana, la cepa de ratones C57BL/6 se considera como la mejor para establecer una infección utilizando la cepa 019-97MX de *H. pylori.*

PERSPECTIVAS

A partir de la discusión y conclusiones presentadas en este trabajo de tesis, las perspectivas futuras de trabajo con el modelo murino utilizando la cepa 019-97MX estarán orientadas a la investigación de mayores tiempos de infección y los cambios que se puedan presentar en el epitelio gástrico de los ratones utilizados en este modelo. Asimismo, los estudios deberán investigar la participación de otras citocinas para un mejor entendimiento de la respuesta inmune por parte de estos ratones así como los mecanismos de patogénesis. Con el modelo de infección establecido los trabajos posteriores dependerán de los objetivos que se planeen analizar, ya sean la generación de fármacos, vacunas, o algún otro aspecto de la bacteria y/o hospedero.

REFERENCIAS

1. Rappuoli CMaR. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. NATURE REVIEWS 2001;2:457-466.
2. Peek RM, Jr., Fiske C, Wilson KT. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. Physiol Rev 2010;90:831-58.
3. Mullaney E, Brown PA, Smith SM, et al. Proteomic and functional characterization of the outer membrane vesicles from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Proteomics Clin Appl 2009;3:785-96.
4. Algood HM, Cover TL. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. Clin Microbiol Rev 2006;19:597-613.
5. Portal-Celhay C, Perez-Perez GI. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. Clin Sci (Lond) 2006;110:305-14.
6. Atherton JC. The Pathogenesis of *Helicobacter pylori*–Induced Gastro-Duodenal Diseases. Annual Reviews of Pathology: Mechanisms of Disease 2006;1:36.
7. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology 2008;134:306-23.
8. Lee A. Animal models for host-pathogen interaction studies. Br Med Bull 1998;54:163-73.
9. Kaparakis M, Laurie KL, Wijburg O, et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells modulate the T-cell and antibody responses in helicobacter-infected BALB/c mice. Infect Immun 2006;74:3519-29.
10. Andrew S. Day M, Chb, Nicola L. Jones, Md, Phd, Frcpc, Zdenka Policova, Bsc, Hilary A. Jennings, Bsc, Edwin K. Yau, Bsc, Patrick Shannon, Md, Frcpc,A. Wilhelm Neumann, Phd, And Philip M. Sherman, Md, Frcpc. Characterization of Virulence Factors of Mouse-Adapted *Helicobacter pylori*

Strain SS1 and Effects on Gastric Hydrophobicity. Digestive Diseases and Sciences 2001;46:1943–1951.

11. Correa P, Piazuelo MB. Natural history of *Helicobacter pylori* infection. Dig Liver Dis 2008;40:490-6.
12. Nagai S, Mimuro H, Yamada T, et al. Role of Peyer's patches in the induction of *Helicobacter pylori*-induced gastritis. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:8971-6.
13. McColm AA. Nonprimate Animal Models for *Helicobacter pylori* Infection. Methods in Molecular Medicine 1996.
14. Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, et al. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. Gastroenterology 1997;112:1386-97.
15. van Doorn NE, Namavar F, Sparrius M, et al. *Helicobacter pylori*-associated gastritis in mice is host and strain specific. Infect Immun 1999;67:3040-6.
16. Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Aliment Pharmacol Ther 1995;9 Suppl 2:33-9.
17. Blaser MJ. Ecology of *Helicobacter pylori* in the human stomach. J Clin Invest 1997;100:759-62.
18. World Gastroenterology Organization. *Helicobacter pylori* in developing countries. WGO Global Guideline 2010.
19. Sachs G, Weeks DL, Wen Y, et al. Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. Physiology (Bethesda) 2005;20:429-38.
20. Meridian B. *Helicobacter pylori* Learning Center. 2012.
21. Everhart JE, Kruszon-Moran D, Perez-Perez GI, et al. Seroprevalence and ethnic differences in *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. J Infect Dis 2000;181:1359-63.
22. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev 2006;19:449-90.

23. Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, et al. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. J Infect Dis 1998;178:1089-94.
24. Torres J. [Epidemiologic and clinical aspects of *Helicobacter pylori* infection in children]. Rev Gastroenterol Mex 2000;65:13-9.
25. Fuentes-Pananá E C-PM, Maldonado-Bernal C. Infección, inflamación y cáncer gastrico. Salud Publica Mex 2009;51.
26. Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. Epidemiol Rev 2000;22:283-97.
27. Delport W, Cunningham M, Olivier B, et al. A population genetics pedigree perspective on the transmission of *Helicobacter pylori*. Genetics 2006;174:2107-18.
28. Segal ED, Cha J, Lo J, et al. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:14559-64.
29. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997;10:720-41.
30. Gobert AP, McGee DJ, Akhtar M, et al. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:13844-9.
31. Pinto-Santini D, Salama NR. The biology of *Helicobacter pylori* infection, a major risk factor for gastric adenocarcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14:1853-8.
32. Horvath DJ, Jr., Washington MK, Cope VA, et al. IL-23 Contributes to Control of Chronic *Helicobacter pylori* Infection and the Development of T Helper Responses in a Mouse Model. Front Immunol 2012;3:56.
33. Blanchard TG, Czinn SJ. Review article: Immunological determinants that may affect the *Helicobacter pylori* cancer risk. Aliment Pharmacol Ther 1998;12 Suppl 1:83-90.

34. O'Keeffe J MA. Conventional, Regulatory, and Unconventional T Cells in the Immunologic Response to *Helicobacter pylori*. Helicobacter 2008.
35. Pandey R, Misra V, Misra SP, et al. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. Asian Pac J Cancer Prev 2010;11:583-8.
36. Megraud F. H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut 2004;53:1374-84.
37. Josenhans C, Labigne A, Suerbaum S. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and Helicobacter mustelae flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in Helicobacter species. J Bacteriol 1995;177:3010-20.
38. Aspholm M, Olfat FO, Norden J, et al. SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. PLoS Pathog 2006;2:e110.
39. Senkovich OA, Yin J, Ekshyyan V, et al. *Helicobacter pylori* AlpA and AlpB bind host laminin and influence gastric inflammation in gerbils. Infect Immun 2011;79:3106-16.
40. Salama NR, Otto G, Tompkins L, et al. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. Infect Immun 2001;69:730-6.
41. de Bernard M, Moschioni M, Papini E, et al. Cell vacuolization induced by *Helicobacter pylori* VacA toxin: cell line sensitivity and quantitative estimation. Toxicol Lett 1998;99:109-15.
42. Azucena Arévalo B, Alba Alicia Trespalacios, MSc, William Otero, MD. Importancia de la proteína CagA en infección por *Helicobacter pylori*. Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología 2009.
43. Peek RM, Jr., Miller GG, Tham KT, et al. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. Lab Invest 1995;73:760-70.

44. Peek RM, Jr., Moss SF, Tham KT, et al. *Helicobacter pylori* cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. J Natl Cancer Inst 1997;89:863-8.
45. Ohnita K, Isomoto H, Honda S, et al. *Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric inflammation in Mongolian gerbils. World J Gastroenterol 2005;11:1549-53.
46. Peek RM. *Helicobacter pylori* infection and disease: from humans to animal models. Dis Model Mech 2008;1:50-5.
47. Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, et al. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. J Biol Chem 2005;280:23130-7.
48. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, et al. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:14428-33.
49. Keates S, Hitti YS, Upton M, et al. *Helicobacter pylori* infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. Gastroenterology 1997;113:1099-109.
50. Fox J, Sheh A. The role of the gastrointestinal microbiome in *Helicobacter pylori* pathogenesis. Gut Microbes 2013;4.
51. Fox JG, Beck P, Dangler CA, et al. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. Nat Med 2000;6:536-42.
52. Wan YY, Flavell RA. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. J Mol Cell Biol 2009;1:20-36.
53. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? Nat Rev Immunol 2004;4:841-55.
54. Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. J Dig Dis 2012;13:2-9.
55. J. RV, M. VG. Atrophy, metaplasia, and gastric cancer: where is the evidence? Revista Colombiana de Cirugía 2007;22:39-46.

56. Radin MJ, Eaton KA, Krakowka S, et al. *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. Infect Immun 1990;58:2606-12.
57. Handt LK, Fox JG, Dewhirst FE, et al. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. Infect Immun 1994;62:2367-74.
58. Fox JG, Batchelder M, Marini R, et al. *Helicobacter pylori*-induced gastritis in the domestic cat. Infect Immun 1995;63:2674-81.
59. Lee A, Fox JG, Otto G, et al. A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. Gastroenterology 1990;99:1315-23.
60. Kim JS, Chang JH, Chung SI, et al. Importance of the host genetic background on immune responses to *Helicobacter pylori* infection and therapeutic vaccine efficacy. FEMS Immunol Med Microbiol 2001;31:41-6.
61. Karita M, Kouchiyama T, Okita K, et al. New small animal model for human gastric *Helicobacter pylori* infection: success in both nude and euthymic mice. Am J Gastroenterol 1991;86:1596-603.
62. Akopyants NS, Eaton KA, Berg DE. Adaptive mutation and cocolonization during *Helicobacter pylori* infection of gnotobiotic piglets. Infect Immun 1995;63:116-21.
63. Sellers RS, Clifford CB, Treuting PM, et al. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. Vet Pathol 2012;49:32-43.
64. Watanabe H, Numata K, Ito T, et al. Innate Immune Response in Th1- and Th2-Dominant Mouse Strains. Shock 2004;22:460-466.
65. Ayala G, Chihu L, Perales G, et al. Quantitation of *H. pylori* cytotoxin mRNA by real-time RT-PCR shows a wide expression range that does not correlate with promoter sequences. Microb Pathog 2004;37:163-7.
66. Singh D. P. DSK. Environmental Microbiology And Biotechnology. United States: New Age International, 2004.
67. C. PJ. Alcamo's Laboratory Fundamentals of Microbiology: Jones & Bartlett Publishers, 2010.

68. Goutan Bhowmik SB. Analyticals Techniques in Biotechnology: Tata McGraw-Hill Education, 2011.
69. Ortega AM. Perfil de expresión de citocinas Th1, Th2 y Th3 en un modelo tumoral murino VPH 16 positivo como respuesta a la expresión de la IL-12 e E2 de VPH 16 usando DNA desnudo. Instituto Nacional de Salud Pública: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2011.
70. Ochei J., Kolhatkar A. Medical Laboratory Science : Theory And Practice: Tata McGraw-Hill Education, 2000.
71. Thompson LJ, Danon SJ, Wilson JE, et al. Chronic *Helicobacter pylori* infection with Sydney strain 1 and a newly identified mouse-adapted strain (Sydney strain 2000) in C57BL/6 and BALB/c mice. Infect Immun 2004;72:4668-79.
72. Sterzenbach T, Bartonickova L, Behrens W, et al. Role of the Helicobacter hepaticus flagellar sigma factor FliA in gene regulation and murine colonization. J Bacteriol 2008;190:6398-408.
73. Smythies LE, Chen JA, Lindsey JR, et al. Quantitative analysis of *Helicobacter pylori* infection in a mouse model. J Immunol Methods 2000;242:67-78.
74. Gray BM, Fontaine CA, Poe SA, et al. Complex T cell interactions contribute to *Helicobacter pylori* gastritis in mice. Infect Immun 2013;81:740-52.
75. Carbo A, Bassaganya-Riera J, Pedragosa M, et al. Predictive Computational Modeling of the Mucosal Immune Responses during *Helicobacter pylori* Infection. PLoS One 2013;8:e73365.
76. Muller A, Solnick JV. Inflammation, immunity, and vaccine development for *Helicobacter pylori*. Helicobacter 2011;16 Suppl 1:26-32.
77. Beigier-Bompadre M, Moos V, Belogolova E, et al. Modulation of the CD4+ T-cell response by *Helicobacter pylori* depends on known virulence factors and bacterial cholesterol and cholesterol alpha-glucoside content. J Infect Dis 2011;204:1339-48.

78. Meyer F, Wilson KT, James SP. Modulation of innate cytokine responses by products of *Helicobacter pylori*. Infect Immun 2000;68:6265-72.

79. Sundrud MS, Torres VJ, Unutmaz D, et al. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:7727-32.

80. Wong BL, Zhu SL, Huang XR, et al. Essential role for macrophage migration inhibitory factor in gastritis induced by *Helicobacter pylori*. Am J Pathol 2009;174:1319-28.

81. Mittrucker HW, Kaufmann SH. Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited. Eur J Immunol 2004;34:306-12.