



CREER... CREAR... CRECER



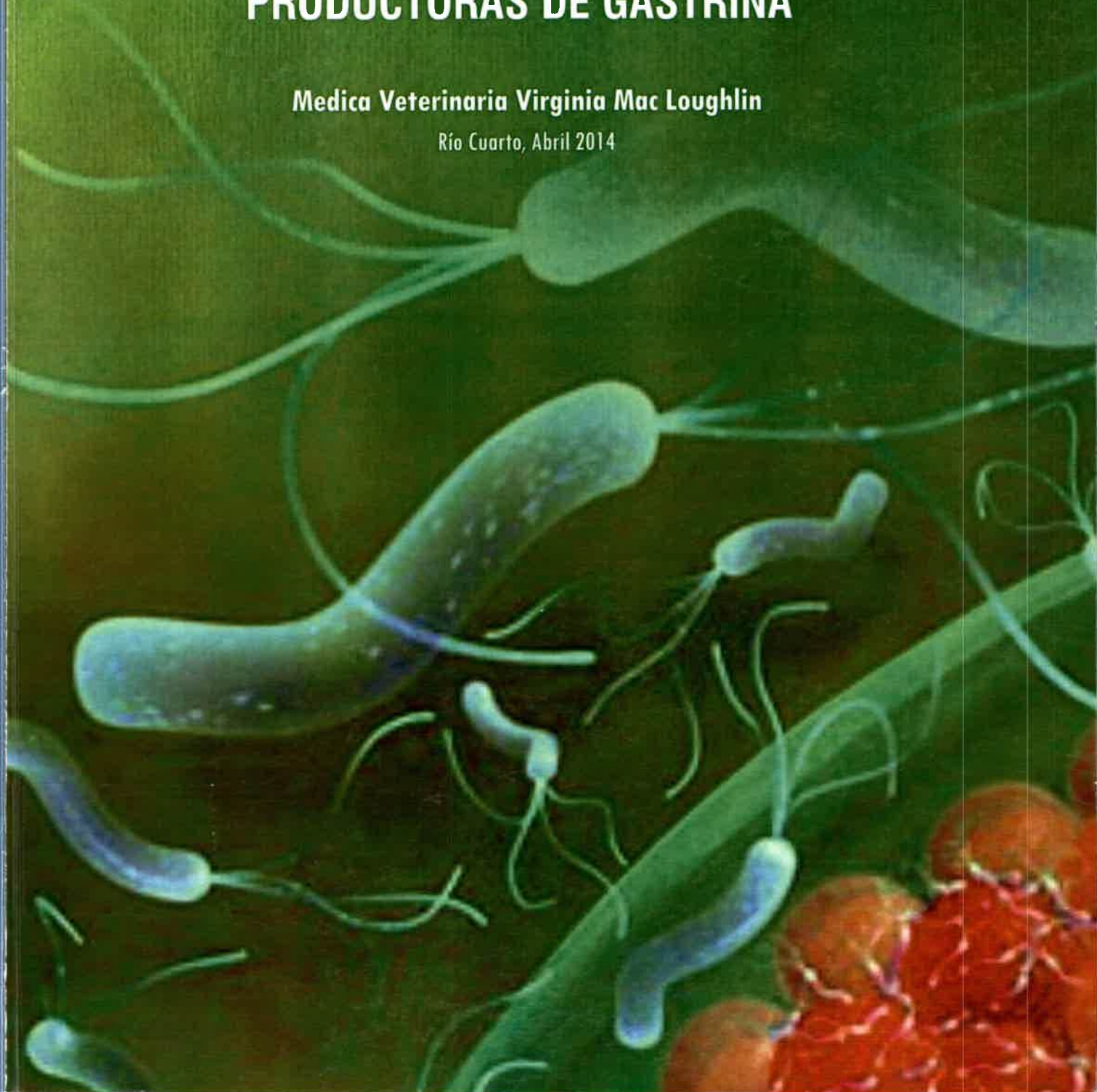
T.845

Doctorado Binacional en Ciencias, Tecnología e Innovación Agropecuaria

"RELACIÓN ENTRE *HELICOBACTER SPP* Y CÉLULAS PRODUCTORAS DE GASTRINA"

Medica Veterinaria Virginia Mac Loughlin

Río Cuarto, Abril 2014





MAC LOUGHLIN, VIRGIN
Relacion entre helic

2014

73183

73183



El presente trabajo fue realizado en la Cátedra de Histología, Departamento de Anatomía Animal. Área de Microscopía Electrónica, Departamento de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria y se presenta como requerimiento para optar al título de Doctora en Ciencias, Tecnología e Innovación Agropecuaria. Abril 2014.

Doctorado Binacional en Ciencias, Tecnología e Innovación Agropecuaria

“RELACIÓN ENTRE *HELICOBACTER SPP* Y CÉLULAS PRODUCTORAS DE GASTRINA”

Doctorando: Medica Veterinaria Virginia Mac Loughlin

Directora: Dra. Cecilia Inés Merkis

Jurado de Tesis:



Dr. Dante Paz



Dr. Claudio Barbeito



Dr. Rodolfo Ávila

88187

73183

73183

MFN:
Clasif:
- .845

A las personas que llenan mi corazón...

*“Quien no agradece las pequeñas cosas,
jamás agradecerá las grandes”*

Mahoma

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por haberme brindado la oportunidad de formarme humana y profesionalmente.

Al Comité Académico del Doctorado por sus aportes a favor de mejorar mi trabajo. A la Dr Adriana Vivas.

A la Secretaria de Posgrado, gracias Carlos y Mónica siempre me han tratado con mucha cordialidad.

A los miembros del Jurado, Dr. Dante Paz, Dr. Claudio Barbeito y Dr. Rodolfo Ávila, sus aportes me han hecho crecer y mejorar.

A mi Directora, Dra. Cecilia Merkis, por su dedicación, por haber confiado en mí, por tus palabras de aliento en momentos de desazón y principalmente por tu amistad.

Al servicio de endoscopia digestiva del Nuevo Hospital de Rio Cuarto, muy especialmente a los Dres Marcos Miguel y Marcos Olivero.

Mis mas sinceros agradecimientos al servicio de anatomía-patológica, Dres Carlos Gonzalez Achaval, Silvia Ezcurra y a las técnicas Nancy Ferrero y Bibiana Hechen por todo lo que me enseñaron, por hacerme sentir como casa y por sobre todas las cosas por el enorme cariño que me brindaron mis gracias eternas hacia ustedes.

Al área de microscopía electrónica, es un placer trabajar allí muy especialmente a Andrea Cristofolini y a Gabriela Sanchis por su ayuda desinteresada y por recibirme todos los días con un abrazo cálido.

A Nelcy Schleef y a Facundo Bonino por su colaboración.

A mis compañeros de la Cátedra de Histología Lili, Osvaldo, Ramiro, Víctor y a vos Caro gracias por tu amistad, nuestras charlas y tu ayuda.

Un especial agradecimiento A mi Amigo, jefe, papá del corazón Pascual Dauría, no me va a alcanzar la vida para agradecerte es que son tantas cosas che... gracias por tu confianza en mi, aun cuando muchos no confiaban, por creer en mis capacidades, por tu apoyo diario, por pensar siempre en el ser humano ante todo, por nuestras charlas, mates de por medio, llantos y risas compartidas y los retos también, pero por sobre todo por darme alas para volar por permitirme ver mas allá y por tus invalorable consejos.

A Graciela Sagripanti otra Amiga que la vida me dió que me banca todos los días, gracias por los mates de la mañana son como el sana sana colita de ... hacen que los momentos no tan gratos pasen más fácilmente y se disfruten mucho más los grandes momentos y gracias inmensas por supuesto por tu trabajo y dedicación en mi tesis.

A los ayudantes de 2º, los actuales y a los que han pasado por la cátedra, hijos postizos, siempre les digo lo que los quiero.. he aprendido yo mas de ustedes, les puedo asegurar, que ustedes de mi, gracias por sus palabras de aliento y su abrazo contenedor, gracias

por el aguante, son mis pilas para mirar adelante y tratar de mejorar, su inmenso cariño lo llevo en el corazón y un gracias enormes a los que colaboraron en este trabajo.

Gracias querido Leandro Ritta por trabajar codo a codo, por las interminables horas contando células y por tu enorme afecto.

Un GRACIAS gigante a mi familia: mis papas los mejores del mundo, sé que siempre han hecho lo que han creído mejor para nosotros, mis logros son totalmente suyos. A mis hermanos, cuñados/das, sobrinos, por estar siempre por tenderme una mano, por ayudarme a cumplir mis sueños y por hacerme sentir tan pero tan querida , los Mac estaremos un poco locos pero son la mejor familia que me podría haber tocado.

A mis hombres Juan Ignacio, Juan Pablo, Francisco y Hugo, no tengo palabras para decirles lo que significan en mi vida, todo es poco decir, gracias por los hermosos momentos que hemos vivido y por todos los que restan por vivir, por los momentos duros, por el esfuerzo diario, lo que mas deseo en la vida es que sean felices a ustedes cuatro les dedico muy especialmente este trabajo.

A mis amigos, mis queridos amigos de siempre hermanos del alma y a los que la vida me fue poniendo en el camino gracias eternas por acompañarme en todo, esto también es de ustedes.

Y a todos aquellos que me dieron sus palabras de aliento, un abrazo, una sonrisa o tal vez un ¿Cómo estas? o ¿Cómo va tu trabajo? o suerte ¡! Todo va a salir bien ...Gracias.

Y por último a Morgado, a la luna, a las zambas...las bellas zambas y a la música que esta en mi corazón y a mi querido pueblo Alejandro Roca.

Tesis de Posgrado: Doctorado Binacional en Ciencias, Tecnología e Innovación Agropecuaria

Título: “Relación entre *Helicobacter spp* y células productoras de gastrina”

Autora: Medica Veterinaria Virginia Mac Loughlin, vmacloughlin@ayv.unrc.edu.ar

Directora: Dra. Cecilia I. Merkis

Lugar de trabajo: Cátedra de Histología. Dpto Anatomía animal. Área de Microscopia Electrónica, Dpto. de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

RESUMEN

La secreción de ácido gástrico es controlada principalmente por la hormona gastrina, la cual es sintetizada por las células G de la mucosa estomacal. El *Helicobacter* altera el control inhibitorio de la liberación de gastrina y esto resulta en una excesiva secreción ácida provocando úlceras pépticas. Estudios realizados confirman la implicancia del *Helicobacter spp* en patologías gástricas del hombre y otras especies animales, entre ellas el cerdo. Es por ello que estas bacterias podrían ser patógenos responsables de zoonosis. El objetivo del trabajo fue estudiar la relación entre *Helicobacter spp* y la funcionalidad de las células productoras de gastrina en biopsias gástricas humanas y muestras gástricas de cerdos. Se determinó la presencia de *Helicobacter spp* en biopsias gástricas humanas, de la región antral, de pacientes de ambos sexos entre 30-50 años obtenidas en el Servicio de Endoscopia Digestiva del Nuevo Hospital Río Cuarto y muestras gástricas de región antral de cerdos mestizos de diferentes edades y sexos, obtenidas de Frigoríficos de la zona de Río Cuarto. Las muestras gástricas fueron sometidas a la tinción de hematoxilina y eosina para el diagnóstico de gastritis agudas y crónicas. La presencia de *Helicobacter* (H) se realizó a través de Giemsa, Warthin Starry e inmunohistoquímica con anticuerpos comerciales. La detección de células G se realizó por técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos comerciales. Se determinó el porcentaje de células gastrina positivas en biopsias gástricas humanas y muestras gástricas de cerdos con gastritis agudas H(+)/(-) y gastritis crónica H(+)/(-). Las gastritis en humanos y cerdos fueron perfectamente diagnosticadas con H/E. En cerdos, se observó mayor proporción de lesiones crónicas que agudas. Con Giemsa y Warthin-Starry se determinó la presencia de *Helicobacter spp*. En muestras gástricas de cerdo podemos inferir que existe más de una especie colonizando el estómago. La inmunodetección de *Helicobacter spp*. se expresó en el epitelio, fosea gástrica y glándula gástrica. Las evaluaciones realizadas en cuanto al porcentaje de células gastrina positivas en biopsias humanas y muestras gástricas de cerdos con diagnóstico de gastritis agudas con presencia de *Helicobacter* el valor $p=0,0042$ permitió establecer que en este tipo de muestras existen diferencias significativas. El mayor porcentaje de células productoras de gastrina fue en humanos, con un 4% más. En muestras con diagnóstico de gastritis crónicas con presencia de *Helicobacter*, se determinó que entre ambas especies existen diferencias significativas en el % de células G ($p=0,0317$), siendo el cerdo el que posee un 2% más. En las muestras gástricas *Helicobacter* (-) y mucosas normales no se presentaron diferencias estadísticas significativas. En este estudio los resultados nos indican que el aumento en la producción de la hormona gastrina, en ambas especies, no solo se refiere a su concentración como establecen otros autores, sino también a un aumento en el número de células que la producen. La capacidad de estos microorganismos para colonizar en forma natural y para inducir lesiones gástricas en el hombre y en diferentes especies animales, ha generado preocupación a nivel mundial por su posible riesgo zoonótico.

Tesis de Posgrado: Doctorado Binacional en Ciencias, Tecnología e Innovación Agropecuaria

Título: “Relación entre *Helicobacter spp* y células productoras de gastrina”

Autora: Medica Veterinaria Virginia Mac Loughlin, vmacloughlin@ayv.unrc.edu.ar

Directora: Dra. Cecilia I. Merkis

Lugar de trabajo: Cátedra de Histología. Dpto Anatomía animal. Área de Microscopia Electrónica, Dpto. de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

ABSTRACT

Gastric acid secretion is mainly controlled by gastrin hormone, which is synthesized by G cells of the stomach mucosa. *Helicobacter* alters the inhibitory control of the release of gastrin, and this results in an excessive acid secretion causing peptic ulcers. Studies confirm the implication of *Helicobacter spp* gastric pathologies in man and other animals species, including pigs. That is why these bacteria could be responsible for zoonotic pathogens. The objective was to study the relationship between *Helicobacter spp* and function of gastrin-producing cells in human gastric biopsies and gastric samples of pigs. It was observed the presence of *Helicobacter spp* in human gastric biopsies in the antral region of patients of both sexes aged 30-50 years obtained in Digestive Endoscopy Service of the New Hospital Río Cuarto and gastric antral region samples of different crossbred pigs was determined by age and sex, obtained from the Refrigerator Río Cuarto. Gastric samples were subjected to hematoxylin and eosin staining for the diagnosis of acute and chronic gastritis. *Helicobacter* (H) was identified using Giemsa, Warthin Starry and immunohistochemistry with commercial antibodies. Detection of G cells was determined by immunohistochemistry with commercial antibodies. It was stated chronic gastritis H (+) / (-) the percentage of positive cells gastrin in human gastric and gastric biopsy samples from pigs with acute gastritis H (+) / (-) and chronic gastritis H (+) / (-). The gastritis in humans and pigs were perfectly diagnosed with H/E. In pigs, the proportion of chronic lesions was greater than the proportion of adult ones. With Giemsa and Warthin-Starry *Helicobacter spp* was determined. In pig gastric samples we can infer that there is more than one species colonizing the stomach. Immunodetection of *Helicobacter spp*. was expressed in the epithelium, gastric pit and gastric gland. Assessments made in the percentage of positive cells in human biopsies gastrin and gastric samples of pigs with diagnosis of acute gastritis with *Helicobacter* p value = 0.0042 established that there are significant differences in these samples. The highest percentage of cells producing gastrin human was observed with 4 % more. In samples with a diagnosis of chronic gastritis with *Helicobacter*, it was determined, in both species, there are significant differences between in the percentage G cells species (p = 0.0317), being the pig has a 2 % increase. In gastric *Helicobacter* samples (-) and normal mucosa it was not observed statistically significant differences. In this study, the results indicate that the increased production of the hormone gastrin, in both species, not only refers to the concentration as other authors state, but also to an increase in the number of cells that produces it. The ability of these organisms to colonize naturally and to induce gastric lesions in humans and in different animals species, has generated worldwide concern for possible zoonotic risk.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
TÍTULO	1
INTRODUCCIÓN	
1.1. Generalidades	2
1.2. Estómago	4
1.3. Estómago humano cerdo	4
1.4. Estómago de cerdo	17
1.5. <i>Helicobacter spp</i>	20
1.6. Gastritis	28
1.7. Hormonas Gastrointestinales	37
1.8. Gastrina	39
HIPÓTESIS DE TRABAJO	42
OBJETIVOS	
2.2. Objetivo General	44
2.3. Objetivos Específicos	44
MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Biopsias gástricas humanas	45
3.2. Muestras gástricas de cerdo	46
3.3 Técnica de histología convencional para microscopía óptica	46
3.4 Tinción de hematoxilina-eosina	47

3.5 Tinción de Giemsa	48
3.6 Tinción de Warthin Starry	48
3.7 Grupos	49
3.8 Análisis morfológico de las diferentes especies de <i>Helicobacter</i>	50
3.9 Técnicas Inmunohistoquímicas	51
3.9.1 Inmunodetección de <i>Helicobacter spp</i> y de células G productoras de Gastrina	51
3.9.2 Determinación de <i>Helicobacter spp</i> y células G productoras de gastrina	51
3.10 Estudio estadístico	52
4. RESULTADOS	53
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	
5.1. Prueba t	79
5.2. Análisis de la varianza	84
6. DISCUSIÓN	85
7. CONCLUSIONES	95
8. BIBLIOGRAFÍA	97
ANEXOS	105

INDICE DE ABREVIATURAS

H. pylori: Helicobacter pylori

H. mustelae: Helicobacter mustelae

H. acynonyx: Helicobacter acynonyx

H. Felix: Helicobacter felix

H. helmannii: Helicobacter helmannii

H. bizzozeronii: Helicobacter bizzozeronii

H. felis: Helicobacter felis

Helicobacter spp: especies de Helicobacter

Células G: células productoras de gastrina

SNP: Sistema nervioso periférico

SNC: Sistema nervioso central

SNA: Sistema nervioso autónomo

Cardias: región cardial

Antro. Región pilórica

Fudus: región fundica

H/E: hematoxilina –eosina

HCL: ácido clorhídrico

H₂: receptores histamínicos

M₃: receptores muscarínicos de acetilcolina

Up: unipolar

Bp: bipolar

H. nemestrinae: Helicobacter nemestrina

H. salomonis: Helicobacter salomonis

Bp,F: Bipolar, fibrillas periplásmicas,

b : infecciones en el hombre

b H. cinaedi: Helicobacter cinaedi

bH. fennelliae: Helicobacter fennelliae

bH. westmeadii: Helicobacter westmeadii

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

bH. pullorum: Helicobacter pullorum

Up (noE): unipolar no envainado

H. pametensis: Helicobacter pametensis

H. cholecystus: Helicobacter cholecystus

H. hepaticus: Helicobacter hepaticus

H. bilis: Helicobacter bilis

H. rodentium. Helicobacter rodentium

H. muridarum: Helicobacter muridarum

H. trogonu : Helicobacter trogonum

a Up: unipolar

Bp: bipolar

L: lateral

F: fibrillas periplásmicas

(no E): no envainados

NA *b* anfitrión natural

un sinónimo heterotípica tarde de *H. pylori*

b ND: no disponible.

Células D: células productoras de somatostatina

Células D₁: células productoras de péptido intestinal vasoactivo

Células ECL: células enteroendocrinas liberadoras de histamina

VIP: péptido intestinal vasoactivo

Gastritis tipo A: gastritis atróficas

Gastritis tipo B: gastritis superficiales

Gastritis tipo C: gastritis de origen químico

^{un}ND: no se describe

^bNHPh: no *H. Helicobacter pylori* especies

^cMNNG: *N* - metil- *N* -nitro- *N*'-nitrosoguanidina

GI: gastrointestinal

CCK: colecistocinina

GIP: péptido gástrico inhibidor

GLP-1: péptido simil glucagón

COOH: ácido carboxílico

Ca: calcio

GRP: péptido liberador de gastrina

D-cells: células secretoras de somatostatina

H₂ R: receptores de histamina

Ratones C57BL: cepa endogámica del ratón de laboratorio

SSH: solución salina de Hank

PAS: ácido peróxido de Schiff

Na₂HPO₄H₂O:

IO₃Na: iodato de sodio

G: gramos

h: hora

mg: miligramos

ml: mililitros

U: unidad

°C: grados centígrados

µm: micras

Sn: solución Sn de hematoxilina

Mm³: milímetros cúbicos

Min: minutos

C/U: cada uno

PBS: solución salina tamponada

%: porcentaje

CC: centímetros cúbicos

G/H+: gastritis *Helicobacter* positivo

G/H-: gastritis *Helicobacter* negativo

H-: *Helicobacter* negativo

H+: *Helicobacter* positivo

V/V: volumen sobre volumen

DAB: diaminobencidina

Seg. Segundos

Prueba t: prueba t Student para muestras independientes

ANOVA: análisis de la varianza

E: epitelio

LP: lámina propia

IL: infiltrado leucocitario

P= probabilidad

<: signo menor

= : igual

ratón INS-GAS: ratones hipergastrinémicos

(ASF): flora alterada de Schaedler

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1	5
Figura N° 2	7
Figura N° 3	8
Figura N° 4	9
Figura N° 5	10
Figura N° 6	12
Figura N° 7	13
Figura N° 8	14
Figura N° 9	15
Figura N° 10	17
Figura N° 11	18
Figura N° 12	21
Figura N° 13	22
Figura N° 14	28
Figura N° 15	32
Figura N° 16	34
Figura N° 17	40
Figura N° 18	41
Figura N° 19	54
Figura N° 20	55
Figura N° 21	56
Figura N° 22	56
Figura N° 23	57
Figura N° 24	58
Figura N° 25	59
Figura N° 26	60
Figura N° 27	61
Figura N° 28	61
Figura N° 29	63
Figura N° 30	63
Figura N° 31	64

Figura N° 32	64
Figura N° 33	65
Figura N° 34	66
Figura N° 35	66
Figura N° 36	67
Figura N° 37	68
Figura N° 38	69
Figura N° 39a	71
Figura N° 39b	71
Figura N° 40a	72
Figura N° 40b	72
Figura N° 41a	73
Figura N° 41b	73
Figura N° 42a	74
Figura N° 42b	74
Figura N° 43a	75
Figura N° 43b	75
Figura N° 44a	76
Figura N° 44b	76
Figura N° 45a	77
Figura N° 45b	77
Figura N° 46a	78
Figura N° 46b	78

INDICE DE TABLAS

Tabla N° I	24
Tabla N° II	25
Tabla N° III	34
Tabla N° IV	80
Tabla N° V	82
Tabla N° VI	83

Doctorado Binacional en Ciencia, Tecnología e Innovación Agropecuaria

“Relación entre *Helicobacter spp.* y células productoras de Gastrina”

Doctorando: Med Vet. Virginia Mac Loughlin

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

El *Helicobacter pylori*, un microorganismo Gram negativo que se aloja en la mucosa gástrica, fue observado por primera vez, por el patólogo Robin Warren a principios de junio de 1979. Su detección en estudios histopatológicos continuó por un par de años asociando la presencia del microorganismo con enfermedades gástricas en el hombre. Durante este tiempo, hubo muchos intentos de aislar a la bacteria pero sin ningún éxito (Tytgort *et al.*, 1994; Mc Coll *et al.*, 1997; Warren *et al.*, 1997; Thibaut *et al.*, 2007; Morales *et al.*, 2008).

En 1981, el médico gastroenterólogo Barry Marshall se une a la investigación realizada por Warren y confirma los resultados de este último. Sin embargo fue hasta 1982, que el *Helicobacter pylori* pudo aislarse por primera vez. En 1984, se publicó en la revista *Lancet* la asociación del *Helicobacter pylori* con la gastritis crónica y por primera vez se sugirió que la *úlcer*a péptica pudiera ser de etiología infecciosa. En 1985 frente a la incredulidad del ambiente médico, Marshall demostró la capacidad de la bacteria de causar enfermedad, al ingerir un cultivo de la misma y controlarse mediante repetidas endoscopías. A partir de ese momento hubo un crecimiento exponencial de la información sobre el tema, que continúa en la actualidad. (Soriano, 1998; Bondi, 2006; Cárdenas *et al.*, 2007).

La gran cantidad de información médica generada desde 1986 hasta el presente tuvo un punto muy alto en un importante estudio que demostró la aparente curación de la úlcera gastroduodenal luego de erradicar la bacteria. En 1994 se efectuó una conferencia *consensus* con los Institutos Nacionales de Salud, donde *Helicobacter pylori* fue declarado la principal causa de úlcera péptica y ese mismo año la Agencia Internacional para la investigación del cáncer de la Organización Mundial para la Salud, declara que *Helicobacter pylori* es cancerígeno en humanos. En el año 2005, los doctores Warren y Marshall fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología, por el descubrimiento del *Helicobacter pylori* y su papel en el diagnóstico, prevención y tratamiento de gastritis crónicas, úlceras gastroduodenales, linfoma gástrico y en cierta forma del cáncer gástrico por parte de este microorganismo (Moreno, 2005; Tibaut *et al.*, 2007). Sin embargo, algunos autores sugieren que la enfermedad de la úlcera péptica es una enfermedad multifactorial donde *Helicobacter pylori* no tendría necesariamente un papel principal en la misma (Hobsley *et al.*, 2008; Vikram *et al.*, 2013).

Estudios posteriores confirman la intervención del *Helicobacter pylori* en enfermedades gástricas del ser humano como también la existencia diferentes especies de *Helicobacter* en distintos animales: *H. mustelae* en hurones, *H. acynonyx* en leopardos y chitas, *H. felis*, *H. helmannii*, *H. bizzozeronii* en perros, *H. helmannii*, *H. felis* y *H. pylori* en gatos (Odriozola, 2011).

En porcinos se ha logrado reproducir la úlcera gástrica mediante la inoculación experimental con *H. pylori* (Rodríguez y col, 2009); además se ha detectado otra bacteria espiralada ureasa positiva, que se presenta de manera natural en el cerdo, la cual se la describió asociada a la presentación de úlceras gastroesofágicas, razón por la cual se ha propuesto como un factor posiblemente relacionado con su etiopatogénesis (Queiroz *et al.*, 1996; Rodríguez y col; 2008). Este microorganismo inicialmente se nombró como *Gastrospirillum suis* por su morfología intensamente espiralada (Goodwin *et al.*, 1989; Barbosa *et al.*, 1995), luego *Helicobacter heilmannii* y posterior a su caracterización molecular se lo llamó *Candidatus Helicobacter suis*, sin embargo, en la actualidad las tres son consideradas como idénticas. La evaluación histológica con la coloración de Warthin-Starry reveló la presencia de dos tipos morfológicos de bacterias: la primera, que se caracterizó por su mayor tamaño y su morfología intensamente espiralada, concuerda con las descripciones previas de *H. heilmannii*; y la segunda, de menor tamaño y con forma de "s" itálica corresponde morfológicamente con la bacteria que se ha denominado como *H. pylori*.

Bajo condiciones variables de cultivo se ha determinado en porcinos que *H. pylori* puede adoptar la misma morfología que *H. heilmannii* (Rodríguez y col, 2009). También se ha logrado inducir la producción de úlceras por *H. pylori* en cerdos libres de patógenos específicos (Eaton *et al.*, 1997) todos los estudios sugieren que estos microorganismos colonizan el estómago del cerdo o que un mismo género podría asumir patrones morfológicos diferentes por causas inherentes al ambiente gástrico del huésped (Makinde *et al.*, 1990; Fox *et al.*, 1997). Estas bacterias podrían ser patógenos responsables de zoonosis y podrían transmitirse a partir de la especie porcina (Vale *et al.*, 2010; Baele *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2013).

La secreción de ácido gástrico es principalmente controlada por la hormona gastrina, la cual es sintetizada por las células G de la mucosa estomacal. Cuando la gastrina es liberada, ingresa a la circulación sistémica y estimula las células parietales para secretar ácido clorhídrico. El *Helicobacter pylori* altera el control inhibitorio de la liberación de gastrina y esto resulta en una excesiva secreción ácida provocando úlceras pépticas (Sleingsinger *et al.*, 2000).

Existen evidencias de la presencia de células G en etapas tempranas del desarrollo tanto en humanos como en diferentes especies animales (Dauría, 2011). Desde el punto de vista morfológico, en individuos adultos de diferentes especies, se describen formas que varían de redonda a piramidal en humanos (UCGS, 2007; Ross and Pawlina, 2012); redonda, ovalada, de huso y triangular en caballos adultos (Ceccarelli *et al.*, 1995); piramidal en otras especies domésticas y salvajes (Kitamura *et al.*, 1990; Ceccarelli *et al.*, 1995); y células de formas redondeadas y piramidales en fetos de caballo (Dauría, 2011).

1.2 ESTÓMAGO:

1.3 ESTÓMAGO HUMANO

Descripción anatómica

El estómago es una dilatación sacciforme del tubo digestivo con forma de anzuelo o de J. Está localizado en el hemiabdomen superior e interpuesto entre el esófago y el duodeno. Cuando esta semirrepleto, sus dimensiones son aproximadamente de 25 cm de longitud, 12 cm de ancho y un grosor de 8cm. Su capacidad oscila alrededor de un litro aproximadamente.

Para su descripción se distinguen:

- a) Una pared anterior, convexa
- b) Una pared posterior, mas bien plana
- c) Un borde izquierdo, o curvatura mayor
- d) Un borde derecho, o curvatura menor
- e) Un extremo superior, con una dilatación hacia la izquierda: la tuberosidad mayor
- f) Un extremo inferior hacia la izquierda: la tuberosidad menor (Dos Santos, 1970).

Los ejes longitudinales del cuerpo gástrico y del antro forman un ángulo en la curvatura menor, la interna o menor, donde se encuentra la incisura angular, y la externa o mayor, que es aproximadamente 5 veces mas larga que la menor. Entre las dos curvaturas se extienden las caras anterior y posterior. (Dos Santos, 1970).

Anatómicamente esta constituido por 4 regiones:

- a) Cardias
- b) Fundus, fornix o techo
- c) Cuerpo
- d) Píloro o Región antropilórica (Farreras and Rozman, 2009; Gartnes and Hiatt, 2011_b; Roos and Pawlina, 2012).

a) Cardias: es un esfínter ubicado en la parte superior del estómago, rodea al orificio de desembocadura del esófago y además representa uno de los puntos de fijación del estómago.

b) Fundus o techo: es la porción mas alta; esta situado por encima del cardias, en contacto con el hemidiafragma izquierdo, y contiene la cámara de gases.

c) Cuerpo: es la porción más grande del estómago, su límite inferior es el antro.

d) Píloro o región antropilórica: el antro es el vestíbulo del píloro. El píloro por su parte es un esfínter que constituye el límite inferior de fijación del estómago. Este se fija al hígado a través del ligamento hepatoduodenal (Farreras and Rozman, 2009).

Excepto la porción del píloro unido al hígado, el resto del estómago es móvil, por lo tanto, puede adaptarse a su contenido y a las demás vísceras. (Dos Santos, 1970; Farreras and Rozman, 2009).

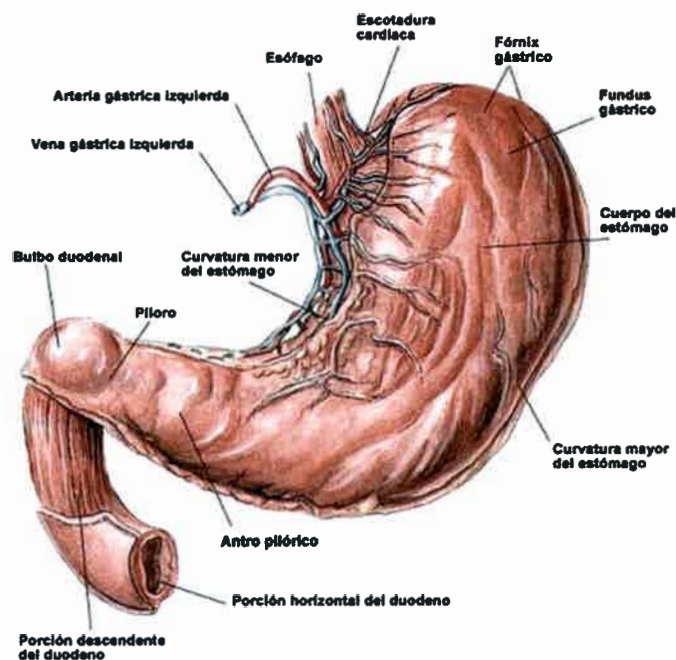


Figura 1: Esquema de las regiones anatómicas del estómago.

Tomado de www.anatomiahumana.ucv.cl/efimodulo23.html

Vascularización

La vascularización gástrica depende del tronco celíaco, el mismo se origina de la aorta abdominal, ramificándose desde la aorta a la altura de la parte superior de la vértebra L1, por debajo del diafragma. La arteria celíaca se divide en: arteria gástrica izquierda, arteria esplénica y arteria hepática común.

La arteria gástrica izquierda irriga el tercio inferior del esófago y la porción superior derecha del estómago.

La arteria gástrica derecha, rama de la arteria hepática, irriga su porción inferior derecha. Al fundus llegan arterias gástricas cortas que son ramas de la esplénica, irrigan la parte superior de la curvatura mayor, mientras que la parte inferior depende de la gastroepiploica derecha, rama de la gastroduodenal, la cual a su vez, procede de la arteria hepática.

La irrigación venosa se realiza a través de la coronaria o gástrica izquierda, la pilórica, la gastroepiploica derecha e izquierda y las venas gástricas cortas (Dos Santos, 1970; Farreras and Rozman, 2009).

Inervación

El aparato digestivo en general esta inervado por el sistema nervioso entérico (SNE). Este último constituye el tercer componente del sistema nervioso autónomo (SNA), el mismo se encuentra organizado en plexos ganglionares y plexos no ganglionares.

Los plexos no ganglionares están constituidos por las diferentes fibras que conectan entre sí a las neuronas ubicadas en la capa subserosa, la muscular profunda y el plexo mucoso.

Los plexos ganglionares están formado por el plexo mientérico o de Auerbach (ubicado entre las capas musculares: circular interna y longitudinal externa) y el submucoso o de Meissner (situado en la submucosa). Ambos poseen neuronas sensoriales y motoras, que, conectadas sinápticamente por microcircuitos controlan la motilidad, el flujo sanguíneo, la secreción y la absorción (Blaser, 1992; Borsntein and Furness, 1992; Costa *et al.*, 1992; Piñol Jimenez y Paniagua Estevez, 2006).

En el estómago las fibras preganglionares provienen del sexto al octavo segmento torácico de la medula espinal y las posganglionares del plexo celíaco. La inervación parasimpática proviene de los nervios vagos derecho e izquierdo. Los vagos conectan con el plexo de Auerbach y de Meissner (Piñol Jimenez y Paniagua Estevez, 2006).

En el sistema nervioso entérico existe una gran variedad de mensajeros químicos en las neuronas, las mismas poseen importantes funciones en la regulación del aparato digestivo: actúan como transmisores directos, como cotransmisores o moduladores de la respuesta excitatoria determinada por otras sustancias neurotransmisoras e influyen en el metabolismo de la célula produciendo en ella un efecto trófico (Costa *et al.*, 1992; Piñol Jimenez y Paniagua Estevez, 2006).

Sistema linfático

El sistema linfático gástrico se origina en los vasos linfáticos de la mucosa. Los linfonodos celíacos constituyen el colector principal de la linfa gástrica y desde allí drena a los linfonodos preaórticos y al conducto torácico.

Estructura histológica

Desde el punto de vista histológico el estómago se divide en 3 regiones, de acuerdo al tipo de glándula que contiene cada una de las mismas:

- Región cardial (cardias)
- Región pilórica (antro)
- Región fúndica (fudus)



Figura 2- Esquema de las regiones histológicas del estómago
Modificado de enciclopedia.us.es/index.php/Estomago

El estómago está constituido, básicamente, por el mismo modelo estructural general de todo el aparato digestivo. Consta de cuatro túnicas fundamentales ellas son:

- Túnica mucosa
- Túnica submucosa
- Túnica muscular
- Túnica serosa

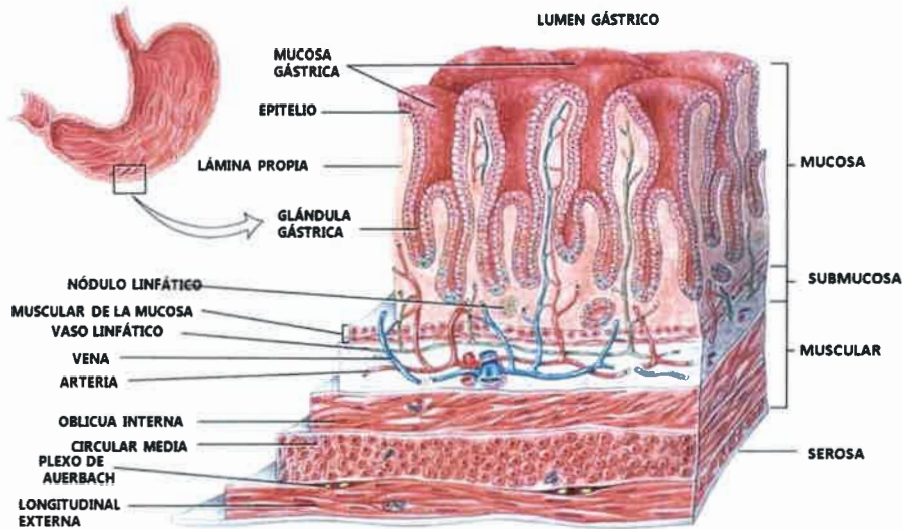


Figura 3: Esquema tridimensional de las tunicas que conforman el estómago.

Tomado y modificado de www.uap.uaz.edu.ar

Túnica mucosa: la membrana mucosa es una membrana gruesa y posee una suave superficie aterciopelada. En estado fresco posee un color rojo anaranjado. Cuando el estómago está vacío y contraído la superficie forma numerosos pliegues denominados arrugas gástricas, estas tienden a desaparecer cuando el estómago está lleno.

Además, posee una red de surcos bajos que divide a la mucosa en su superficie; estas se llaman áreas gástricas convexas.

En cada una de esas áreas el epitelio de la mucosa se invagina formando pequeños embudos, denominados criptas gástricas o favéolas gástricas (Geneser, 2000; Hib, 2003) las glándulas fúndicas desembocan en el fondo de estas fosetas gástricas.

La mucosa está revestida por un epitelio de revestimiento cilíndrico simple. Estas células cilíndricas son llamadas células mucosas superficiales. Cada célula posee una gran dilatación apical llena de gránulos de mucinógeno formando en conjunto una superficie secretora. En los cortes de rutina con hematoxilina-eosina (H/E) aparece vacía debido a que los gránulos de mucinógeno desaparecen, sin embargo, si se fija adecuadamente, los gránulos se tiñen intensamente con azul de toluidina y con las técnicas de PAS.

La secreción mucosa de las células mucosas superficiales se conoce como moco visible causa de su aspecto turbio. Forma una gruesa cubierta viscosa gelificada que se adhiere a la superficie intestinal y protege contra la acción irritante de los componentes del quimo. Además, su elevada concentración en bicarbonato protege al epitelio del contenido ácido del jugo gástrico.

El revestimiento del estómago no cumple una función absorbente importante; se absorbe solo un poco de agua, sales y compuestos químicos liposolubles.

Otro componente de la mucosa es la lámina propia constituida por tejido conectivo, dentro de la misma se encuentran glándulas en este caso llamadas glándulas gástricas que difieren en su estructura de acuerdo al tipo de región del estómago a la que pertenecen, permitiendo, de esa manera, dividir histológicamente al estómago en tres regiones:

- a) Región cardial (cardias), parte más cercana al orificio esofágico, que contiene glándulas cardiales.
- b) Región pilórica: se encuentran en la parte proximal al esfínter pilórico, conteniendo glándulas pilóricas.
- c) Región fúndica: esta situada entre el cardias y el antro pilórico. Las estructuras glandulares que poseen son las glándulas fúndicas o gástricas (Ross and Pawlina, 2012).

Estas tres zonas glandulares no están separadas por límites definidos ya que en las áreas de transición dichas áreas se entremezclan glándulas de distintas categorías.

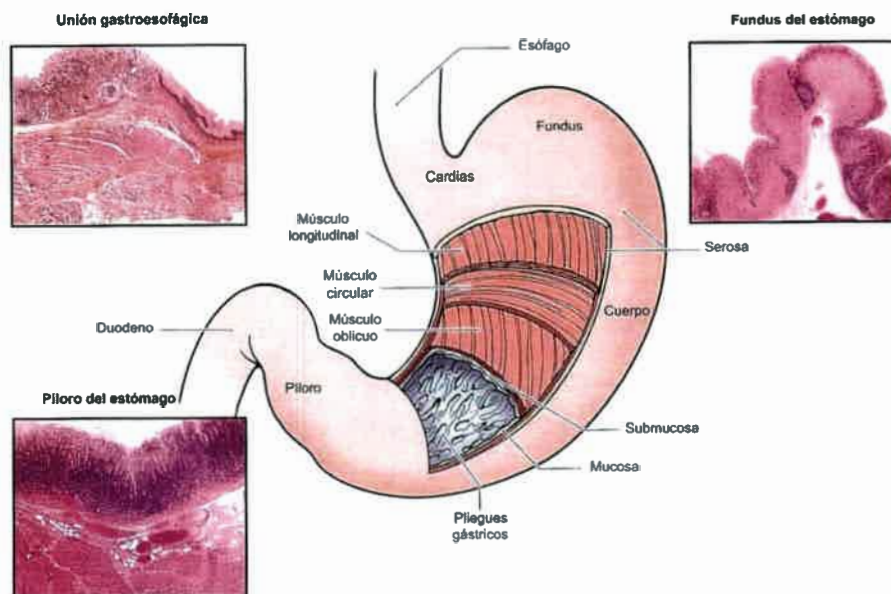


Figura 4: Esquema de las diferentes regiones que conforman histológicamente al estómago. Tinción H/E. Tomado de Cui D *et al.*, 2011.

Glándulas fúndicas:

Las glándulas fúndicas gástricas o corpofúndicas ocupan casi toda la mucosa, excepto las regiones que corresponden al cardias y antro pilórico.

Las glándulas gástricas son glándulas tubulares simples ramificadas que se extienden desde el fondo de las favéolas gástricas hasta la muscular de la mucosa. (Gartnes and Hiatt, 2011_a; Ross and Pawlina, 2012).

Cada túbulo glandular está compuesto por 3 secciones:

Una parte principal, más profunda llamada base o fondo (Geneser, 2000). La base suele dividirse en dos o tres ramas que se enrollan cerca de la muscular de la mucosa, una parte media llamada cuello y un istmo o parte superior. Por medio del istmo las glándulas desembocan en el fondo de las criptas gástricas, a menudo varias glándulas en cada una de ellas (Geneser, 2000; Hib, 2003).

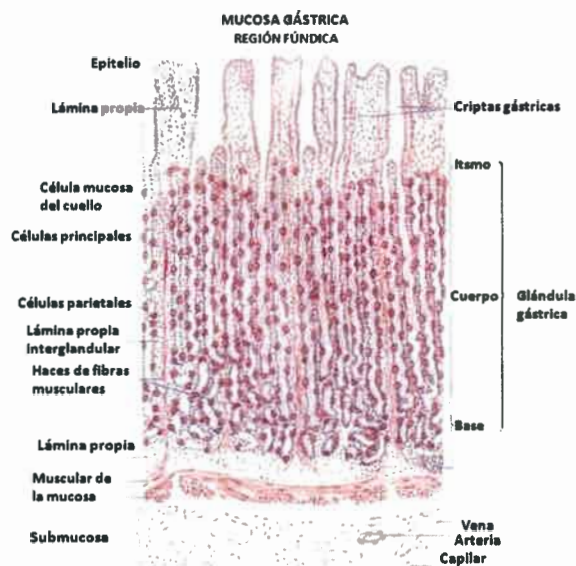


Figura 5: Esquema de la región fúndica del estómago. Reproducción de un corte transversal de la misma. En la mucosa se observan las áreas gástricas, las criptas, el epitelio cilíndrico simple que la revisten. Las glándulas corpofúndicas que atraviesan la lámina propia. En el istmo, cuerpo y cuello se distinguen los tres tipos celulares: células mucosas del cuello, células parietales y células principales. Finalmente las capas musculares correspondientes a la muscular de la mucosa y la túnica submucosa. H/E. Adaptado de Hib *et al.*, 2003.

Las glándulas corpofúndicas están compuestas por 5 tipos celulares:

- Células mucosas del cuello
- Células principales o adelomorfas

- c) Células parietales o delomorfos o células oxínticas
- d) Células enteroendocrinas
- e) Células indiferenciadas

a) Células mucosas del cuello:

Están situadas en la región del cuello de la glándula fúndica. Entre estas también suelen encontrarse células parietales. Las células mucosas del cuello secretan un moco soluble (líquido) a diferencia del moco insoluble, viscoso y turbio producido por las células mucosas superficiales. La liberación de los gránulos de mucinógeno esta inducida por estimulación vagal (Ross and Pawlina, 2012). Estas son células cilíndricas bajas con un núcleo basal, que suele ser aplanado. En los preparados teñidos con H/E el citoplasma aparece claro, pero con la tinción de PAS en el citoplasma apical se puede apreciar la presencia de numerosos gránulos coloreados moderadamente. Al microscopio electrónico se observa un número moderado de gránulos densos en la porción apical, además de un aparato de Golgi bien desarrollado (Geneser, 2000).

b) Células principales o adelomorfos:

Son células secretoras de proteínas típicas. Poseen un abundante retículo endoplásmico rugoso lo que imparte a esta región una afinidad tintorial basófila, mientras que el citoplasma apical es eosinófilo a causa de los gránulos de secreción, llamados también gránulos de zimógeno porque contienen precursores enzimáticos, aunque esta coloración puede ser leve o no visible cuando los gránulos de secreción no han sido conservados adecuadamente. Las células principales secretan pepsinógeno y una lipasa débil. Al contacto con el jugo gástrico ácido, el pepsinógeno se convierte en pepsina. Estas células son más abundantes hacia la base de la glándula (Geneser, 2000).

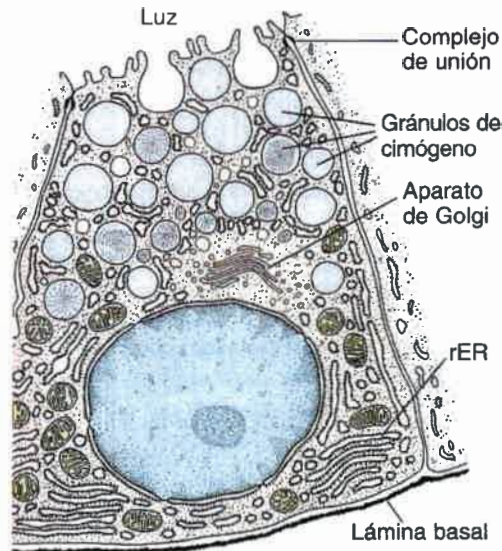


Figura 6: Diagrama de una célula principal. La presencia de un rER muy desarrollado produce una intensa basofilia que se observa al microscopio óptico. La presencia de gránulos de zimógeno hace que la parte apical de la célula se tiña más débilmente. Tomado de Ross and Pawlina, 2012.

c) Células parietales, delomorfas u oxínticas:

Se encuentran en el cuello de la glándula entre las células mucosas del cuello y en la parte más profunda de la glándula. Son células grandes a veces binucleadas y de forma más o menos triangular, con su base apoyada en la lámina basal y el vértice dispuesto hacia la luz glandular. El núcleo es esférico y el citoplasma se tiñe con eosina y otros colorantes ácidos. Son fácilmente distinguibles al microscopio óptico; cuando son examinadas al microscopio electrónico se observan abundantes mitocondrias y un sistema de canaliculos intracelulares que se comunican con la luz de la glándula (Geneser, 2000).

Desde la superficie de los canaliculos se proyectan una gran cantidad de microvellosidades y en el citoplasma contiguo a estos hay un sistema membranoso túbulo vesicular.

Es una célula de secreción activa, ella es la encargada de producir ácido clorhídrico (HCl), en la luz de los canaliculos intracelulares.

Las células parietales poseen 3 tipos diferentes de receptores de membrana para sustancias que activan la secreción de HCl: receptores de gastrina, receptores histamínicos H_2 y receptores acetilcolínicos M_3 . El principal mecanismo para la estimulación de la célula parietal es la activación del receptor gastrínico por la gastrina (Lentz, 1997).

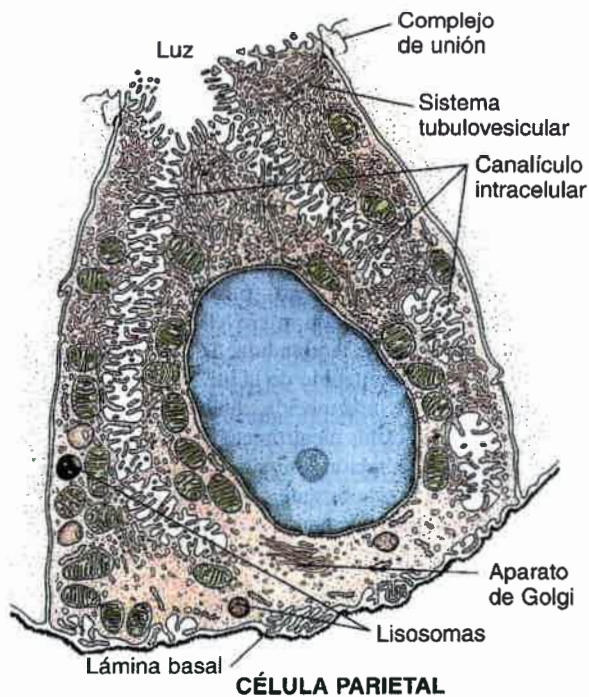


Figura 7: Diagrama de una célula parietal. El citoplasma se tiñe con eosina debido a la abundante membrana que comprende los canaliculos intracelulares, el sistema tubulovesicular y las mitocondrias y la relativa escasez de ribosomas. Basado en Ross and Pawlina, 2012.

d) Células enteroendocrinas

Se encuentran en todos los niveles de la glándula fúndica prevalecen mas en la base. Son células pequeñas que están apoyadas sobre la lámina basal pero no siempre alcanzan la luz. Poseen pequeños gránulos de secreción, los mismos suelen desaparecer durante las técnicas histológicas de rutina, y se logran ver con el microscopio electrónico, los mismos se encuentran limitados por una membrana en todo el citoplasma. Son células muy difíciles de identificar debido a su reducido tamaño. Antiguamente se las llamaba células enterocromafines por su capacidad de tinción con sales de plata y cromo (Ito and Winchester, 1963). Según su forma pueden clasificarse en abiertas y cerradas. Las células abiertas alcanzan la luz glandular a través de un polo sensorial lleno de microvellosidades, mientras que las cerradas no llegan hasta la luz. Ambas poseen gránulos de secreción que son eliminados por exocitosis en la región basal. Las células enteroendocrinas de las glándulas corpofúndicas se clasifican como células G, células D, células D₁ y células EC. Sus productos de secreción son: gastrina, somatostatina, péptido intestinal vasoactivo (VIP) y serotonina respectivamente (Roos and Pawlina, 2012).

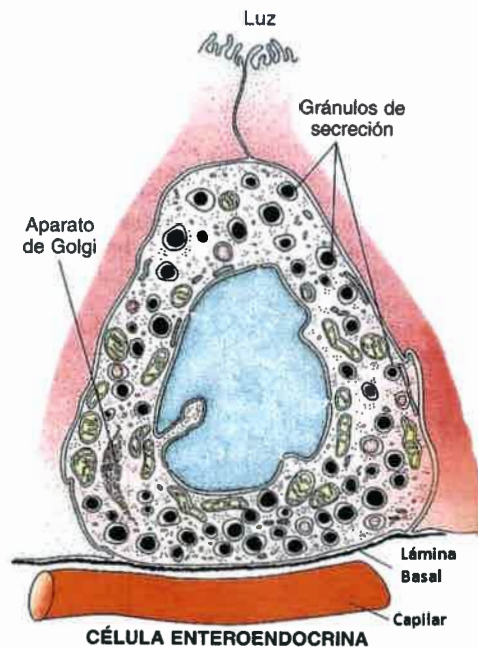


Figura 8: Diagrama de una célula enteroendocrina. En el dibujo se observa que la célula no llega a la superficie libre del epitelio. Los gránulos de secreción suelen desaparecer durante la técnica histológica convencional. El núcleo está rodeado por una pequeña cantidad de citoplasma. Tomado y adaptado de Ross and Pawlina, 2012.

e) Células indiferenciadas

Se localizan en la porción del istmo de las glándulas. Son cilíndricas o cúbicas sin gránulos u otros componentes específicos en el citoplasma. Se encuentran en número reducido, pero pueden sufrir mitosis y producir células que se diferencian a los otros tipos celulares de la mucosa del estómago. Las células recién diferenciadas migran desde la porción del istmo hacia la superficie o a la profundidad de la glándula mientras se terminan de diferenciar a células totalmente desarrolladas (Geneser, 2000).

Glándulas cardiales

Las glándulas cardiales están limitadas a una pequeña porción del estómago, se encuentran alrededor de la desembocadura del esófago y son glándulas tubulares mucosas. Están compuestas principalmente por células secretoras de moco con ocasionales células enteroendocrinas entremezcladas.

Las células mucosecretoras poseen un núcleo basal aplanado y el citoplasma apical típicamente repleto de gránulos de mucinógeno. Su secreción combinada con la de las glándulas esofágicas cardiales, contribuyen al jugo gástrico y también ayudan a proteger al epitelio esofágico contra el reflujo ácido del estómago (Geneser, 2000; Hib, 2003; Ross and Pawlina, 2012).

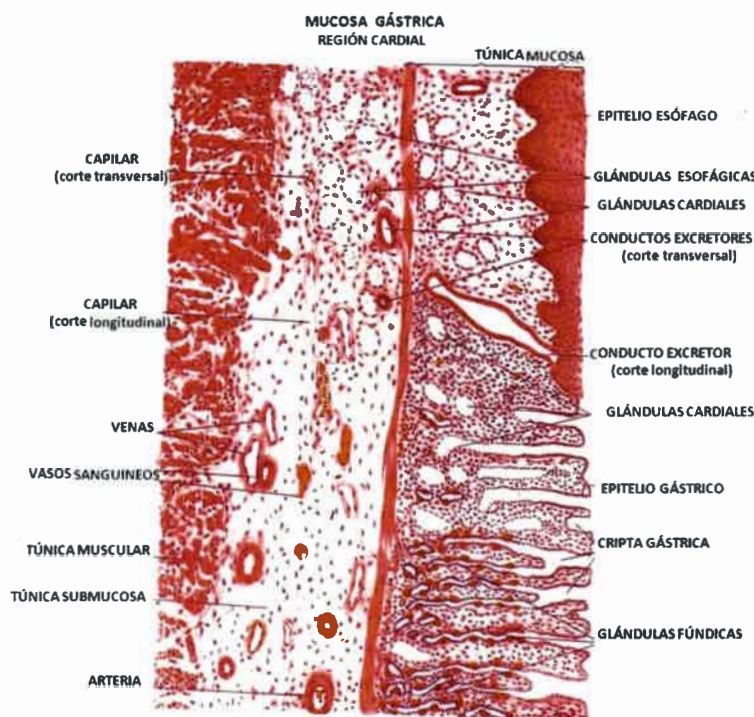


Figura 9: Esquema de la región cardial. Reproducción de un corte longitudinal de la pared inferior del esófago y la pared superior del estómago (cardias y fondo). Tomado y adaptado de Hib, 2003.

Glándulas pilóricas

Están situadas en el antro pilórico (la parte del estómago entre el cuerpo y el píloro) son glándulas tubulares, enrolladas y ramificadas. La luz es relativamente amplia y sus células secretoras tienen un aspecto semejante al de las células mucosas superficiales por lo que su secreción es bastante viscosa. Entre las células del epitelio glandular hay células enteroendocrinas y a veces células parietales (Ross and Pawlina, 2012).

Lámina propia

La lámina propia está compuesta, además de las glándulas nombradas anteriormente, por tejido conectivo reticular laxo muy rico en células principalmente fibroblastos, aunque también se encuentran células del sistema inmune como linfocitos, plasmocitos, macrófagos y algunos eosinófilos. Durante un proceso inflamatorio los neutrófilos aparecen en primera instancia. En la

porción pilórica, en la lámina propia suelen encontrarse linfonódulos solitarios. (Ross and Pawlina, 2012).

Muscular de la mucosa

Es muy desarrollada y compuesta por fibras musculares lisas en donde se distinguen dos capas, una circular interna y una longitudinal externa.

Túnica submucosa

Está compuesta por tejido conectivo con abundantes vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. En ella se encuentra el plexo nervioso de Meissner (Hib, 2003).

Túnica muscular

Se compone de 3 capas de músculo liso:

- a) oblicua interna
- b) circular media
- c) longitudinal externa

La circular media se hace más gruesa cerca del píloro donde forma un grueso músculo circular de cierre, el esfínter pilórico. Entre las capas musculares longitudinal y circular se encuentra el plexo nervioso de Auerbach (Geneser, 2000; Hib, 2003).

Túnica serosa

También llamada peritoneo, recubre todo el estómago salvo una pequeña zona en la parte posterior, cerca del cardias. Esta compuesta por mesotelio (epitelio plano simple) y tejido conectivo.

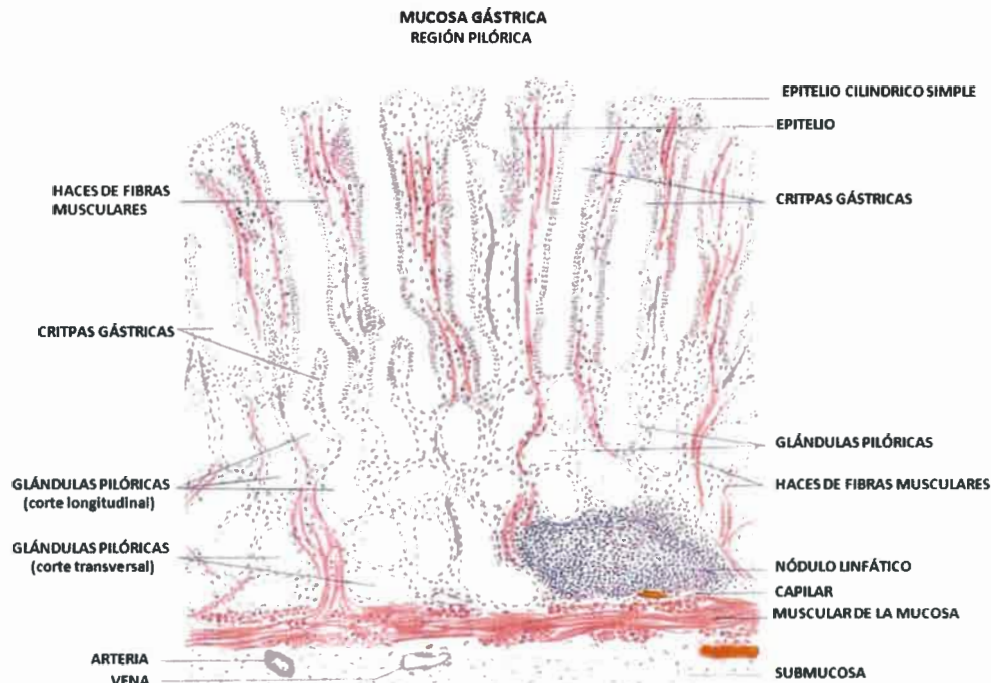


Figura 10: Esquema de la región pilórica. Corte longitudinal de la mucosa de la región pilórica, en la misma se observan criptas gástricas mas profundas y sus glándulas poseen células mucosas casi exclusivamente. Tomado y modificado de Hib, 2003.

1.4 ESTÓMAGO DEL CERDO

Descripción anatómica

El estómago del cerdo posee forma de J con un divertículo invertido hacia la izquierda del orificio esofágico. Es un órgano voluminoso, su capacidad media es aproximadamente de 5,7 a 8 litros. Se ubica generalmente a la izquierda del plano medial con el eje mayor en dirección transversal.

Cuando esta repleto, su curvatura mayor se extiende hacia atrás sobre el suelo del abdomen, sólo su porción pilórica queda topografiada hacia la derecha (Sisson and Grossman, 1969).

Este órgano presenta dos caras, una derecha e izquierda respectivamente, y dos bordes, dorsal y ventral. Los mismos están unidos a las paredes abdominales por medio de los mesenterios dorsal y ventral.

Además presenta dos curvaturas: una curvatura mayor y una curvatura menor (Vega González, 1974). La curvatura mayor que se relaciona con el diafragma, bazo, hígado y suelo del abdomen, la posición del hígado presiona al estómago provocando la inclinación del mismo, de esta manera, la región esofágica queda a la izquierda y la región gastrointestinal hacia la derecha. En la

curvatura mayor (ventral) se inserta el omento mayor, o serosa que lo fija al techo del abdomen. (Vega González, 1974).

En su curvatura menor (dorsal) se dispone el omento menor que fija el estómago y la porción craneal del duodeno a la cara visceral del hígado (ligamentos hepatogástrico y hepatoduodenal, respectivamente).

Esta especie posee un estómago simple, aunque provisto de un divertículo que se encuentra en la parte superior del fondo y cuyo extremo se orienta caudoventralmente. Dicho divertículo está revestido casi en su totalidad de mucosa glandular. Casi toda la mucosa gástrica es glandular, exceptuando una estrecha banda cercana al cardias, la cual ofrece un color blanquecino y es de enorme parecido a la mucosa del esófago; dicha mucosa también reviste a una pequeña zona del divertículo (Dyce *et al.*, 1991). La presencia de los diferentes tipos de glándulas cardiales, gástricas y pilóricas le confieren a la mucosa una coloración que difiere a la de la zona aglandular. En el píloro es característica la presencia de una protuberancia formada por músculo liso y tejido adiposo, denominado *torus pyloricus*, que disminuye el orificio del píloro.

Los linfonódulos gástricos se localizan junto al cardias y en la curvatura menor del estómago. Reciben aferencias de buena parte del estómago, del extremo caudal del esófago, diafragma y páncreas.

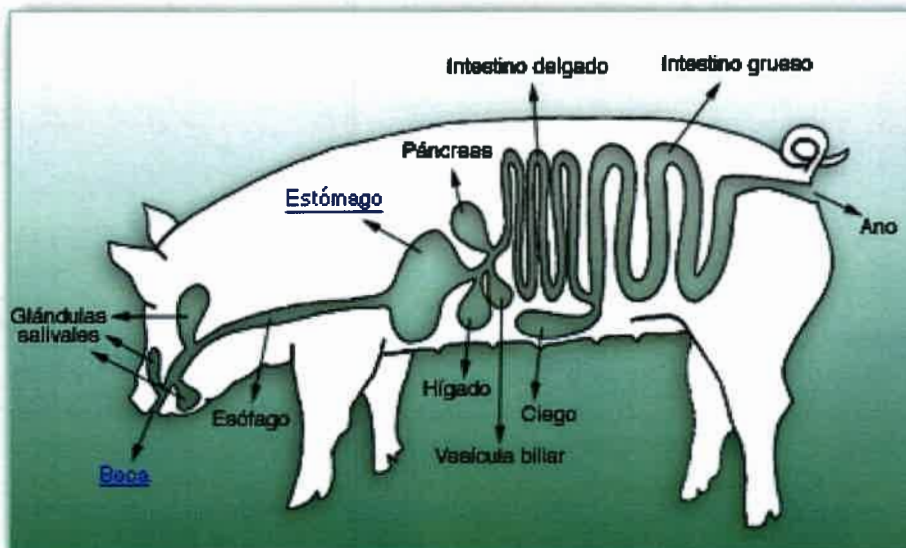


Figura 11: Esquema ubicación anatómica del estómago de cerdo.

La vascularización arterial del estómago, como en el hombre, es múltiple: la arteria principal de la curvatura mayor la gastroepiploica derecha rama que da la arteria gastroduodenal junto al píloro, y varias arterias provenientes del bazo a modo de vasos cortos. La curvatura menor se encuentra vascularizada principalmente en su cara anterior, por una rama gástrica de la arteria hepática izquierda y su cara posterior, por una rama directa del tronco celíaco y por la arteria

diverticular, que proviene de la esplénica, llegando al estómago desde el borde superior del cuerpo del páncreas (Balén *et al.*, 2000).

Por otra parte, el drenaje venoso de cada una de las zonas del estómago suele ir paralelo a las arterias mencionadas, y es tributaria del sistema portal. El esófago abdominal arterializa también el cardias y parte del fundus gástrico (Balén *et al.*, 2000).

Estructura histológica

En el cerdo se describen dos zonas o regiones: a) región aglandular y b) glandular. La unión de ambas zonas no es gradual sino es brusca (Vilches *et al.*, 2005).

Túnica mucosa:

Las dos zonas difieren en su estructura histológica:

a) zona aglandular o esofágica: presenta epitelio estratificado plano y no se observan glándulas.

b) zona glandular: presenta un epitelio cilíndrico simple, que al invaginarse forma las glándulas, que caracterizan a cada región de la mucosa glandular. Ese epitelio descansa mediante su lámina basal en una lámina propia de tejido conjuntivo laxo que lo sostiene y lo nutre. Además presenta una muscular de la mucosa bien desarrollada. La mucosa muestra amplios pliegues que se aplanan o distienden cuando el estómago se llena. El epitelio al invaginarse forma las fosetas o criptas gástricas, éstas se continúan con las glándulas. Las células prismáticas mucosas del epitelio superficial segregan una sustancia protectora que impide la autólisis de la mucosa, las células del epitelio de revestimiento presentan un ritmo de reemplazo de entre 3 y 4 días, ese reemplazo se da a partir de las criptas o fosetas gástricas donde se puede observar una gran cantidad de células con capacidad proliferativa. Las glándulas allí presentes ocupan la mayor parte de la lámina propia y llegan hasta la muscular de la mucosa en forma muy ramificadas, entre ellas sólo se observan algunas células y fibras del tejido conectivo (Caceci, 2006).

La región glandular del cerdo esta dividida en 3 regiones de acuerdo al tipo de glándulas que se encuentran en la mucosa gástrica, al igual que el estómago de los humanos:

a) Región cardial: es extensa y recubre casi la mitad del estómago, incluyendo al *diverticulum ventriculi*, en esta zona gástrica el epitelio cilíndrico simple se invagina y forma las glándulas cardiales, estructura que se sostiene en una lámina propia de tejido conjuntivo laxo y llegan hasta la muscular de la mucosa. Estas glándulas son morfológicamente de tipo tubulosas ramificadas y glomerulosas, vierten su secreción a nivel de las criptas gástricas. El cuerpo de las glándulas es corto y su luz es amplia. Su secreción es de tipo mucoso (Trautmann y Tzy. Jos., 1970).

b) Región fúndica: ocupa un cuarto de extensión, allí el epitelio cilíndrico simple se invagina y desarrolla las glándulas fúndicas, las mismas son tubulares simples ramificadas que llegan hasta la muscular de la mucosa y se muestran tan unidas que apenas deja advertir el tejido conjuntivo laxo de la lámina propia. Las glándulas fúndicas son morfológicamente de tipo tubulares rectas y ramificadas, llegan hasta la muscular de la mucosa. Las glándulas presentan las siguientes partes: cuello, un cuerpo largo y un extremo ciego ligeramente dilatado, llamado *fundus* de la glándula. El epitelio glandular está formado por 4 tipos de células: células mucosas del cuello de la glándula, células principales, células parietales y enteroendocrinas que no poseen diferencias importantes con las mismas células del humano (Caceci, 2006).

c) Región pilórica: es pequeña en extensión, sus glándulas aunque presentan la misma morfología que las anteriores son más cortas. Las criptas gástricas son mucho más profundas comparadas con las de las glándulas precedentes. Presentan dos tipos celulares: las mucosas y las enteroendocrinas. En la región píloro-duodenal, pueden observarse a este nivel las glándulas de la submucosa intestinal o de Brunner, que se proyectan hacia la submucosa gástrica. Además, la capa media del tejido muscular se engrosa, formando el esfínter pilórico que, rodea la porción caudal del estómago y determina que la submucosa y la mucosa sobresalgan hacia la luz. En el cerdo esta protuberancia denominada *torus pyloricus* es muy pronunciada.

Túnica submucosa: es aglandular, formada por tejido conjuntivo laxo, donde se localizan vasos sanguíneos, linfáticos y el plexo nervioso de Meissner. A esta túnica por su escaso grosor también se le denomina tela submucosa.

Túnica muscular: está formada por musculatura lisa, dispuesta en tres capas con diferentes direcciones: interna oblicua (esta capa sólo se encuentra en determinadas áreas), circular media y longitudinal externa; el plexo mioentérico o de Auerbach se sitúa entre las capas media y externa pero sus fibras se irradian a la capa interna y se relaciona también con el plexo nervioso submucoso. Los movimientos de esta capa favorecen la unión de los alimentos con el jugo gástrico y el tránsito hacia el duodeno.

Túnica serosa: está formada por un mesotelio y tejido conectivo laxo, donde se destaca la presencia de fibras elásticas necesarias para la distensión de este órgano (Dellmann and Brown, 1980).

1.5 *HELICOBACTER SPP*

Helicobacter spp es un microorganismo Gram negativo, curvo, espiralado, que mide aproximadamente 3,5 x 0,5 micrómetros, posee numerosos flagelos en uno de sus polos (de 5 a 6) lo que lo hace altamente móvil (Harris *et al.*, 1996; Burroni *et al.*, 1998; Leite e Castro Chavez, 2002).

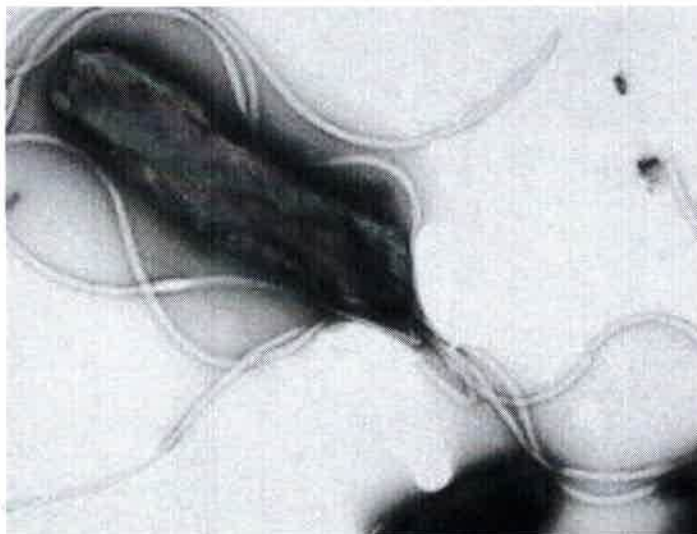


Figura 12: Microscopía electrónica de *Helicobacter pylori*.
Tomado de Odriozola V. (2011).

Los flagelos aumentan su capacidad de movimiento, para poder atravesar la viscosa capa de moco y tomar contacto con la superficie epitelial del estómago (Marshall *et al.*, 1994; Warren *et al.*, 1997; Leite e Castro Chavez, 2002; Lennart, 2007).

Es un microorganismo de crecimiento lento, se necesitan de 5 a 7 días para poder apreciar las colonias en medio salino (Blaser, 1992; Harris *et al.*, 1996) y para su crecimiento en laboratorio se requieren condiciones de microaerofilia (10% de CO₂) y medios artificiales ricos en nutrientes como peptona, triptona y, extracto de levadura, y sales como cloruro de sodio y bisulfito de sodio (Magalhaes Queiroz, 1995), suplementados con sangre de caballo, polienriquecimiento con, suero fetal bovino o ambos.

Esta bacteria produce diversas sustancias que le permiten adaptarse al ambiente ácido del estómago para anidar y vivir en la superficie de las células epiteliales gástricas (Marshall, 1994; Magalhaes Queiroz, 1995).

El *Helicobacter* sintetiza la enzima ureasa que cataliza la hidrólisis de la urea del jugo gástrico, formando bicarbonato y amonio. El bicarbonato aumenta el pH alrededor de la bacteria protegiéndola del medio ácido. El amonio puede producir directamente daño celular, también se ha reportado que aumenta la retrodifusión de los iones H⁺, e inactiva el complemento (Marshall, 1994; Magalhaes Queiroz, 1995). El amonio actúa como un agente neutralizante del ácido clorhídrico lo que ocasiona aclorhidria y un pH gástrico neutro, que le permite al *Helicobacter* moverse rápidamente y atravesar la capa mucosa para llegar al epitelio (Mai *et al.*, 1992; Atherton

et al., 1996; Atherton *et al.*, 1997; Atherton *et al.*, 1999). Estudios en cerdos gnotobiontes (Eaton *et al.*, 1992, Eaton *et al.*, 1997; Marshall, *et al.*, 1998) indican que cepas mutantes de *Helicobacter pylori* que son incapaces de producir ureasa, pierden la habilidad de colonizar el estómago, lo que sugiere que la producción de ureasa participa en la colonización de la mucosa gástrica y la supervivencia del microorganismo.

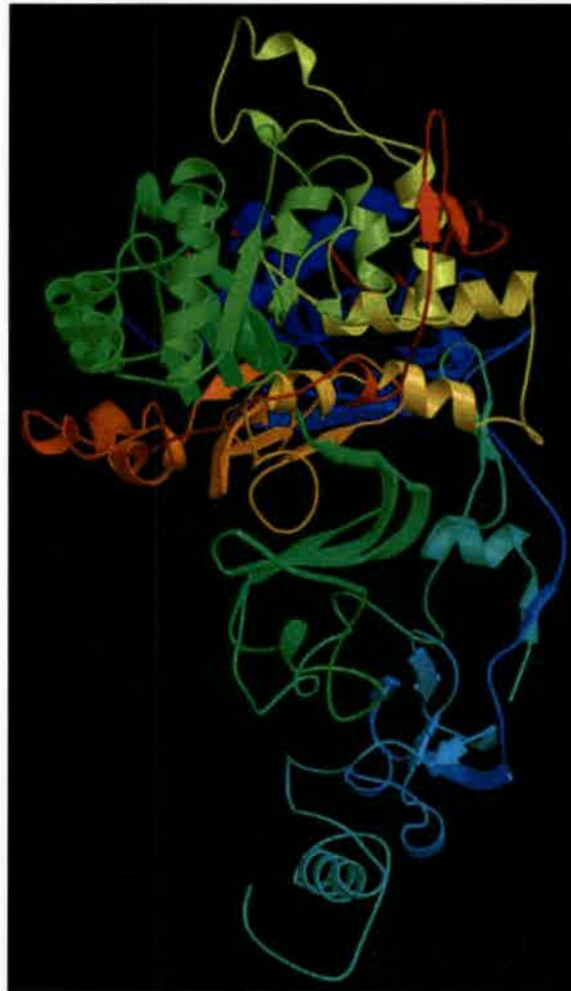


Figura 13: Modelo molecular de la enzima ureasa de *Helicobacter pylori*.

Disponible:<http://www.resb.org/pdb/citing/html/>
Protein Data Base.

Esta bacteria, además posee varios elementos que le van a permitir unirse a determinados receptores específicos de la superficie celular gástrica. Algunos de esos receptores son la fosfatidil etanolamina y la N-acetil neuroaminil lactosa. Los factores de adherencia o adhesinas son proteínas presentes en la pared exterior del bacilo que le permite alojarse en el endotelio gástrico por unión al factor XII. Las adhesinas del *Helicobacter* están constituidas por una hemoaglutinina radiante desde la superficie de la bacteria con estructura tipo afimbrial y un diámetro de 2 nanómetros perteneciente al grupo de los sialo conjugados. La adhesión es ventajosa y le permite a la bacteria adherirse fuertemente al epitelio a través de los receptores anteriormente nombrados y protegerse así del ácido clorhídrico (Cárdenas *et al.*, 2007).

Hasta el presente se han identificado más de 13 especies incluidas en el género *Helicobacter*, la mayoría de las cuales son colonizadoras eficientes del estómago de los mamíferos, las mismas pueden causar lesiones de manera similar tanto en humanos como en animales (Fox *et al.*, 1997; Skirrow M, 1999).

Tabla I: Bacteria del género *Helicobacter* y sus asociaciones. Tomado y adaptado de Skirrow M, 1999.

Especies	Flagelos		Huésped habitual	Asociación
	Número	Tipo ^a		
Gástricas				
<i>bH. pylori</i> (especie tipo)	4-8	Up/Bp	Hombre	Gastritis crónica activa; fuerte asociación con úlcera péptica y cáncer gástrico
<i>H. mustelae</i> <i>H. nemestrinae</i> <i>H. acinonyx</i>	4-8 4-8 4-8	Bp,L Up/Bp Up/Bp	Hurones Macaco Leopardo	No patología, a veces gastritis y ulceración No patología Gastritis
<i>H. felis</i> <i>H. bizzozeronii</i> <i>H. salomonis</i> ^b <i>H. heilmannii</i>	14-20 10-20 5-7 ≥ 9	Bp,F Bp Bp Bp	Gato, perro Perro Perro Gato y perro Cerdos	No patología/a veces gastritis No patología No patología Gastritis crónica activa gastritis en gatos y perros Gastritis crónica activa
Intestinales				
<i>bH. cinaedi</i> <i>bH. fennelliae</i> <i>bH. canis</i> <i>bH. westmeadii</i>	1-2 1-2 2 1	Up/Bp Up/BP Bp Up	Hámster Perro	No patología en hámster; proctocolitis en hombres homosexuales Proctocolitis en hombres homosexuales ¿Enteritis, hepatitis? Aislado de un niño Bacteriemia en hombres con SIDA
<i>bH. pullorum</i> <i>H. pametensis</i>	1 2	Up (noE) Bp	Pollo Gaviotas, cerdo	¿Hepatitis vibriónica?
<i>H. cholecystus</i> <i>H. hepaticus</i> <i>H. bilis</i> <i>H. rodentium</i> <i>H. muridarum</i> <i>H. trogontum</i> ^b " <i>Flexispira rappini</i> "	1 2 3-14 2 10-14 5-7 10-20	Up Bp Bp,F Bp (noE) Bp,F Bp,F Bp,F	Hámster Ratones Ratones Ratones Roedores Rata Ovejas, ratones	Colangiofibrosis, pancreatitis Hepatitis; coloniza en ciego y colon Hepatitis; coloniza en ciego y colon No patología, puede colonizar en estómago y causar gastritis en roedores viejos No patología conocida Abortos ovinos; ha sido aislado de pacientes con diarrea crónica
LEYENDA:				
^a Up: unipolar, Bp: bipolar, L: lateral, F: fibrillas periplásmicas, (noE): no envainados				
^b infecciones en el hombre				

TABLA II. *Helicobacter spp.* colonizadoras de naturales de los estómagos de los animales y su significado patológico para los humanos. Tomado y adaptado de Haesebrouk et al., 2009.

<i>Helicobacter</i> especies	Anfitrión Natural (prevalencia,%)	Asociado con enfermedad gástrica en humanos
<i>H. suis</i>	Cerdos (60-80 en cerdos de abasto), macaco (NA ^b), el mono mandril (NA)	Sí
<i>H. felis</i>	Perro (47), gato (63), conejo (2-9), el guepardo (NA ^c)	Sí
<i>H. bizzozeronii</i>	Perro (70), gato (35)	Sí
<i>H. Salomonis</i>	Perro (9), cat (2), conejo (0-4)	Sí
" <i>Candidatus Helicobacter heilmannii</i> "	Perro (20-100), gato (20-100), felinos salvajes (NA ^c), primates no humanos (66)	Sí
<i>H. baculiformis</i>	Gato (NA)	No
<i>H. cynogastricus</i>	Perro (NA)	No
" <i>Candidatus Helicobacter bovis</i> "	Ganado (NA)	Sí

<i>Helicobacter</i> especies	Anfitrión Natural (prevalencia,%)	Asociado con enfermedad gástrica en humanos
<i>H. mustelae</i>	Ferret (0-100)	No
<i>H. Aurati</i>	Hámster sirio (50-100)	No
<i>H. nemestrinae</i> ^{un}	Macaco (NA)	No
<i>H. acinonychis</i>	Guepardo (bajo), el tigre (NA)	No
<i>H. cetorum</i>	Ballenas (NA), delfines (NA)	No
<i>H. muridarum</i>	Los ratones (0-62)	No

Referencias: ^{un} sinónimo heterotípica tarde de *H. pylori* - ^b ND: no disponible.

La bacteria posee lipopolisacáridos de superficie (LPS) que se encargan de retrasar la respuesta inflamatoria y de causar daño a las células mucosas (Marshall^a, 1994; Magalhaes Queiroz, 1995; Frisanche *et al.*, 1996).

La infección por *Helicobacter spp* induce a la expresión de la síntesis del óxido nítrico que actúa sobre los radicales superóxidos formando metabolitos citotóxicos y dañando la mucosa gástrica, esto provoca un daño tisular directo sobre la mucosa gástrica. Esta citotoxicidad está asociada a la formación de vacuolas en la célula epitelial gastrointestinal y ulceraciones superficiales (Megraud and Lamouliatte, 1992; Lopez y col., 2006; Cárdenas *et al.*, 2007).

El *Helicobacter* expresa una proteína (Hsp 60) que pertenece a la familia de proteínas del shock térmico, estas también provocan daño tisular (Magalhaes Queiroz, 1995) asociada a procesos apoptóticos.

Además, este microorganismo forma proteasas y lipasas que disminuyen la viscosidad del moco gástrico, la fosfolipasa A₂ disminuye la hidrofobicidad de la membrana celular del epitelio, mientras que la catalasa y la superóxido dismutasa protegen al *Helicobacter* de la respuesta inflamatoria (Hui *et al.*, 1991; Konoshi *et al.*, 1992). La bacteria deprime la concentración local de ácido ascórbico, lo que disminuye la proteína antioxidante. Los radicales de oxígeno liberados por la respuesta inflamatoria al reaccionar con otras sustancias podrían generar metabolitos tóxicos para la célula epitelial (Marshall^a, 1994). Además libera una proteína quimiotáctica de neutrófilos que atrae a los mediadores de la inflamación promoviendo la activación de neutrófilos, la activación de monocitos y macrófagos, la producción de leucotrienos, la aparición de fenómenos autoinmunes, infiltración y la degranulación de eosinófilos. La bacteria es capaz de interrumpir la maduración de los fagosomas de los macrófagos, modula e interfiere con las funciones inmunológicas de los linfocitos T. La acción inflamatoria sobre el epitelio gástrico disminuye la cantidad de células enteroendocrinas D que sintetizan somatostatina, inhibidor natural de las células G productoras de gastrina (Eaton *et al.*, 1997) lo que provoca un aumento de gastrina incrementando de esta manera la secreción del jugo gástrico (Cárdenas *et al.*, 2007) y por ende aumenta la secreción de ácido clorhídrico, el cual provoca este desbalance entre factores agresivos, en este caso están aumentados, y defensivos que se encuentran disminuidos, esta pérdida de la homeostasis local puede generar una lesión ulcerada (Mazell *et al.*, 1991; Frisanche, 1996).

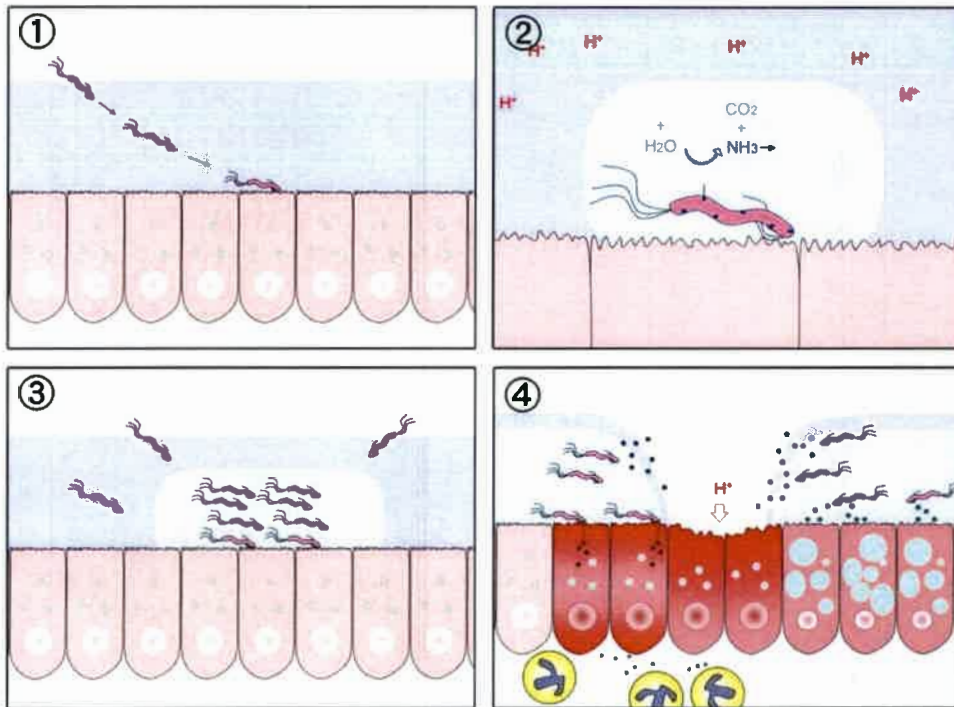


Figura 14: Esquema infección por *Helicobacter pylori*. 1) *Helicobacter* penetra la capa mucosa del estómago y se adhiere a la superficie de la mucosa epitelial gástrica. 2) A partir de la urea el *H.* produce amoníaco. 3) El *H.* migra y prolifera al foco infeccioso. 4) Se desarrolla una úlcera gástrica con destrucción de la mucosa, inflamación y muerte celular.

Tomando y modificado de www.es.prmob.net.html

1.6 GASTRITIS

La gastritis en términos generales, corresponde a la inflamación de la mucosa gástrica. No resulta fácil clasificar los diferentes tipos de gastritis. Clásicamente se había utilizado una clasificación que las dividía en: gastritis tipo A (atrófica, predominantemente en el cuerpo y a menudo con componente inmunológico), gastritis tipo B (superficial predominantemente en el antro) y tipo C (de origen químico). En el año 1990 se propuso la clasificación denominada Sistema Sydney, que engloba criterios endoscópicos, histológicos y etiológicos. En 1994 esta clasificación fue revisada y es allí cuando se aconseja incluir biopsias de la incisura gástrica, lugar donde suelen ser más intensos los fenómenos inflamatorios y la atrofia.

Con el uso de este sistema las gastritis quedaron clasificadas en agudas, crónicas y formas específicas de gastritis, dividiéndose a su vez las gastritis crónicas en atróficas y no atróficas. De todas formas los nuevos conocimientos sobre la patogenia de las gastritis, principalmente las provocadas por *Helicobacter spp*, están obligando a revisar constantemente estos conceptos y terminología (Farreras and Rozman, 2009).

Las diferencias entre los diversos tipos de gastritis están relacionadas a los diferentes tipos de mucosa que presenta el estómago, la mucosa fúndica que ocupa el cuerpo y el fundus y la mucosa pilórica que ocupa la zona antral y pilórica. (Valdivia Roldán, 2011).

Gastritis aguda

Las Gastritis Agudas se caracteriza por un infiltrado inflamatorio que es predominantemente neutrofilico y es usualmente transitorio en su naturaleza, puede acompañarse de hemorragia de la mucosa, erosiones y si las lesiones son muy severas asociarse a sangrado (Valdivia Roldán, 2011).

Existen gastritis agudas catarrales secundarias a infecciones virales o bacterianas generales, en tales casos el compromiso gástrico no es lo más importante de la enfermedad (Durarte, 2010).

Gastritis aguda erosiva o ulcerada

Este tipo de gastritis se observa principalmente en dos situaciones: secundarias a cuadros patológicos graves con repercusiones multiorgánicas tales como, estrés, shock, sepsis, lesiones graves del sistema nervioso central o secundarias a ingestión de alcohol, ácido acetil salicílico, anti-inflamatorios no esteroideos.

La mucosa gástrica se presenta hiperémica, edematosa con petequias dispersas, erosiones e incluso úlceras. Generalmente ocurre hipersecreción de ácido clorhídrico, modificaciones microcirculatorias inducidas por el shock o la sepsis que determinan isquemia, menor producción de mucus y déficit de prostaglandinas principalmente en gastritis inducidas por los anti-inflamatorios los cuales inhiben su síntesis (Durarte, 2010; Valdivia Roldán, 2011).

Cuando la gastritis es secundaria, debido a enfermedades graves, a veces constituye un fenómeno agónico terminal y en general pasa inadvertida. En algunas ocasiones las lesiones erosivas pueden sangrar, o rara vez perforarse. Cuando cede el fenómeno inflamatorio las erosiones curan por regeneración de la mucosa (Farreras and Rozman, 2009; Durarte, 2010).

Gastritis crónica

La gastritis crónica es una inflamación que afecta solo la mucosa, no genera alteraciones macroscópicas características ni sintomatología definida, e inclusive puede ser asintomática. A este tipo de gastritis crónica se la conoce como gastritis crónicas simples o gastritis crónicas comunes. Es una entidad que por lo general se reconoce con el diagnóstico histopatológico. Las gastritis crónicas fibróticas o granulomatosas son muy poco frecuentes (Farreras and Rozman, 2009; Durarte, 2010).

Histológicamente se pueden encontrar:

a) **Gastritis crónicas superficiales:** con alteración degenerativa en células del istmo, infiltración de linfocitos y plasmocitos preponderantemente en la porción superficial de la lámina propia, entre las faveolas gástricas, la infiltración incluye también neutrófilos.

b) **Gastritis atróficas:** con mucosa adelgazada disminución de la cantidad de glándulas y simplificación de las glándulas remanentes. Además se observa, inflamación linfocitaria y plasmocitaria en todo el espesor de la lámina propia, acompañado de neutrófilos en la

mucosa fúndica puede producirse un reemplazo de las glándulas de tipo pilórica (metaplasia pilórica), tanto en la mucosa fúndica como la pilórica puede haber metaplasia intestinal donde el epitelio de la cripta y de las glándulas está reemplazado por células caliciformes y células cilíndricas similares a las de intestino (Valdivia Roldán, 2011).

Desde el punto de vista clínico-epidemiológico existen 3 tipos de gastritis crónicas:

a) Gastritis crónicas atróficas de predominio corporal: se asocian con anemia perniciosa y puede coexistir con lesiones tiroideas y suprarrenales de tipo autoinmune.

b) Gastritis crónica con predominio antral: son frecuentes en pacientes con úlceras duodenales, suele ser una forma de gastritis superficial, sin atrofia. Se considera que esta gastritis es causada por *Helicobacter pylori*.

c) Gastritis crónica atrófica multifocal antral y corporal: comienza en la curvatura menor, en forma de numerosos puntos dispersos. A medida que aumenta la edad, se extiende en la curvatura menor o puede continuar comprometiendo ambas caras del cuerpo gástrico. En casos muy extremos puede causar aclorhidria. Se ha sugerido que este tipo de gastritis es producida principalmente por factores externos, por lo que también se la denomina gastritis ambiental. Entre esos factores se considera el más importante en la iniciación de las gastritis es el *Helicobacter pylori* (Durarte, 2010; Valdivia Roldán, 2011).

Gastritis corrosiva

Se pueden dar otro tipo de gastritis denominadas corrosivas estas resultan de la lesión gástrica provocada por la ingesta de sustancias cáusticas (Durarte, 2010; Valdivia Roldán, 2011).

Úlcera gástrica

La úlcera gástrica es una pérdida focal de tejido que compromete al menos todo el espesor de la mucosa y parte de la submucosa, pudiendo extenderse a todo el espesor del órgano, se cura por reparación de las tunicas subyacentes de la mucosa y por regeneración atípica de la mucosa.

Úlcera gástrica aguda

La úlcera gástrica aguda forma parte del cuadro de las gastritis erosivas, suelen ser pequeñas miden desde milímetros a un centímetro. Se sitúan en cualquier zona del estómago.

Úlcera gástrica crónica

Se presenta en forma de crisis recurrentes, que se resuelven por la cicatrización de la úlcera. Estas crisis suelen repetirse meses o años después. Macroscópicamente en estómago se ubican en la curvatura menor del antro, en otras zonas con gastritis crónica atrófica (Farreras and Rozman, 2009; Sáinz *et al.*, 2009; Durarte, 2010).

Generalmente son únicas, infrecuentemente se encuentran en zonas vecinas a la mucosa productora de ácido clorhídrico y pepsina, pero no en esa misma mucosa. Se presentan de forma ovalada, con bordes netos y paredes verticales. Puede llegar a medir entre 1 a 3 cm (Durarte, 2010).

Histológicamente se observa que el fondo de la úlcera está formado, desde la superficie a la profundidad, por las siguientes capas: tejido necrótico y fibrina, células polimorfonucleares, tejido granuladorio, tejido conectivo fibroso en la base de la úlcera o callo. La mucosa presenta anaplasia de regeneración, con formación de pequeñas favéolas y una capa de epitelio aplanado que comienza a re-epitelializar el fondo de la úlcera. La muscular de la mucosa y la muscular propia están interrumpidas, los cabos de la muscular propia se introducen en la muscular de la mucosa (Farreras and Rozman, 2009; Sáinz *et al.*, 2009).

Dentro de la patogenia de la úlcera se tienen en cuenta factores fisiopatológicos y factores genéticos.

Factores fisiopatológicos:

a) Las condiciones que determinan un aumento absoluto o relativo de ácido clorhídrico y pepsina parecen ser más importantes en la génesis de las úlceras duodenales. Entre ellas se mencionan el aumento de células parietales, principalmente de la mucosa fúndica, mayor respuesta de las células G productoras de gastrina por aumento de su número o de su producción, el vaciamiento gástrico acelerado y disminución del pH duodenal.

b) Las condiciones que deterioran la barrera mucosa y favorecen la retrodifusión de protones. En este caso es importante la inflamación crónica de la mucosa. Otros factores considerados son episodios de isquemia focal (Farreras and Rozman, 2009; Sáinz *et al.*, 2009).

Factores genéticos:

Principalmente están asociadas a úlceras duodenales no estomacales (Sáinz *et al.*, 2009).

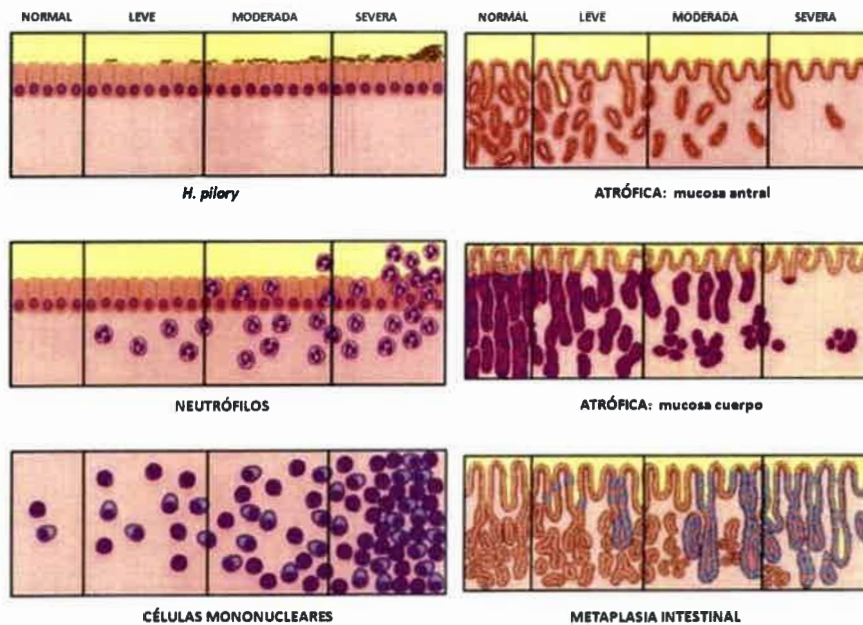


Figura 15: Esquema de la clasificación escala Sydney modificada. Gastritis atrófica y metaplasia intestinal evaluadas según la escala analógica visual de la clasificación de Sydney modificada. Tomado y adaptado de Capelle *et al.*, 2010.

Gastritis provocadas por *Helicobacter spp*

La colonización de la mucosa gástrica por *Helicobacter spp* induce a una reacción inflamatoria de carácter agudo y difuso en cuerpo y antro en humanos, mientras que en los cerdos dichas lesiones se observan en la *pars oesophagea* (Atherton *et al.*, 1996). La reacción aguda se transforma con el tiempo en una inflamación crónica de predominio antral inicialmente en la superficie donde se puede apreciar un aumento del número de plasmocitos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos en la lámina propia. Este infiltrado puede ocupar toda la superficie de la mucosa y la zona faveolar, pero no afecta la zona glandular. El epitelio de revestimiento puede mostrar anomalías en las células cilíndricas con alteraciones de los núcleos y aparición de células caliciformes. En la progresión de la inflamación, el infiltrado se extiende a toda la profundidad de la mucosa llegando a formar linfonódulos. Con el tiempo, la gastritis no atrófica progresa a atrofia gástrica, en la cual las lesiones características son la pérdida de glándulas y el colapso del entramado reticulínico (Crawford, 2000; Ladeira *et al.*, 2004).

Junto con la atrofia glandular suele coexistir un proceso de metaplasia, que consiste en la sustitución de la estructura normal de la mucosa gástrica por una de tipo intestinal o pseudopilórica. En la metaplasia intestinal aparecen agregados de células caliciformes, tanto en la superficie como

en las criptas de la mucosa, esto le confiere a la mucosa gástrica el aspecto de mucosa intestinal, con la presencia de vellosidades, células con ribete en cepillo y células de Paneth (Mulet *et al.*, 2005).

La atrofia gástrica y la metaplasia son factores de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico.

En el cerdo la aparición de las lesiones causadas por *H. spp* es controversial, mientras que para algunos investigadores la infección por este microorganismo provoca en el antro, una infiltración de células mononucleares de manera difusa y leve con agregado linfocítico o folículos linfoides en la lámina propia (Queiroz *et al.*, 1990) para otros, las lesiones observadas en el antro se destacan por un infiltrado leucocitario granulocítico leve con presencia de exudado neurofilico en el lumen de las glándulas gástricas aunque no aseveran que la presencia de este infiltrado sea propio de la infección por esta bacteria (Park *et al.*, 2004). Cerdos infectados experimentalmente con *H. suis* presentaron lesiones compatibles a gastritis crónicas y lesiones neoplásicas como displasia gástrica e hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosas (Park *et al.*, 2003; Rodriguez *y col.*, 2008).

Los factores que determinan que en algunos animales las lesiones de gastritis crónica permanezcan estables por periodos de tiempo muy prolongados, y en otros evolucionan en una rápida progresión hacia la atrofia, no son bien conocidos. Se cree que están muy relacionados con la heterogeneidad genómica del *Helicobacter* como así también con la susceptibilidad del huésped y las características de la respuesta inmune. El diagnóstico de gastritis crónica es exclusivamente histológico, sin embargo, hay algunas pruebas que pueden sugerir el diagnóstico o complementarlo al detectar alteraciones funcionales asociadas (Hui *et al.*, 1991; Mulet *et al.*, 2005).

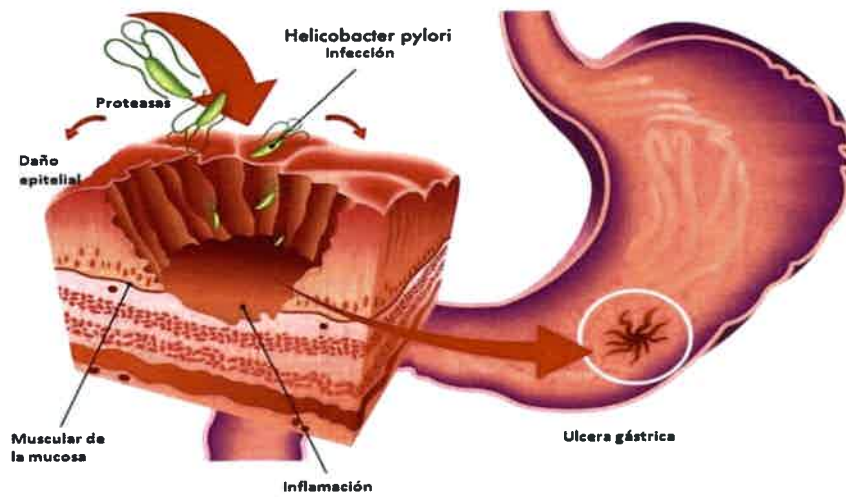


Figura 16: Diagrama ilustrativo de úlcera gástrica provocada por *Helicobacter pylori*.
Tomado y adaptado de www.healthtap.com

TABLA III: Resumen de lesiones gástricas en diferentes especies animales infectados natural o experimentalmente con *Helicobacter spp.* Tomado y modificado de Haesebrouk *et al.*, 2009.

Especies animales	<i>Helicobacter</i>	Infección	Lesión macroscópica gástrica (s)	Lesión histológica gástrico (s)	La localización de <i>Helicobacter</i> sp.	Referencia
Cerdo	<i>H. suis</i>	Natural	Enrojecimiento de la superficie	ND ^{uz}	Antro, fundus	Goto <i>et al.</i> , 2000
			Ninguno	ND	Antro, fundus	Hellemans <i>et al.</i> , 2007.
			Enrojecimiento y edema de la mucosa, erosiones ocasionales y hemorragia	Antro: un infiltrado difuso de células mononucleares con infiltrado neutrofilico ocasional y folículos linfoides	Antro: en el moco, en la luz de las fosas, en la superficie de la mucosa; correlación positiva entre la presencia de	Mendes <i>et al.</i> , 1990.

Especies animales	<i>Helicobacter</i>	Infección	Lesión macroscópica gástrica (s)	Lesión histológica gástrico (s)	La localización de <i>Helicobacter</i> sp.	Referencia
					bacterias y gastritis pilórica	
Cerdo	<i>H. suis</i>	Natural	<i>Pars oesophagea</i> : hiperqueratosis con coloración amarilla o úlceras crónicas	<i>Pars oesophagea</i> : aumento del grosor de epitelio, la elongación de las papilas, paraqueratosis, células globosas o úlceras pépticas crónicas (capas de necrosis, numerosas células inflamatorias, y tejido de granulación y fibrosis); antro: difusa leve infiltración de células mononucleares en la lámina propia con múltiples agregado linfocítico o folículos linfoides	Antro, fundus, cardias; correlación positiva entre la presencia de bacterias y lesiones en la <i>pars oesophagea</i> :	Queiroz <i>et al.</i> , 1990.
		Experimental	<i>Pars oesophagea</i> : no hay lesiones preulcerative y ulcerosas	Antro: difusa leve infiltración mononuclear en la lámina propia con múltiples linfocítica agregados o folículos linfoides	Antro: en el moco que recubren la superficie del epitelio y en la foveola superficie; fundus: en foveola glandular se extiende hasta la mitad de las fosas gástricas y, a menudo en estrecha asociación con las células productoras de moco y células	Hellemans <i>et al.</i> , 2005.

Especies animales	<i>Helicobacter</i>	Infección	Lesión macroscópica gástrica (s)	Lesión histológica gástrico (s)	La localización de <i>Helicobacter</i> sp.	Referencia
					parietales	
		Experimental	Ulceración gastroesofágico, úlceras de la mucosa glandular, folículos linfoides, el exceso de moco luminales, y edema de la mucosa	Pars esofágica: úlcera péptica; antro, cardias, fundus: difusa infiltración de células mononucleares en la lámina propia con múltiples folículos linfoides	Cardias, antro: extracelularmente	Krakowka <i>et al.</i> , 2005.
Ratones C57BL	<i>H. pylori</i> <i>H. felis</i>	Experimental	ND	Lesiones gastritis graves mas severas con <i>H. felis</i> con infiltrados leucocitario, con un bajo número de neutrófilos Alto daño a nivel células epiteliales , cambios morfológicos similares a carcinogénesis humana	ND	Thompson <i>et al.</i> , 2004. Zangh <i>et al.</i> , 2012
Gerbos de Mongolia	<i>H. pylori</i>	Experimental	ND	Gastritis severa, con presencia de un infiltrado inflamatorio, alto daño epitelial y faveolar. Desarrollo de neoplasia gástrica después de las 60 semanas.	ND	Zheng Q <i>et al.</i> , 2004

Referencias : ^{um} ND, no se describe-^b NHPH, no *H. Helicobacter pylori* especies-^c MNNG, *N*-metil-*N*-nitro-*N'*-nitrosoguanidina

1.7 HORMONAS GASTROINTESTINALES

Las hormonas gastrointestinales son necesarias para regular las diversas funciones de motilidad, secreción y absorción, del tracto gastrointestinal (GI). Los mecanismos de regulación neuro-humoral permiten integrar las actividades del sistema gastrointestinal ya que la mayoría de las células musculares y secretoras tienen una actividad intrínseca que les confiere algún grado de autonomía. Es así que la función coordinada del sistema digestivo resulta de la interacción entre los sistemas reguladores y las propiedades locales intrínsecas.

El tracto GI es el mayor órgano endocrino del organismo. La propia endocrinología surge del descubrimiento de una hormona gastrointestinal, la secretina, descubierta en 1902 (Leite e Castro Chavez, 2002).

De acuerdo con el concepto tradicional, una hormona GI es una sustancia producida por un tipo de células endocrinas dispersas por una región relativamente bien definida del tracto gastrointestinal proximal. Desde aquí es liberada a la sangre por un estímulo específico (actividad nerviosa, distensión, estímulo químico) y transportada por la misma hacia una célula efectora, en un determinado órgano blanco, donde regula su motilidad, su secreción o hasta la proliferación de sus células.

Existen varias hormonas GI que poseen una función perfectamente establecida como lo son la secretina, colecistocinina (CCK), gastrina, péptido gástrico inhibidor (GIP) y motilina (Leite e Castro Chavez, 2002).

Distribución y liberación de hormonas gastrointestinales

Las hormonas gastrointestinales se sintetizan en células endocrinas distribuidas en la mucosa GI desde el estómago hasta el colon. Las células endocrinas intestinales son miembros del llamado sistema APUD actualmente denominadas células del sistema enteroendocrino difuso (DNES), células que captan y descarboxilan precursores amínicos (Garnet and Hiatt_a, 2011, Garnet and Hiatt_d, 2011). Las células enteroendocrinas se diferencian a partir de la misma progenie de las mismas células madres de las que derivan las demás células epiteliales del tubo digestivo (Ross and Pawlina, 2012).

Ultraestructuralmente, las células endocrinas GI tienen gránulos de secreción concentrados en la base, cerca de los capilares sanguíneos. Los gránulos se funden con la membrana celular y se liberan las hormonas en respuesta a determinados estímulos nerviosos, físicos o químicos relacionados con la presencia de alimentos en el lumen GI. Estas células poseen microvellosidades en la membrana apical que pueden contener receptores a los cuales se ligan sustancias del contenido luminal (Leite e Castro Chavez, 2002).

Las células enteroendocrinas no solo producen hormonas gastrointestinales sino también sustancias de acción paracrina. Una sustancia paracrina se diferencia de una hormona porque se difunde localmente hacia su diana celular en vez de ser transportada por el torrente sanguíneo hacia una célula efectora. Una sustancia, bien conocida, que parece actuar de esta forma es la somatostatina, cuya función es inhibir otras células endocrinas GI e insulares pancreáticas (Ross and Pawlina, 2012).

Otros agentes con actividad local que se han aislado de la mucosa gastrointestinal, son los neurotransmisores. Estos agentes son liberados desde terminaciones nerviosas cercanas a la diana celular, por lo general las células del músculo liso de la muscular de la mucosa, la túnica muscular propia o la túnica media de los vasos. Los péptidos hallados en las fibras nerviosas del tubo digestivo son el péptido vasoactivo (VIP), bombesina y encefalinas.

Las hormonas cuyo sitio de síntesis es el estómago son

Hormona	Sitio de Síntesis	Acción
Gastrina	Células G (estómago)	<ul style="list-style-type: none"> - Estimulación de la secreción ácida - Inhibe el vaciamiento gástrico
Somatostatina (Hormona paracrina)	Mucosa del tubo digestivo	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibe la secreción de gastrina - Inhibe la secreción - Inhibe la secreción de otras hormonas gastrointestinales
Histamina	Mucosa del tubo digestivo	<ul style="list-style-type: none"> - Estimula la secreción ácida
Bombesina	Estómago	<ul style="list-style-type: none"> - Estimula la liberación de gastrina
Encefalina	Mucosa y músculo liso	<ul style="list-style-type: none"> - Estimula la contracción del músculo liso (GI) - Inhibe la secreción intestinal
VIP	Mucosa y músculo liso de todo el tubo digestivo	<ul style="list-style-type: none"> - Estimula la secreción pancreática - Estimula la secreción intestinal - Inhibe la contracción del músculo liso - Inhibe la contracción esfinteriana

Existen otras hormonas cuyos sitios de síntesis son otras porciones del tubo digestivo pero realizan su función en estómago:

Hormona	Acción
Secretina	- Inhibe la secreción gástrica
Péptido Inhibidor Gástrico	- Inhibe la secreción gástrica
Motilina	- Aumenta la motilidad gástrica
Péptido YY	- Inhibe la secreción gástrica y el vaciamiento gástrico
Péptido similar glucagón 1 (GLP-1)	- Inhibe el vaciamiento gástrico

(Modificado de Geneser, 2000; Leite e Castro Chavez, 2002; Eynard, Valentich y Rovasio, 2008).

1.8 GASTRINA

Es un péptido que se presenta en varias formas moleculares en función de su tamaño, carga eléctrica molecular y actividad biológica. Generalmente se presenta, en sus formas mayores, como un péptido grande de 34 aminoácidos (6-34) o como un péptido pequeño de 17 residuos (6-17); obtenido a partir del extremo COOH de 6-34. Las formas menores conocidas como minigastrina (6-14, 6-6, 6-4) juegan un papel responsable en la actividad biológica siendo precisamente los últimos cinco aminoácidos del extremo COOH, la porción funcional de la molécula de gastrina.

La gastrina es producida, almacenada y secretada por las células G localizadas en el antro y en la parte superior del duodeno. La secreción de gastrina por las células G es regulada entre otros, por el cuerpo luminal, ya que las mismas, en su superficie apical, presentan receptores que reciben los estímulos directamente del contenido de la luz del estómago. Son especialmente efectivos los productos de degradación de las proteínas principalmente los aminoácidos (Geneser, 2000). La distensión del estómago, estímulos de neuronas vasolaterales y otras células endocrinas, también son factores que estimulan la producción de gastrina (Hersey and Sachs, 1995; Atherton *et al.*, 1999). Todos estos signos incrementan la concentración de Ca^{+2} intracelular lo cual causa que los gránulos de secreción se unan a la membrana plasmática y liberen gastrina dentro de la circulación (Walsh, 1994).

En el jugo gástrico, nutrientes ricos en aminoácidos especialmente aromáticos, dietas aminoras y Ca^{+2} inducen la secreción, presumiblemente por acción directa sobre los receptores ubicados en la cara luminal de las células G (Ray *et al.*, 1997_a; Ray *et al.*, 1997_b; Conigrave *et al.*, 2000).

La secreción de gastrina es regulada por el contenido gástrico, por la actividad vagal y por factores de la circulación sanguínea. La misma, aumenta por la presencia de péptidos o aminoácidos, como fenilalanina y triptofano, que actúan directamente sobre las células G (Leite e Castro Chavez, 2002).

También actúan como factores liberadores de gastrina los péptidos liberadores (GRP o gastrine releasing peptide) y la acetilcolina (Morales Espinoza *y col.*, 1999).

La liberación de gastrina por células G es inhibida por la liberación de somatostatina secretada de manera paracrina por las células antrales (D-cells) (Larsson *et al.*, 1979; Schubert *et al.*, 1998).

La liberación de gastrina es suprimida cuando el pH luminal antral cae por debajo de 3. Adicionalmente, este control inhibitor ejercido sobre la liberación de gastrina es también ejercido por la colecistoquinina y otras enterogastronas liberadas desde el intestino delgado. La inhibición de la secreción de gastrina, ejercida tanto por el ácido gástrico como por la colecistoquinina está mediada principalmente por la liberación de somatostatina por las células D de la mucosa antral. Estas células D están en íntima proximidad con las células G y la somatostatina liberada por ellas ejerce un control parácrino inhibitor tanto para la síntesis como para la liberación de gastrina (Soriano Alvarez, 1998).

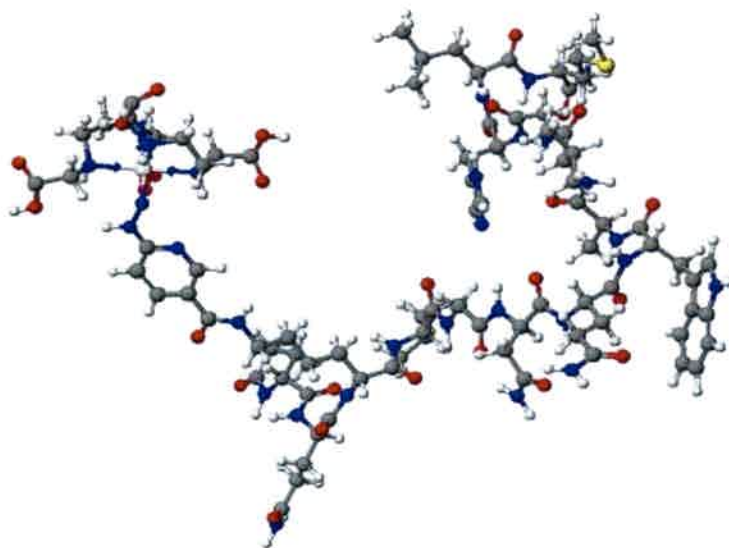


Figura 17: Modelo molecular de la hormona gastrina.
Tomado de www2.alsbimnjournal.cl/AJ30-5.

Función de la gastrina

La acción principal de la gastrina es estimular la secreción de ácido por la mucosa gástrica. La gastrina induce la liberación de histamina producida por las células ECL (enterocromafines) (Hakanson *et al.*, 1970; Leite e Castro Chavez, 2002).

La histamina aumenta la secreción gástrica por unirse a los receptores H₂ de las células parietales. Esta unión de la histamina a los receptores (H₂R) en dichas células hace que las mismas activen la secreción de ácido clorhídrico. Si bien las células parietales poseen receptores para gastrina, estudios *in vivo* han demostrado que la influencia de la gastrina en la secreción gástrica, se debe sobretodo a la estimulación de la secreción de histamina. En condiciones normales cuando el pH luminal llega a 3, las células D antrales secretan somatostatina la cual inhibe la acción de la gastrina y en consecuencia se reduce la secreción ácida (Lennart *et al.*, 2007).

Otra de las funciones mas importantes de la gastrina se relaciona con su actividad trófica, ella estimula la síntesis de ARN, proteínas y ADN, y en consecuencia la proliferación de células de la mucosa del intestino delgado, del colón y de las glándulas oxínticas del estómago. Si se procede a realizar una antrectomía, estos tejidos se atrofian. La administración exógena de gastrina impide la atrofia (Lennart *et al.* 2007).

La gastrina también estimula el crecimiento de las células ECL del estómago y ejerce acción sobre la contracción y la actividad eléctrica del músculo liso (Leite e Castro Chavez, 2002; Lennart *et al.* 2007).

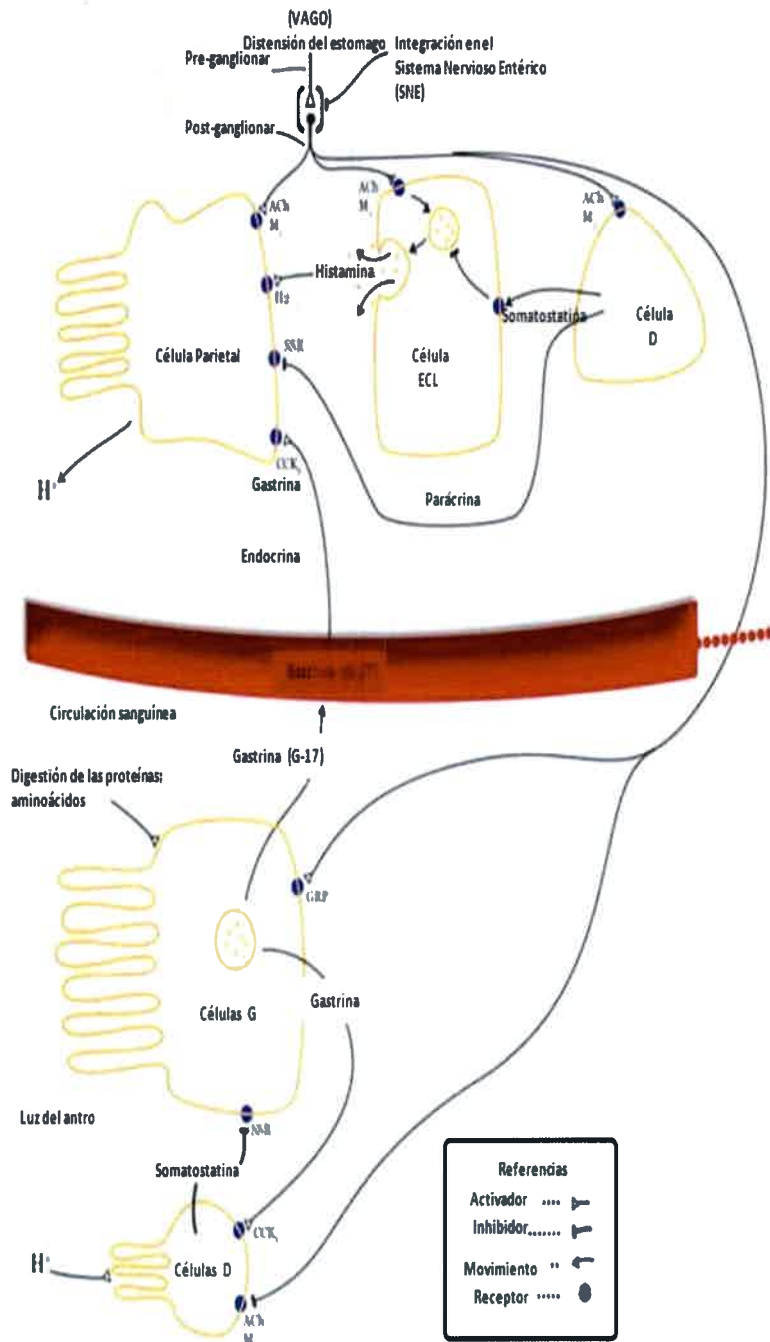


Figura 18: Diagrama ilustrativo del control de la secreción de ácido en el estómago. Tomado y modificado de Kariya et al., 1986.

Durante el curso de una gastritis producida por *Helicobacter spp*, dicho agente actúa sobre las células G productoras de gastrina, provocando alteraciones histológicas y funcionales en las mismas, lo que provoca un incremento de la secreción del jugo gástrico, por ende la secreción de ácido clorhídrico también aumenta, produciendo ulceración. La implicancia del *Helicobacter spp* en enfermedades gástricas del ser humano y los animales lo ubica dentro de las primeras causas de

predisposición de cáncer gástrico y su potencial zoonosis como un factor de riesgo para la salud humana. Este estudio aportará conocimientos no solo en el campo de la medicina humana sino también en especies animales que comparten dicho agente causal, permitiendo indagar sobre posibles impactos zoonóticos entre especies susceptibles a dicho agente.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Investigar la relación entre la presencia del *Helicobacter spp.* y la funcionalidad de células productoras de gastrina en biopsias gástricas de humanos y muestras gástricas de cerdos con gastritis provocadas por dicho agente causal.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a través de diagnóstico histopatológico la presencia de gastritis en biopsias gástricas de humanos y muestras gástricas de cerdos.
- Determinar la presencia de *Helicobacter spp.* en estómagos de humanos y cerdos con gastritis utilizando tinciones histológicas convencionales e inmunohistoquímica.
- Realizar estudios morfométricos de las diferentes especies de *Helicobacter spp.* en muestras gástricas de cerdos.
- Detectar en muestras gástricas de humanos y muestras gástricas de cerdos con gastritis con o sin *Helicobacter spp.* la presencia de células G productoras de gastrina por técnicas inmunohistoquímicas
- Estudiar la relación presencia de *Helicobacter spp.* y porcentaje de células productoras de gastrina en biopsias gástricas humanas y muestras gástricas de cerdos.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras de biopsias gástricas obtenidas de humanos y muestras gástricas obtenidas de cerdos.

3.1 Biopsias gástricas de humanos.

Las muestras de pacientes humanos fueron tomadas a través de muestras endoscópicas realizadas por el Servicio de Endoscopia Digestiva del Nuevo Hospital Río Cuarto (San Antonio de Padua) de la ciudad de Río Cuarto, Córdoba (33° 04' S, 64° 38' O, 467.61 s.n.m.).

Las biopsias utilizadas para este trabajo provienen principalmente, de la región antral de pacientes de sexo femenino y masculino de entre 30 a 70 años de edad realizadas de rutina en dicho servicio, destacándose que las mismas se obtuvieron por necesidad de la clínica (n=80). Todas las muestras endoscópicas fueron realizadas bajo consentimiento asistido del paciente, a dicho consentimiento se le adjuntó una carta de consentimiento asistido referido a este proyecto de investigación, cuyo objetivo fue informar que una vez realizado el diagnóstico anatomopatológico esas muestras podrían, si el paciente diera su consentimiento, ser utilizadas para este proyecto de tesis.

Las muestras se remitieron al Servicio de Anatomía Patológica del Nuevo Hospital, allí fueron fijadas en formol tamponado al 10% para su procesamiento por la técnica histológica convencional.

Criterios de inclusión

- Biopsia gástrica antral útil para diagnóstico.
- Confirmación histológica de gastritis aguda y crónica.
- Presencia de *Helicobacter spp.*
- Consentimiento informado de inclusión en el estudio.
- Pacientes que no presentaban ninguna enfermedad concomitante.
- Edad entre 30-70 años.

Criterios de exclusión

- Todas aquellas biopsias gástricas cuyo diagnóstico no poseía gastritis aguda o crónica.
- Úlcera gástrica o duodenal asociadas.
- Neoplasia gástrica y metaplasia intestinal.
- Pacientes que hicieron tratamiento erradicador para *Helicobacter pylori*.
- Pacientes con enfermedades concomitantes.
- Edad menor 30 años y mayores de 70 años.

3.2 Muestras gástricas de cerdos.

Se trabajó con cerdos mestizos de diferentes edades y sexos, provenientes de frigoríficos de la zona de Río Cuarto, Argentina (33,11° S, 64,3° O). Se procesarán 50 biopsias gástricas.

En todos los casos, se trató de animales destinados a faena y considerados libres de enfermedades de acuerdo al examen clínico y *postmortem* realizado.

Las muestras se tomaron de la región antral, inmediatamente después de obtenidas, se lavaron con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco) conteniendo 10.000 U/ml de penicilina g sódica, 10 mg/ml de sulfato de estreptomina y 2,5 mg/ml de fungizona. Posteriormente se mantuvieron a 4° C hasta su procesamiento en el laboratorio. En el laboratorio se tomaron porciones de tejido de 4 mm³, aproximadamente, que se fijaron con formol tamponado al 10%.

Parte del tejido se preservó para el análisis de la estructura por medio de microscopia óptica, mientras que el resto del tejido se destinó para la detección de *Helicobacter spp.* y células G productoras de gastrina a través de ensayos de inmunohistoquímica.

3.3 Técnica de histología convencional para microscopia óptica

A partir de las muestras fijadas con formol bufferado al 10% en los respectivos laboratorios, se realizó la deshidratación de las mismas en baterías de alcoholes de graduación creciente, y posteriormente fueron incluidos en parafina. Se realizaron cortes histológicos de aproximadamente 4 µm, que se utilizaron para la realización del diagnóstico de gastritis y la detección de *Helicobacter spp.*, usando las tinciones de rutina empleadas en el Hospital San Antonio de Padua: Hematoxilina-eosina para el diagnóstico de gastritis, Giemsa, Warthin Starry para la detección de *Helicobacter spp.* El resto de los cortes se preservó para la técnicas inmunohistoquímicas.

Para la fijación de las muestras con formol tamponado al 10% se utilizó el siguiente protocolo (Samar y Ávila, 1991):

- Formol comercial (formaldehído al 40%).....100 ml
- Agua destilada.....900 ml
- Monohidrato de fosfato ácido de sodio..... 4 grs
- Fosfato disódico anhidro..... 6,5 grs

Previo a la realización de las respectivas tinciones los tejidos se desparafinaron y rehidrataron mediante el siguiente protocolo:

- 2 pasajes en xilol 100 % de 10 min c/u.
- 2 pasajes en alcohol 100 % de 5 min c/u.
- 1 pasaje en alcohol 90% de 5 min.

- 3- Colorear con eosina 1 min.
- 4- Lavar con agua corriente.
- 5- Deshidratar y montar.
- 6- Observar al microscopio óptico.

Dicha técnica fue utilizada para la observación de la estructura histológica del estómago de ambas especies y para realizar el diagnóstico de Gastritis.

3.5 Tinción de Giemsa

Para realizar dicha tinción se utilizó colorante de Giemsa (Laboratorio Biopur Srl)

El protocolo de tinción realizado fue:

1. Aplicar solución de trabajo de Giemsa durante 10 minutos.
2. Deshidratar con alcohol absoluto, 3 cambios.
3. Aclarar con xilol, 3 cambios.

Dicha coloración fue utilizada para la detección de *Helicobacter spp.*

3.6 Tinción de Warthin Starry

1- Preparar 1000cc de agua bidestilada acidificada a pH 3,8 a 4,2

2- Ajustar pH usando ácido acético

3- Rehidratar las muestras 2 min. en agua acidificada.

4- Solución de Plata al 1% para impregnación

Disolver por unos minutos a Baño María de 45° C:

Nitrato de Plata (Cicarelli®)..... 1gr

Agua acidificada..... 100cc

Sumergir los preparados por 30 min. en oscuridad para su impregnación.

5- Mientras tanto en estufa a 60° C se disuelven por separado:

- Solución de Nitrato de Plata al 2%:

Nitrato de Plata.....0,50grs

Agua acidificada25 cc

- Gelatina para microbiología (Merk®)

Gelatina..... 2,5 grs

Agua acidificada..... 50 cc

- Hidroquinona (Cicarelli®)

Hidroquinona..... 0,037 grs

Agua acidificada..... 25 cc

Mantener el resto del agua acidificada a 60° C (reservar para lavado).

6- Cinco minutos antes de terminar la impregnación preparar la solución de revelado que se obtiene de mezclar:

Hidroquinona.....24 cc

Gelatina45cc

Nitrato de Plata al 2%.....18cc

Mezclar en el momento de ser usado, agitar suavemente y mantenerla a 60° C en estufa hasta el momento de sumergir las muestras.

7- Colocar las muestras en la solución de revelado a 60° C por unos minutos hasta obtener un color marrón caramelo

8- Lavar las muestras con el agua acidificada caliente que se reservó.

9- Lavar con agua destilada fría.

10- Montar directamente con medio acuoso de Glicerol Fosfato pH 8.

Preparación del Glicerol Fosfato:

PBS..... una parte

Glicerol..... nueve partes

Recomendaciones

- Las muestras deben estar desparafinadas y rehidratadas.
- Cuidar mucho el pH del agua bidestilada
- Cuidar las temperaturas del Baño María y estufa

No dejar mucho tiempo en el revelado (segundo paso) solo hasta obtener color caramelo no dejar más de 2 o 3 minutos porque las células se ponen muy oscuras (Luna *et al.*, 1968).

Esta técnica empleada permite determinar la presencia de *Helicobacter spp.*

3.7 Grupos

Una vez realizado el diagnostico histopatológico se procedió a dividir las muestras por grupos.

Biopsias Gástricas Humanas

Grupo A: con G/H+: Pacientes con gastritis agudas con presencia de *Helicobacter spp.* Las muestras se agruparon por sexo y por edad (30-50) y (50-70) quedando dicho grupo conformado de la siguiente manera

A1: H+ femenino

A2: H+ masculino

Grupo B: con G/H-: Pacientes con gastritis agudas con ausencia de *Helicobacter spp.* Las muestras se agruparon de la misma manera que en el grupo A

B1: H- femenino

B2: H- masculino

Grupo C: con G/H+: Pacientes con gastritis crónicas con presencia de *Helicobacter spp.*

C1: H- femenino

C2: H- masculino

Grupo D: con G/H-: Pacientes con gastritis crónicas con ausencia de *Helicobacter spp.*

D1: H- femenino

D2: H- masculino

Grupo E: Pacientes con mucosas gástricas normales

E1: normales femenino

E2: normales masculino

Muestras Gástricas de cerdos

Grupo C: cerdos G/H+: Cerdos con gastritis agudas con presencia de *Helicobacter spp.*

Grupo D: cerdos G/H- : Cerdos con gastritis agudas sin presencia de *Helicobacter spp.*

Grupo E: cerdos G/H+: Cerdos con gastritis crónicas con presencia de *Helicobacter spp.*

Grupo F: cerdos G/H- : Cerdos con gastritis crónicas sin presencia de *Helicobacter spp.*

Grupo G: Cerdos con mucosas gástricas normales

3.8 Análisis morfométrico de las diferentes especies de *Helicobacter*

Para la determinación morfométrica de las diferentes especies de *Helicobacter* en biopsias gástricas de cerdos se utilizaron cortes histológicos tratados de acuerdo al protocolo de Warthin Starryn detalladas en la sección 3.6. Se tomaron imágenes con la cámara Canon Powershot G6 7.1 megapixels (Canon, Japón) adosada al microscopio Axio Vision Axio Vs40 V 4.6.3.0.

Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 1000 x y se midieron alrededor de 100 microorganismos por muestra.

3.9 Técnicas Inmunohistoquímicas

3.9.1 Inmunodetección de *Helicobacter spp* y de células G productoras de Gastrina

Los tejidos fueron primeramente desparafinados mediante 2 pasajes por xilol de 15 min cada uno. Posteriormente, se rehidrataron con batería de alcoholes de graduación decreciente de 5 min cada uno, luego se lavaron 2 veces en agua destilada (10 min cada uno) y 2 veces en solución tampón fosfato salino (PBS pH 7,2) (10 min cada uno).

3.9.2 Determinación de *Helicobacter spp* y células G productoras de gastrina

Para la determinación de *Helicobacter spp* y células G se realizaron técnicas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos comerciales (Cell Marque Corporation, USA y Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) (Ramos-Vara *et al.*, 2005).

La técnica se realizó a temperatura ambiente, luego de desparafinar y rehidratar los cortes histológicos. Los portaobjetos conteniendo los cortes de tejido fueron tratados previamente con 3% (v/v) de peróxido de hidrógeno por 5 min y lavados con solución salina tamponada (PBS pH 7,2). Luego fueron incubados con el anticuerpo primario (anti-*Helicobacter pylori* 215A76 Cell Marque Corporation, USA y anti gastrina Gastrin (H-90) sc 20729, Lct # A 31 C3 Santa Cruz) durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente fueron lavados con PBS (2 lavados de 10 min cada uno) e incubados durante 20 min con el anticuerpo secundario biotinilado (anticuerpos anti-IgG de ratón, anti-IgG de cabra y anti-IgG de conejo). Fueron lavados con PBS (2 lavados de 10 min cada uno) y tratados con el complejo streptavidina-peroxidasa por 20 min. Luego del período de incubación, fueron lavados con PBS (2 lavados de 10 min cada uno) y tratados con la solución cromógena, diaminobencidina (DAB) durante 15 min o hasta aparición de color marrón. Posteriormente, fueron contrastados con hematoxilina de Mayer por 50 seg, lavados con solución de hidróxido de amonio al 0,08 % por 30 seg, deshidratados en batería de alcoholes de graduación creciente y montados con Entellan (Merck, Alemania), para ser observados en un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania). La adquisición de las imágenes se realizó mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio óptico.

Los resultados obtenidos en las técnicas inmunohistoquímicas fueron expresados en forma cuantitativa, según la intensidad de la marcación detectada en la técnica. Los resultados obtenidos en las técnicas inmunohistoquímicas permitieron evaluar la presencia y/o ausencia de *Helicobacter spp* y por otro lado el porcentaje de células gastrina positivas.

3.10 Estudio estadístico

Luego esos resultados fueron sometidos estadísticamente a diversas Pruebas t para muestras Independientes y análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2011 (Di Rienzo *y col.*, 2011).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Biopsias gástricas humanas

Se estudió la relación de la presencia de *Helicobacter spp* con respecto a la funcionalidad de las células productoras de gastrina en biopsias gástricas humanas. Para el diagnóstico de gastritis se utilizó la tinción de hematoxilina y eosina. Para determinar la presencia de *Helicobacter spp* en biopsias gástricas de pacientes mujeres con diagnóstico de gastritis H (+) y H (-) y biopsias gástricas de pacientes hombres obtenidas por técnicas endoscópicas de rutina en el Servicio de Endoscopia Digestiva del Nuevo Hospital Río IV, tomadas de la región antral, se utilizaron las tinciones de Hematoxilina/eosina, Giemsa, Warthin Starry y la técnica inmunohistoquímica con anticuerpos comerciales.

La detección de células G se realizó por técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos comerciales. Se determinó el porcentaje de células gastrina positivas en muestras de mujeres/hombres con gastritis que tenían o no *Helicobacter* H (+)/H (-).

Estudio microscópico de biopsias gástricas humanas

A través del empleo de tinciones diferenciales, como hematoxilina-eosina y Giemsa, fue posible analizar las características estructurales de la mucosa gástrica y la presencia de *Helicobacter spp*; para ello se procesaron 80 biopsias gástricas obtenidas de la región antral de pacientes humanos de ambos sexos y con un rango etario de 30-70 años.

Dichas muestras se procesaron de acuerdo al protocolo que se detalla en el punto 3 de *Materiales y Métodos*.

Una vez realizado el diagnóstico histopatológico se procedió a dividir las biopsias de acuerdo a los grupos ya expuestos en el punto 3.8.

En la Figura 19 se observa una biopsia gástrica humana, región antral teñida con hematoxilina-eosina con diagnóstico de gastritis. Se aprecia una lámina propia de tejido conectivo con abundante células inflamatorias y algunos vasos sanguíneos con hiperemia.

En la Figura 20 observamos una biopsia gástrica humana, región antral con diagnóstico de gastritis sometida a la coloración de Giemsa en la cual podemos apreciar la presencia de *Helicobacter spp*, dichas muestras corresponden a un paciente de sexo femenino.

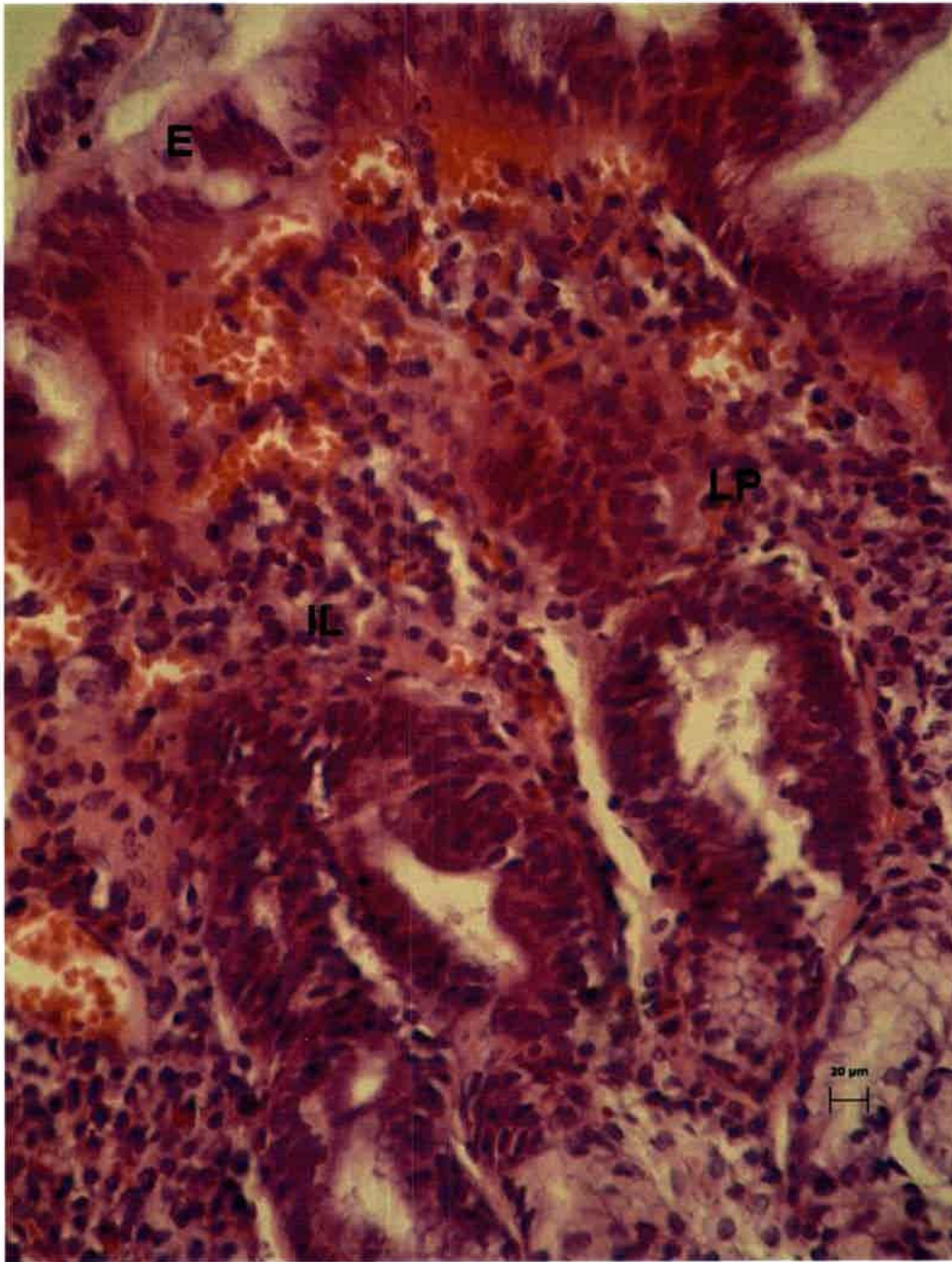


Figura 19 -Microscopía óptica de biopsias gástricas, región antral con diagnóstico de gastritis. E: epitelio, LP: lámina propia, IL: infiltrado leucocitario. Tinción H/E, 400

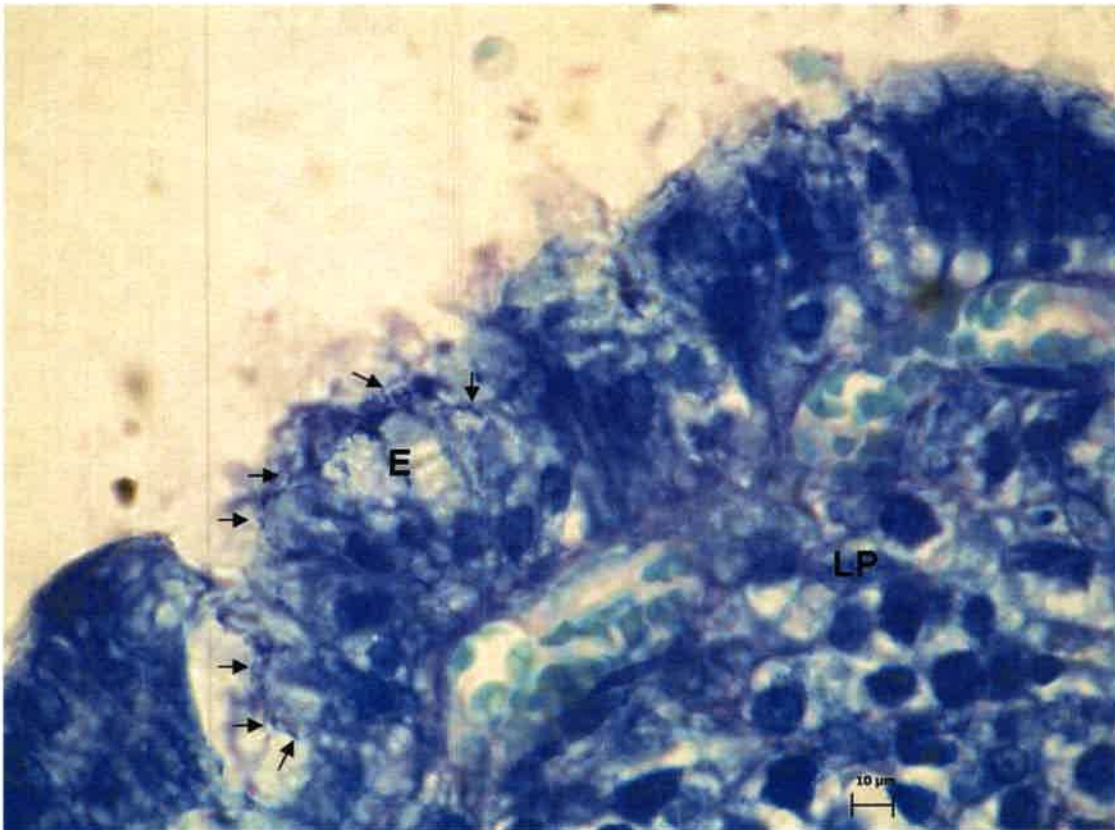


Figura 20 - Microscopía óptica de biopsias gástrica, región antral con diagnóstico de gastritis H(+). *Helicobacter spp* (flecha), E: epitelio, LP: lámina propia. Tinción de Giemsa, 1000 x.

La Figura 21 corresponde a una biopsia de mucosa gástrica región antral, paciente humano masculino con diagnóstico de gastritis donde podemos observar en la lámina propia un infiltrado leucocitario, sometido a la coloración de hematoxilina /eosina.

La Figura 22 muestra una tinción de Giemsa del mismo paciente donde se observa la presencia de microorganismos *Helicobacter spp*.



Figura 21 -Microscopía óptica de biopsias gástricas, región antral con diagnóstico de gastritis. E: epitelio, LP: lámina propia, IL: infiltrado leucocitario. G: glándula gástrica. Tinción H/E (400 x).

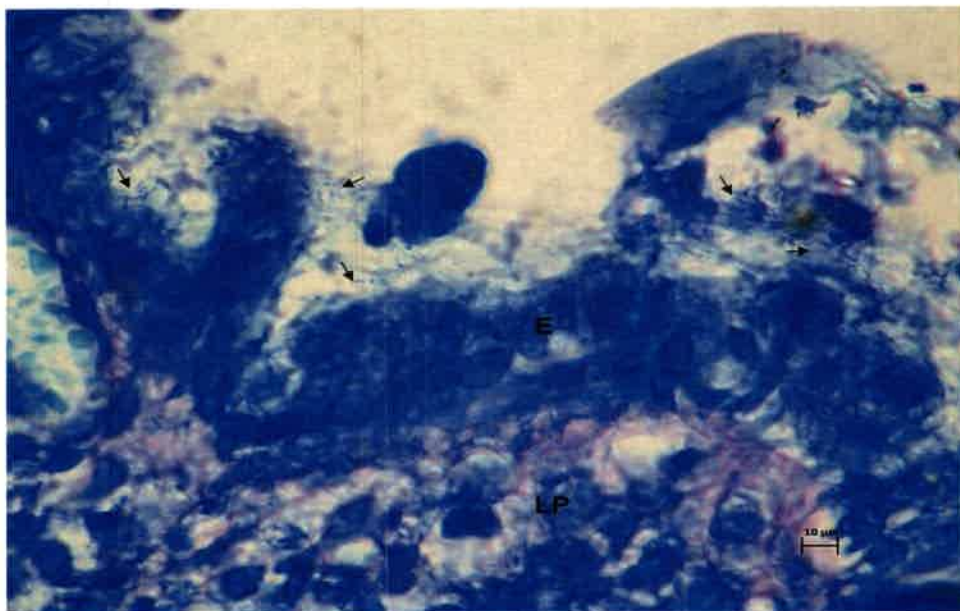


Figura 22 - Microscopía óptica de biopsias gástrica, región antral con diagnóstico de gastritis H (+). *Helicobacter spp* (flecha), E: epitelio, LP: lámina propia. Tinción de Giemsa (400 x).

Tinción Warthin-Starry

Las muestras fueron sometidas a tinciones de Warthin-Starry para la detección de microorganismos correspondientes a *Helicobacter spp.*

Las Figuras 23 y 24 muestran en una biopsia de mucosa antral la presencia de *Helicobacter spp.*

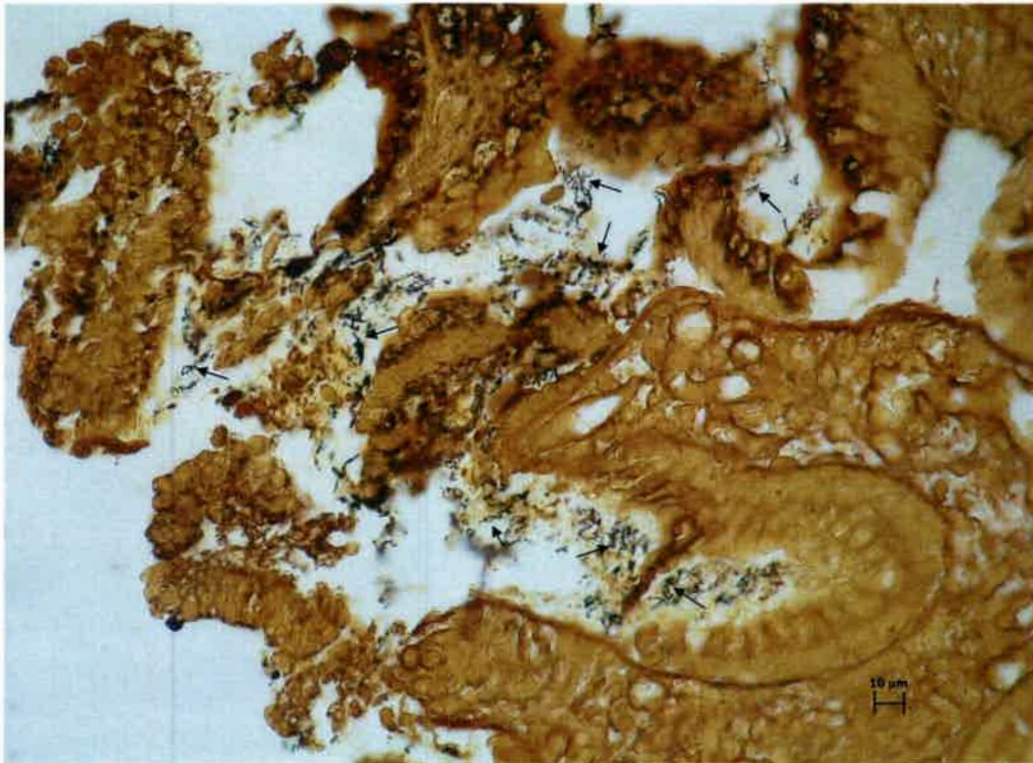


Figura 23- Microfotografía de biopsia gástrica región antral coloreada con la tinción de Warthin-Starry en donde se observan *Helicobacter spp.* (flecha) (400x).

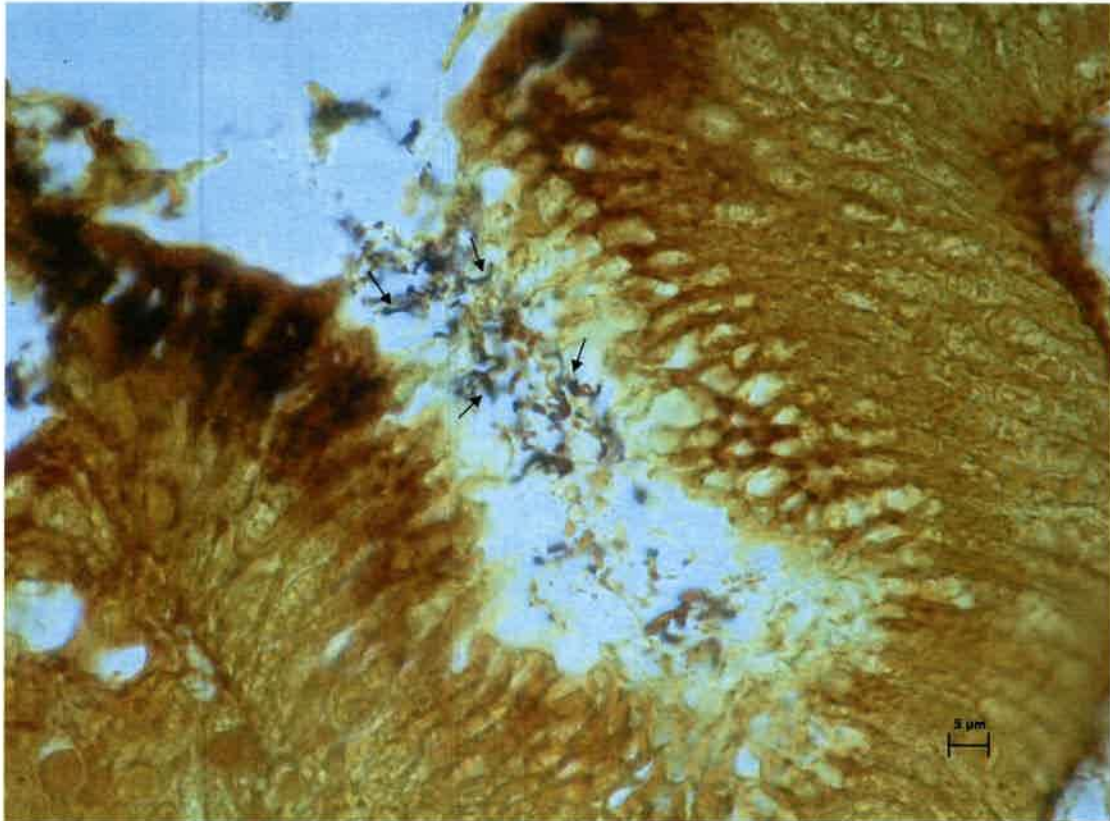


Figura 24- Microfotografía de biopsia gástrica región antral coloreada con la tinción de Warthin-Starry en donde se observan *Helicobacter spp.* (flecha) (1000x).

Tinción inmunohistoquímica

Las muestras fueron sometidas a tinciones inmunohistoquímicas para la detección de células G productoras de gastrina con anticuerpo anti-gastrina Gastrin (H-90) sc 20729, Lct # A 31 C3 Santa Cruz.

En la Figura 25 podemos observar la inmunexpresión de células G productoras de gastrina en una biopsia gástrica región antral paciente con gastritis *Helicobacter* (+). La muestra pertenece a una paciente de sexo femenino. En la misma se puede apreciar la presencia de células G tanto a nivel del tejido epitelial glandular como en el tejido conectivo subyacente. Las células mostraron formas variadas, ya que algunas se presentaron alargadas y otras redondeadas. La mayoría de las mismas respondieron a células de tipo cerrado.

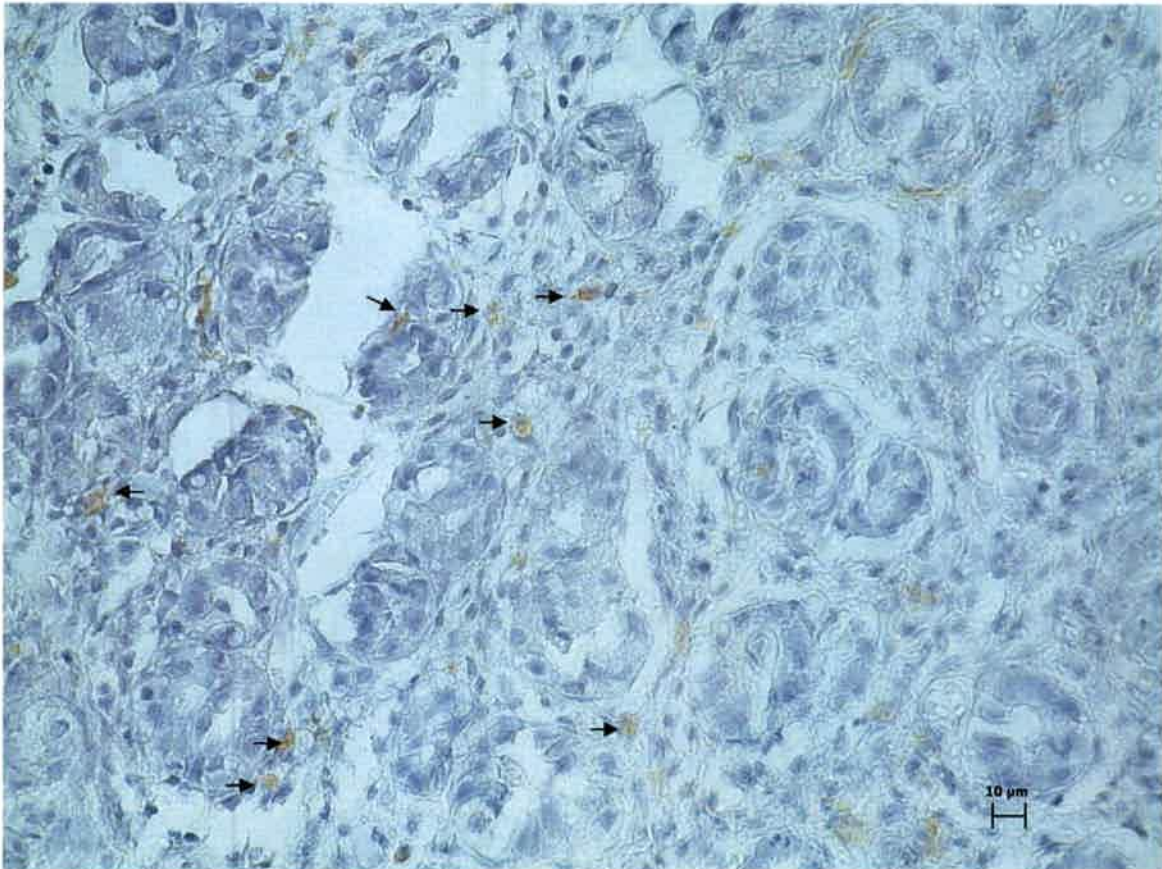


Figura 25- Inmunoexpresión de células secretoras de gastrina en biopsias gástricas con diagnóstico de gastritis H (+) paciente femenino. Célula productora de gastrina, en tejido epitelial glandular y tejido conectivo subyacente. (flecha) (400x).

La Figura 26 muestra la presencia de una célula G productora de gastrina en una biopsia gástrica región antral de un paciente femenino con diagnóstico de gastritis H(+). Dicha célula se ubica en el epitelio glandular presentando forma redondeada y núcleo basal. Los gránulos citoplasmáticos se observaron de diferentes tamaño e intensidad de coloración, algunos de ellos manifiestan un aspecto grueso e intensamente teñidos , mientras que otros se presentaron con aspecto más finos y débilmente teñidos.

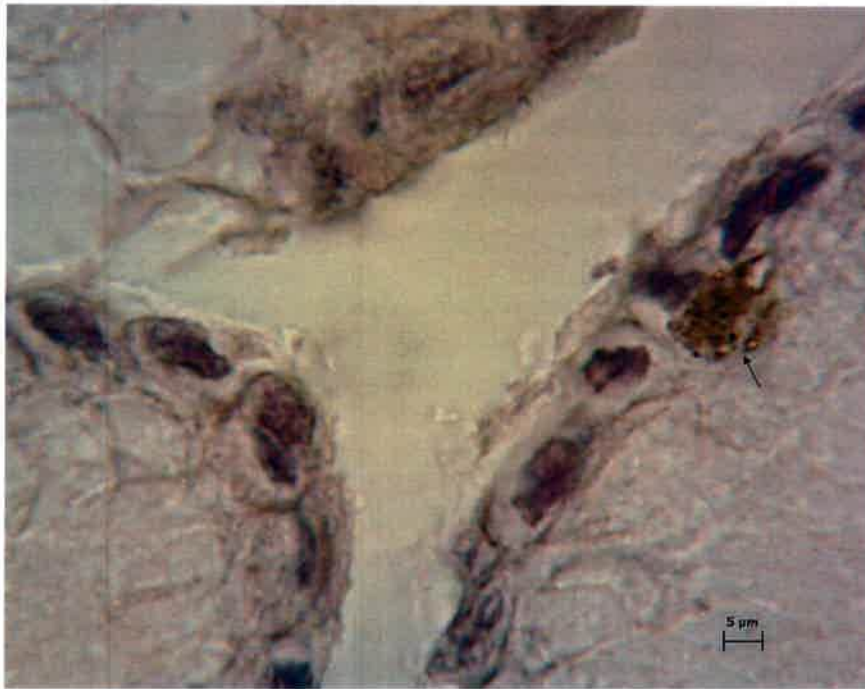


Figura 26- Inmunoexpresión de células secretoras de gastrina en biopsias gástricas con diagnóstico de gastritis H (+) paciente femenino. Célula productora de gastrina (flecha) (1000 x).

En las Figuras 27 y 28 se observa la presencia de células G productoras de gastrina en una biopsia gástrica región antral de un paciente masculino con diagnóstico de gastritis H(+).

En la figura 27 se observan células G en tejido conectivo y en epitelio glandular, las mismas muestran formas redondeadas.

En la figura 28 las células G se observan ubicadas en el epitelio glandular, débilmente teñidas, con formas redondeadas y de tipo cerradas.

En las muestras estudiadas las células de formas redondeadas, presentaron sus núcleos redondos y en algunos casos los mismos adoptaron la forma alargada ubicándose, los primeros en la porción central de la célula, y los segundos en la parte basal de la misma. Respecto a aquellas que mostraron una forma celular alargada, el núcleo se presentó con la misma morfología que la célula, extendiéndose a lo largo de la superficie citoplasmática. En una misma célula, los gránulos presentaron diferentes aspectos, ya que algunos se mostraron gruesos e intensamente teñidos, mientras que otros lo fueron más finos y débilmente teñidos. En otros casos, la apariencia de los gránulos fue homogénea. Además, en las muestras gástricas observadas, se pudo determinar la presencia de los tipos celulares abiertas y cerradas siendo las de tipo cerradas las más abundantes.

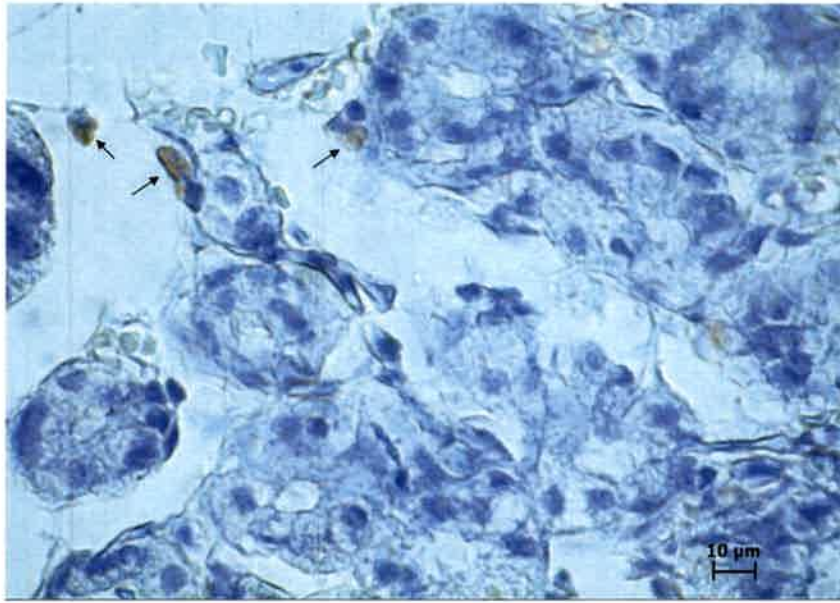


Figura 27- Inmunoexpresión de células productoras de gastrina (*flecha*) en biopsias gástricas con diagnóstico de gastritis H (+) paciente masculino (400x).



Figura 28- Inmunoexpresión de células secretoras de gastrina en biopsias gástricas con diagnóstico de gastritis H (+) paciente masculino. Célula productora de gastrina coloración positiva con anticuerpos anti-gastrina (*flecha*) (1000x).

Muestras gástricas de cerdos

Se estudió la relación de la presencia de *Helicobacter spp* con respecto a la funcionalidad de las células productoras de gastrina en muestras gástricas de cerdos.

Para el diagnóstico de gastritis se utilizó la tinción de hematoxilina y eosina. Para determinar la presencia de *Helicobacter spp* en muestras gástricas tomadas de la región antral, se utilizaron las tinciones de Giemsa, Warthin Starry y técnica inmunohistoquímica con anticuerpos comerciales anti- *helicobacter* Cell Marque Corporation, USA.

La detección de células G se realizó por técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos comerciales (anti gastrina Laboratorio Santa Cruz). Se determinó el porcentaje de células gastrina positivas en muestras con gastritis agudas y crónicas que tenían o no *Helicobacter* H (+)/H (-).

Para el estudio morfométrico de *Helicobacter spp* la tinción utilizada fue la de Warthin Starry. Las imágenes se tomaron con la cámara Canon Powershot G6 7.1 megapixels (Canon, Japón) adosada al microscopio Axio Vision Axio Vs40 V 4.6.3.0. Se contaron 100 microorganismos por muestra en un aumento de 1000 x.

Estudio microscópico de muestras gástricas de cerdos

Las muestras gástricas fueron sometidas a tinciones como hematoxilina-eosina y Giemsa, a través de ellas fue posible analizar las características estructurales de la mucosa gástrica y la presencia de *Helicobacter spp*.

El protocolo seguido es el que se detalla en el punto 3 de *Materiales y Métodos*.

En la Figura 29 se observa una biopsia gástrica, región antral teñida con hematoxilina-eosina con diagnóstico de gastritis. Se aprecia una lámina propia de tejido conectivo con abundante células inflamatorias.

En la Figura 30 podemos observar una biopsia gástrica, región glandular con diagnóstico de gastritis sometida a la coloración de Giemsa en la cual podemos observar la presencia de *Helicobacter spp*.

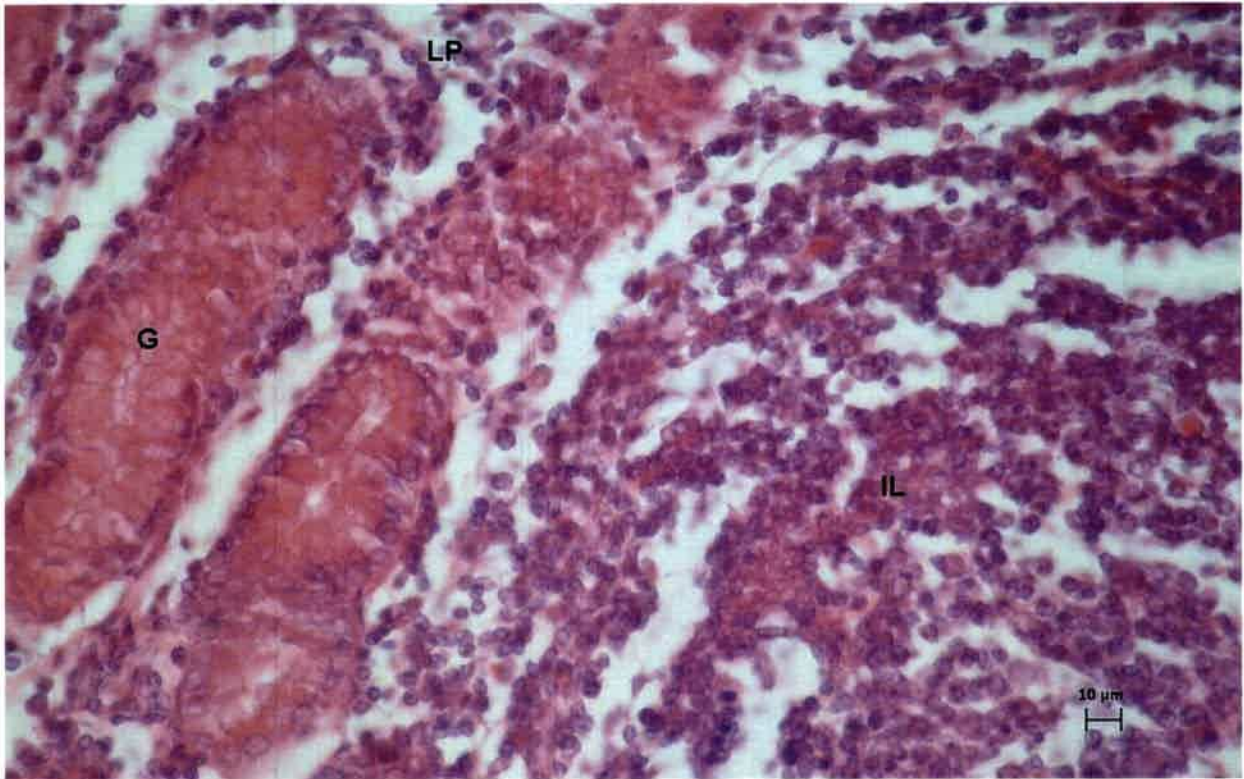


Figura 29 -Microscopía óptica de muestra gástrica, región antral con diagnóstico de gastritis. LP: lámina propia. G: glándula gástrica. IL: infiltrado leucocitario. Tinción H/E (400 x).

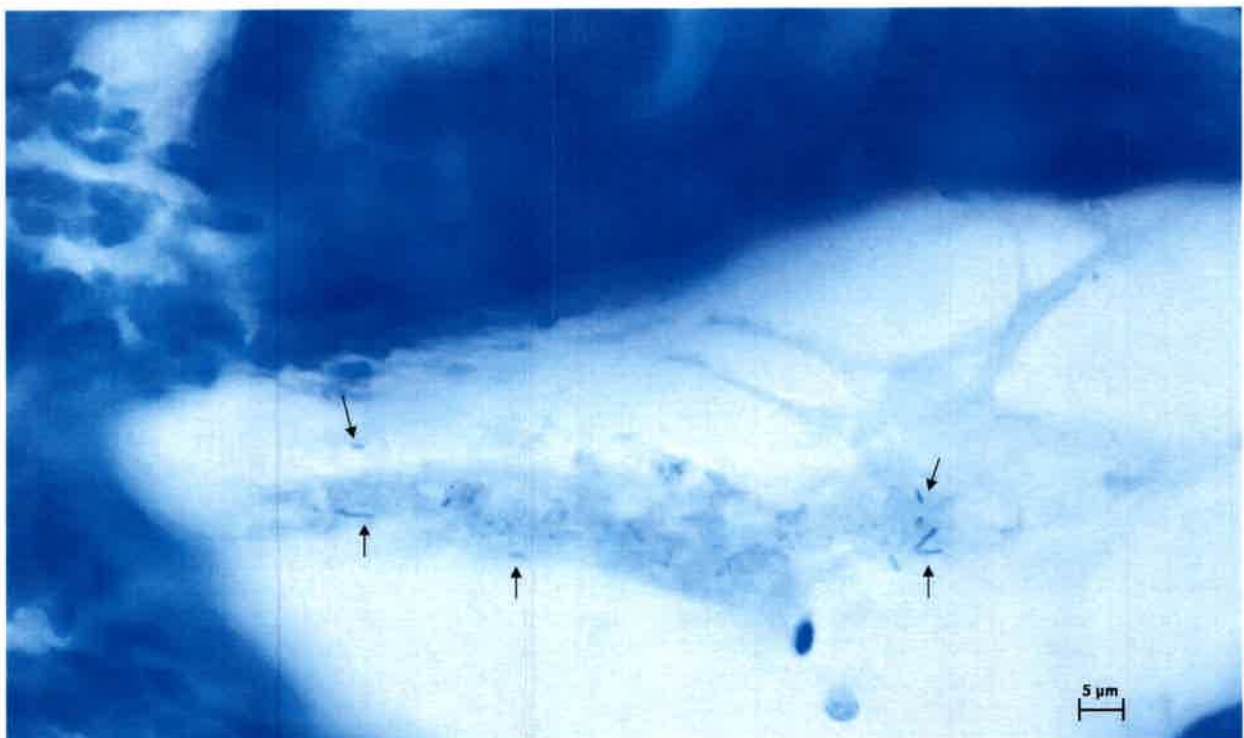


Figura 30 - Microscopía óptica de muestra gástrica, región antral con diagnóstico de gastritis H (+). *Helicobacter* spp. (flecha) . Tinción de Giemsa (1000 x).

Tinción Warthin-Starry

Para la detección de *Helicobacter spp.* las muestras fueron sometidas a la tinción de Warthin-Starry. En las Figuras 31 y 32 se observa la presencia de microorganismos morfológicamente compatibles con *Helicobacter sp*, en una muestra gástrica de la región antral.

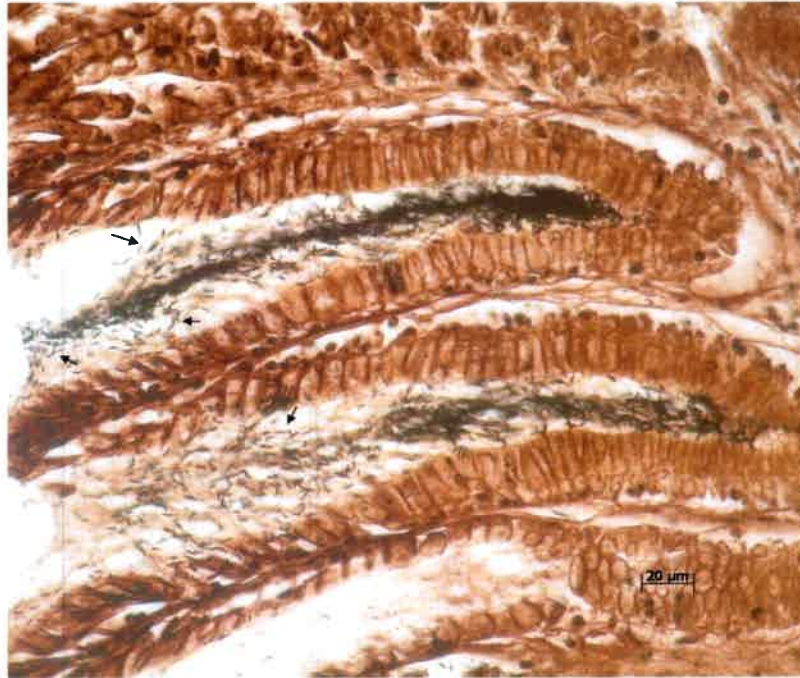


Figura 31- Microfotografía de muestra gástrica región antral coloreada con la tinción de Warthin-Starry en donde se observan *Helicobacter spp* (flecha), 400x.

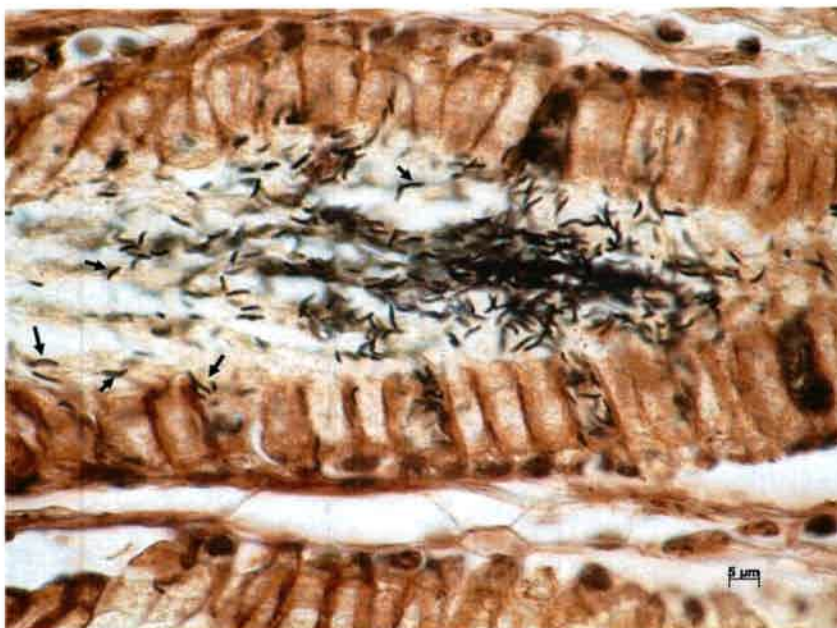


Figura 32- Microfotografía de muestra gástrica región antral con tinción de Warthin-Starry donde se observan *Helicobacter spp* (flecha), (1000x).

En la Figura 33 se aprecia, en una fosea gástrica, al menos dos tipos morfológicos diferentes de microorganismos pertenecientes al género *Helicobacter*, uno de mayor tamaño y morfología espiralada y otro de tamaño menor y con forma de S itálica.



Figura 33- Microfotografía de muestra gástrica región antral con tinción de Warthin-Starry donde se observan *Helicobacter spp.*, forma “s” itálica (rojo) forma espiralada y tamaño mayor (azul) (1000x).

Análisis morfométrico de diferentes especies de *Helicobacter*

A través del software AxioVision Axio Vs40 V 4.6.3.0 (Carl Zeiss, Alemania) se realizaron diferentes determinaciones morfométricas en los *Helicobacter* encontrados en las muestras gástricas de cerdos. Las variables analizadas fueron longitud y ancho de los microorganismos, las cuales se pueden apreciar en las Figuras 34 y 35. En cuanto a la variable longitud las mediciones iban desde 1 μm a 6 μm. En lo que respecta a la otra variable analizada ancho de microorganismo los valores se encontraron entre 0,4 μm a 1 μm. Analizando esta última variable encontramos que el 52,60 % de los microorganismos presentaban características compatibles con *Helicobacter pylori*; el 47,40% restante, características compatibles con *Helicobacter helmanni*.

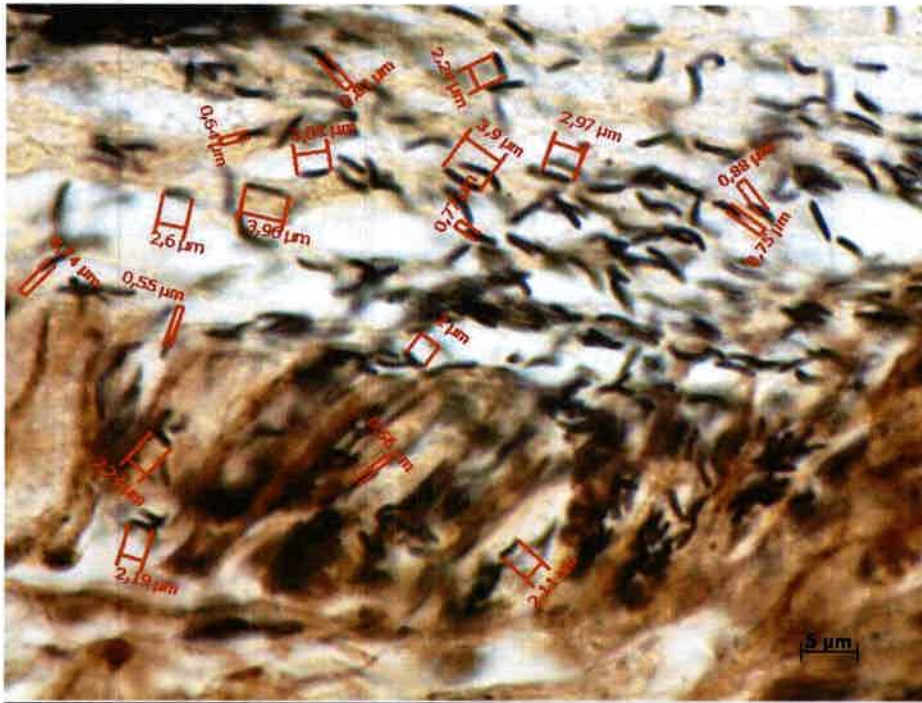


Figura 34- Mediciones morfométricas longitud y ancho de *Helicobacter* spp en muestra gástrica región antral con tinción de Warthin-Starry (1000x).

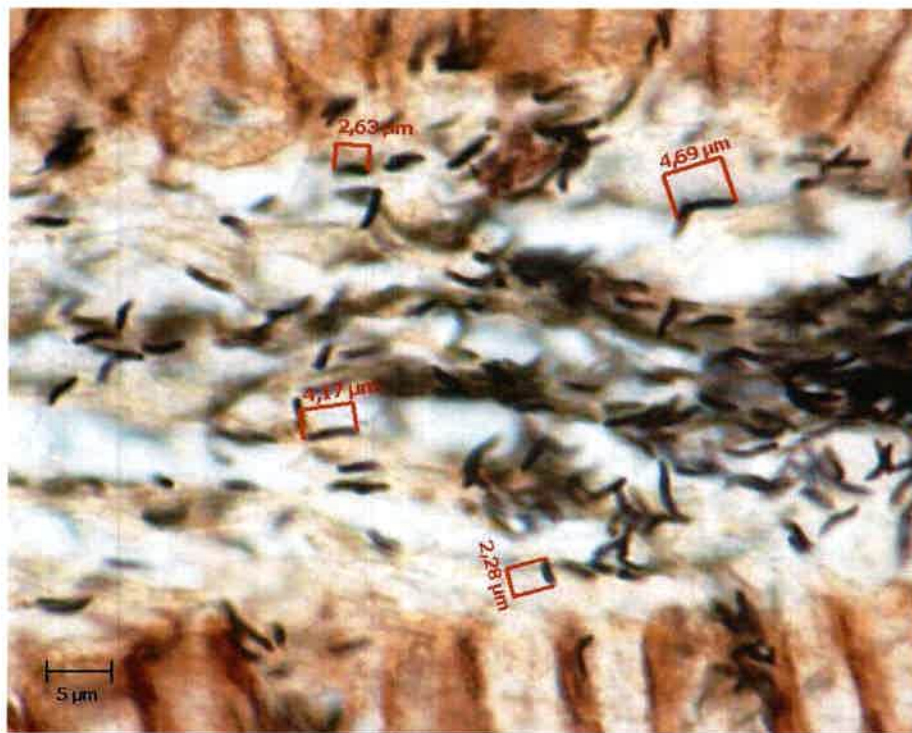


Figura 35- Microfotografía de mediciones morfométricas longitud de *Helicobacter* spp en muestra gástrica región antral con tinción de Warthin-Starry (1000x).

Tinción inmunohistoquímica

Las muestras fueron sometidas a tinciones inmunohistoquímicas para la detección de *Helicobacter spp.* y para células G productoras de gastrina con anticuerpos comerciales anti-*H.pylori* Cell Marque Corporation, USA y anti-gastrina laboratorio Santa Cruz.

En la Figura 36 observamos la inmunoexpresión de *Helicobacter spp.* en una biopsia gástrica, región glandular con diagnóstico de gastritis.

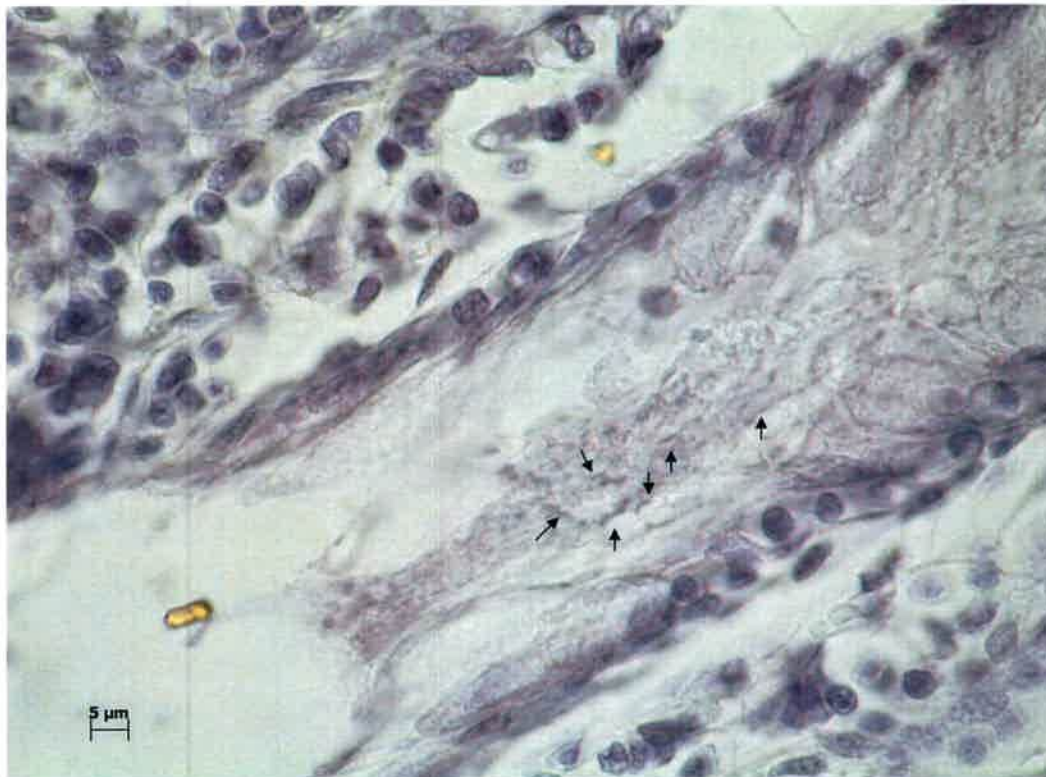


Figura 36- Inmunoexpresión de *Helicobacter spp* (flecha) coloración positiva con anticuerpos anti-*H. pylori* en muestra gástrica con diagnóstico de gastritis H (+) (1000x).

La Figura 37 muestra la presencia de una célula G productora de gastrina en una muestra gástrica región antral con diagnóstico de gastritis aguda con presencia de H(+). La célula G se observa en el epitelio glandular, con forma triangular, tipo cerrada con núcleo basal redondo, el cual se muestra poco teñido. Los gránulos se presentan distribuidos en forma semilunar alrededor del núcleo, mostrándose algunos intensamente teñidos.



Figura 37- Inmunoexpresión de célula productora de gastrina (*flecha*) en muestra gástrica con diagnóstico de gastritis aguda H (+) (1000x).

En la Figura 38 podemos observar la inmunodetección de célula G productora de gastrina en una muestra gástrica región antral con diagnóstico de gastritis crónica H(+). La misma se encuentra ubicada en el epitelio de la glándula gástrica presentando forma triangular, núcleo basal y gránulos citoplasmáticos intensamente teñidos. La célula pertenece a la de tipo cerrada.

En las muestras gástricas observadas se encontraron los dos tipos celulares cerradas y abiertas, las más abundantes correspondieron a las de tipo cerradas. La distribución de los gránulos en las células con inmunomarcación positiva mostraron cierta variación ya que los mismos no solo se ubicaron en la parte basal de la célula, sino también que se localizaron en otras áreas de la superficie celular. Algunos gránulos manifestaron aspecto grueso e intensamente teñidos, mientras que otros fueron más finos y débilmente teñidos. Sin embargo, en algunas células, los gránulos no evidenciaron diferencia alguna entre sí, mostrando una apariencia homogénea; mientras que en otras, la presencia de gránulos fue escasa.



Figura 38- Inmunoexpresión de células productoras de gastrina (*flecha*) coloración positiva con anticuerpos anti-gastrina en muestra gástrica con diagnóstico de gastritis crónica H (+) (1000x).

Las figuras 39, 40, 41 y 42 muestran las diferentes tinciones realizadas en biopsias gástricas humanas región antral utilizadas para el diagnóstico de gastritis, determinación de *Helicobacter spp* y técnicas inmunohistoquímicas para la detección de *Helicobacter spp* y de células productoras de gastrina.

En la figura 39 a) podemos observar una biopsia gástrica de la región antral en humanos con coloración de hematoxilina/eosina y diagnóstico de gastritis aguda, mientras que en la figura 39 b) observamos una biopsia región antral con diagnóstico de gastritis crónica.

La figura 40 nos muestra la inmunoexpresión de células productoras de gastrina en biopsias gástricas región antral con diagnóstico de gastritis aguda y crónicas .

En la figura 41 se aprecia la presencia de *Helicobacter spp*. Figura 41 a) muestra *Helicobacter spp* con coloración de Giemmsa mientras que la fig 41 b) observamos la inmunomarcación de estos microorganismos con anticuerpo anti-*Helicobacter pylori*.

Através de la tinción de Warthin-Starry figura 42 podemos observar microorganismos compatibles con *Helicobacter spp* en la región antral de biopsias gástricas humanas.

En las figuras 43, 44, 45 y 46 podemos apreciar en las muestras gástricas de cerdo tomadas de la región antral las diferentes tinciones realizadas para el diagnóstico de gastritis, determinación de *Helicobacter spp*. La detección de *Helicobacter spp*. y células productoras de gastrina se realizó por técnica inmunohistoquímica.

En la figura 43 a) se observa una biopsia gástrica de la región antral sometida a la coloración de hematoxilina/eosina con diagnóstico de gastritis aguda, mientras que en la figura 39 b) observamos una biopsia región antral con diagnóstico de gastritis crónica.

La figura 44 a) nos muestra la presencia de *Helicobacter spp*. con tinción de Giemmsa mientras que en la fig 44 b) observamos la inmunomarcación de *Helicobacter spp* con anticuerpo anti-*H. pylori*.

En la figura 45 observamos en biopsias gástricas región antral con diagnóstico de gastritis aguda y crónicas .la inmunoexpresión de células productoras de gastrina.

Con la tinción de Warthin-Starry figuras 46 a) y 46 b) se aprecia la presencia de *Helicobacter spp* en la región antral de una muestra gástrica de cerdos.

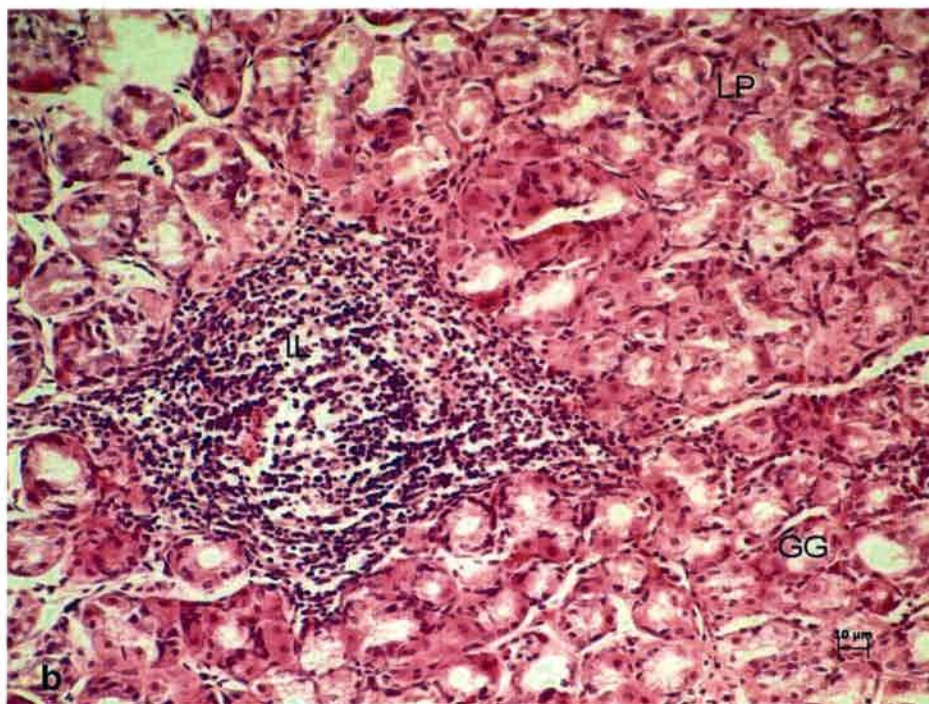
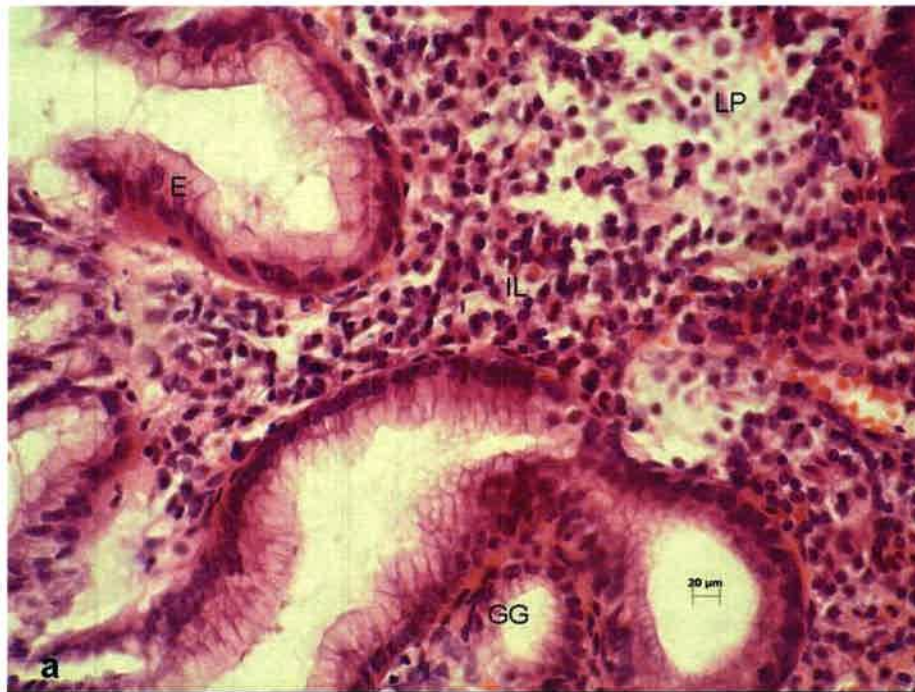


Figura 39 – Microfotografías de biopsias gástricas humanas de la región antral. a) Gastritis aguda coloreada con hematoxilina-eosina; b) Gastritis crónica coloreada con hematoxilina-eosina. E: epitelio, GG: glándula gástrica, IL: infiltrado leucocitario, LP: lámina propia. a) 400x; b) 200x.

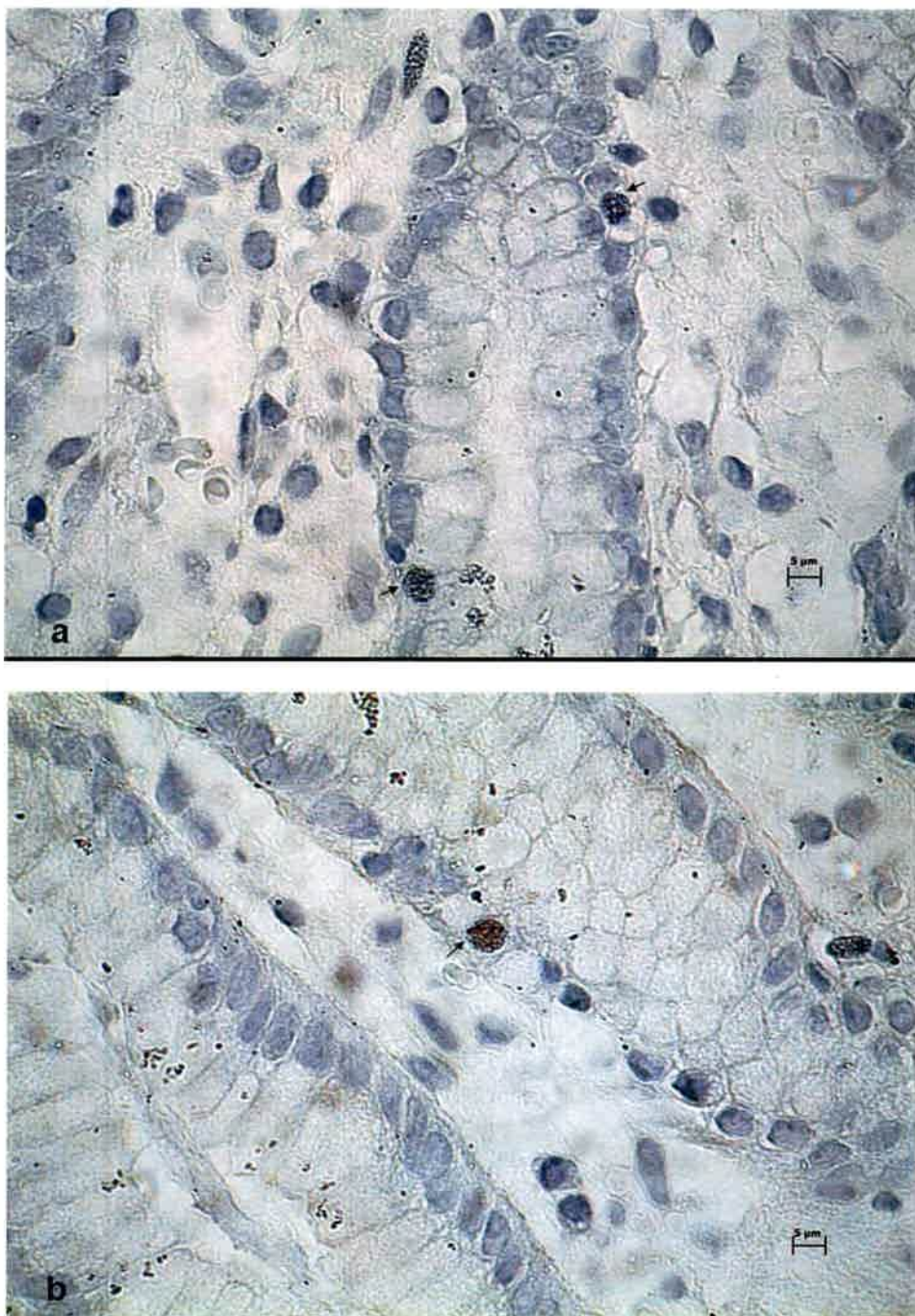


Figura 40– Microfotografías de biopsias gástricas humanas de la región antral. a) Inmunoexpresión de célula G (flecha) en una gastritis aguda; b) Inmunoexpresión de célula G (flecha) en una gastritis crónica a) y b)1000x.

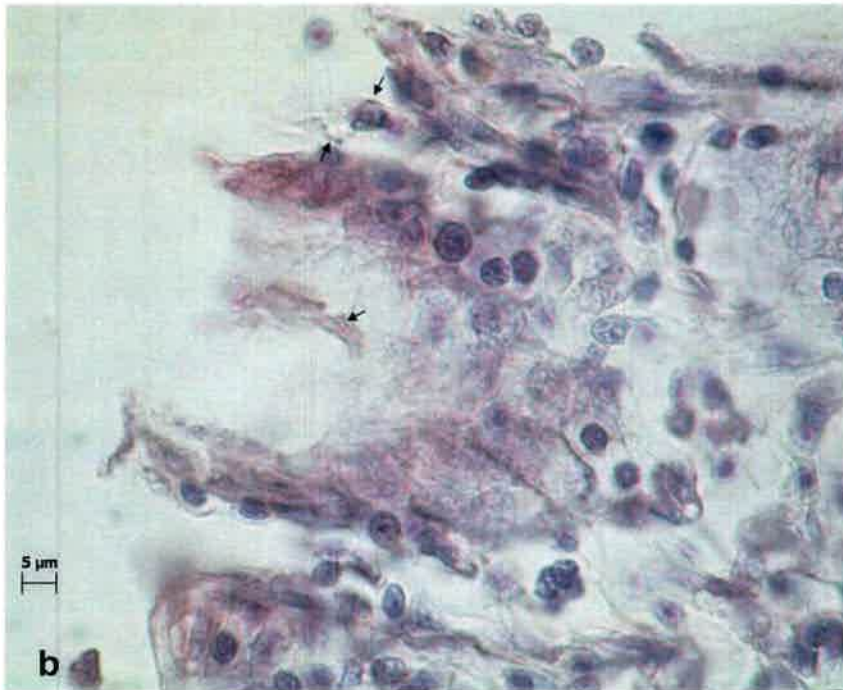
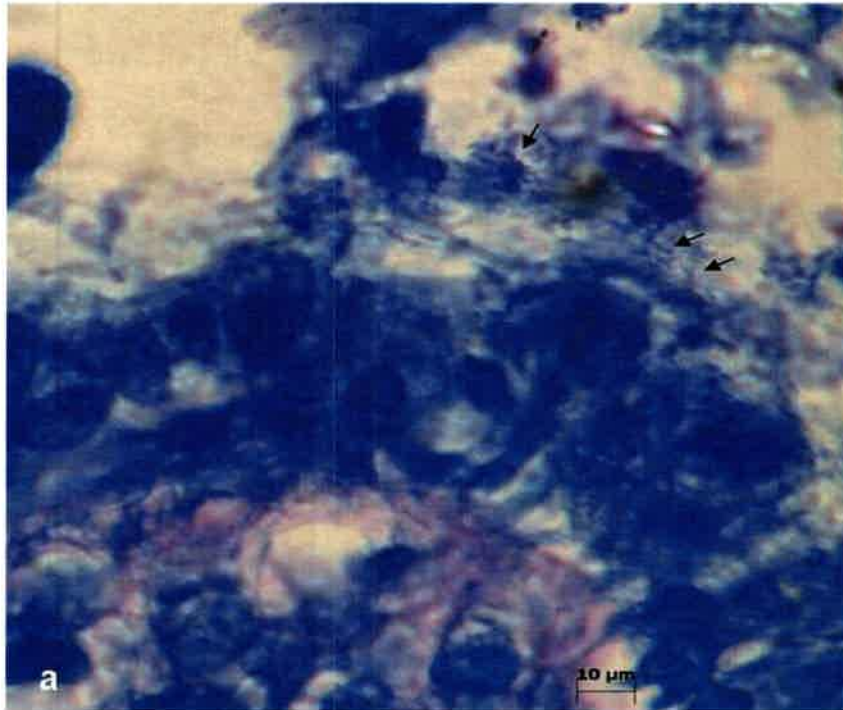


Figura 41 – Microfotografías de biopsias gástricas humanas de la región antral. a) Observación de *Helicobacter spp* (flecha) con Giemsa; b) Inmunomarcación de *Helicobacter spp* (flecha). 1000x.

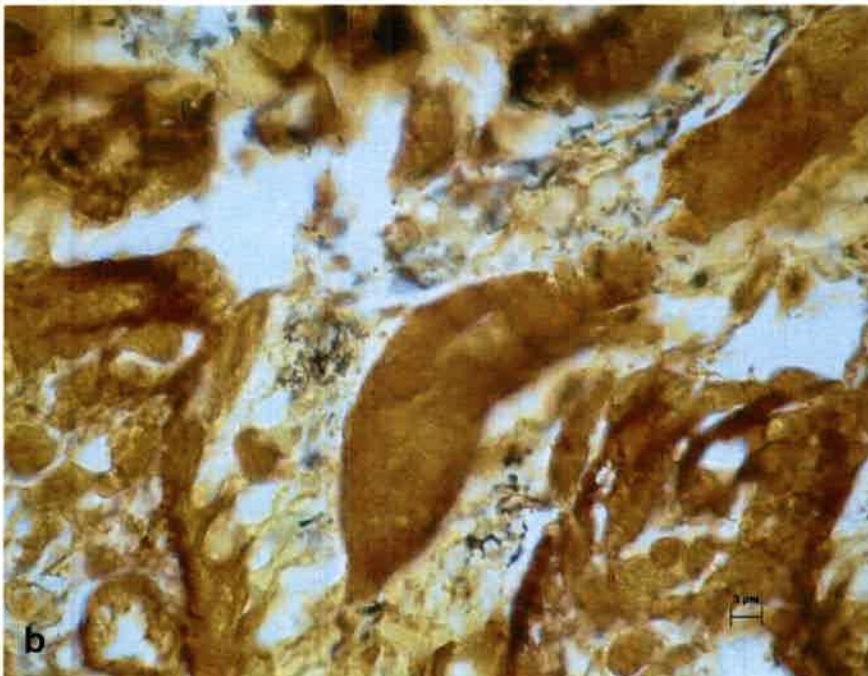
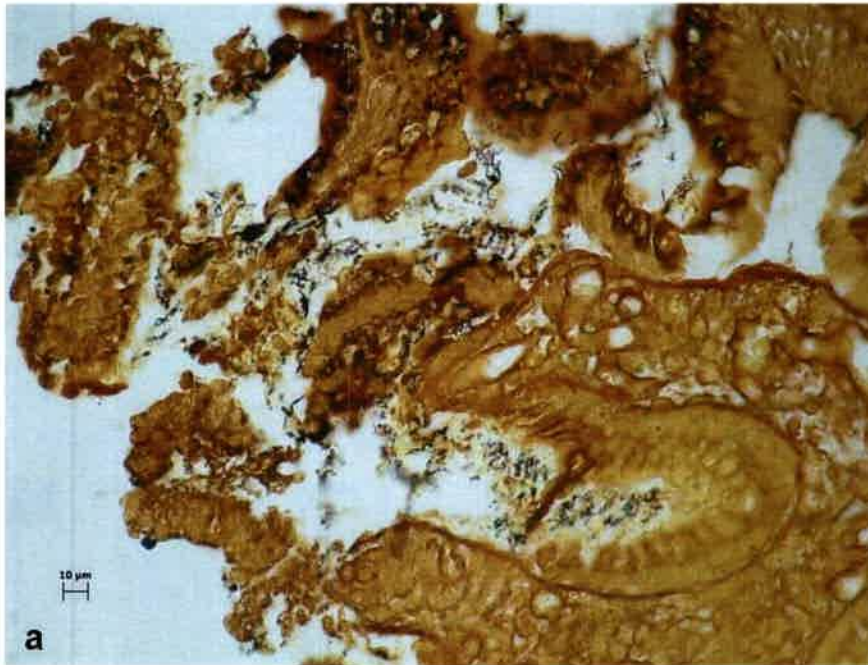


Figura 42 – Microfotografías de biopsias gástricas humanas de la región antral. a) y b) Observación de *Helicobacter spp* a través de la tinción de Warthin-Starry. g) 400x, h) 1000x.

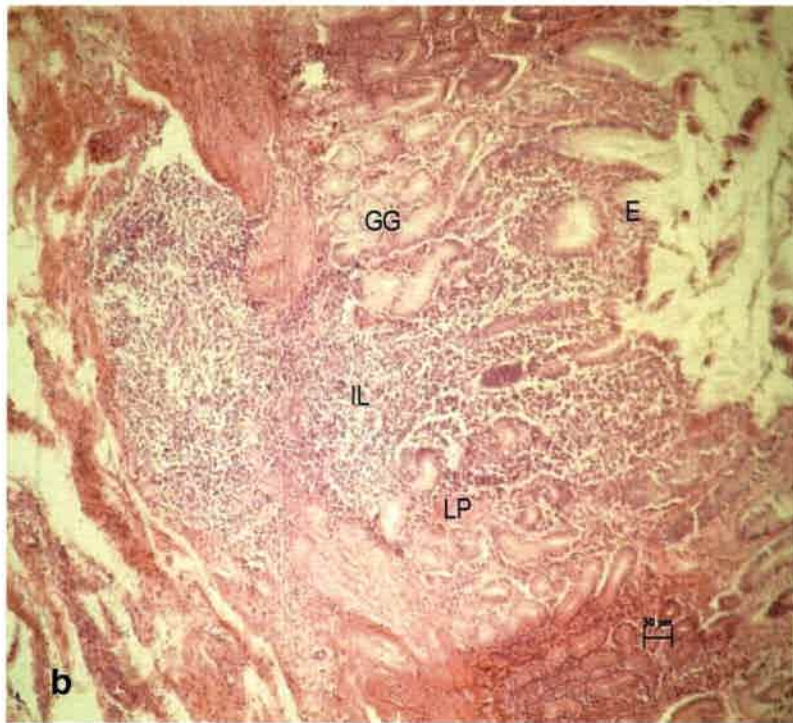
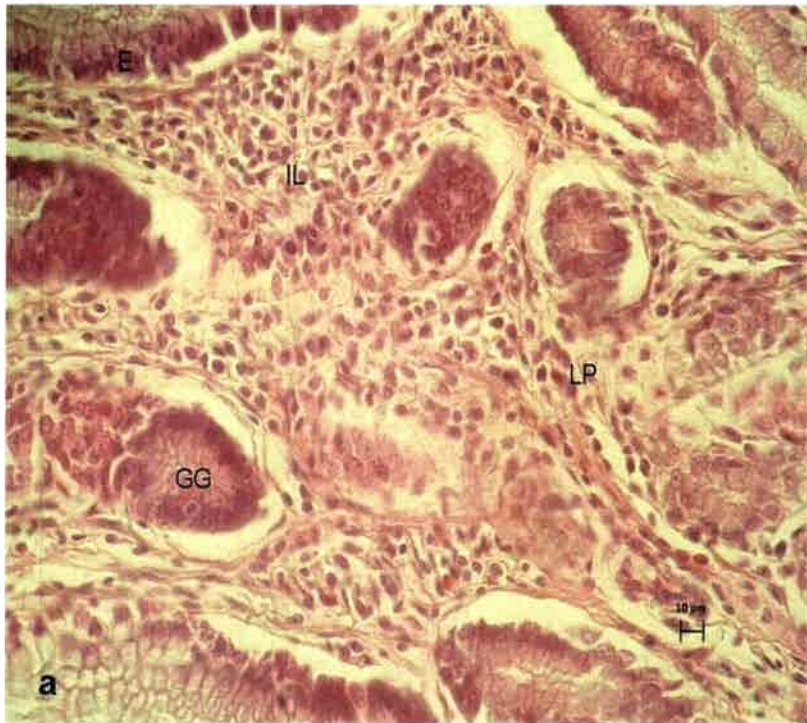


Figura 43 – Microfotografías de muestras gástricas de cerdos de la región antral. a) Gastritis aguda coloreada con hematoxilina-eosina; b) Gastritis crónica coloreada con hematoxilina-eosina. E: epitelio, GG: glándula gástrica, IL: infiltrado leucocitario, LP: lámina propia. a) 200x, b) 100x.

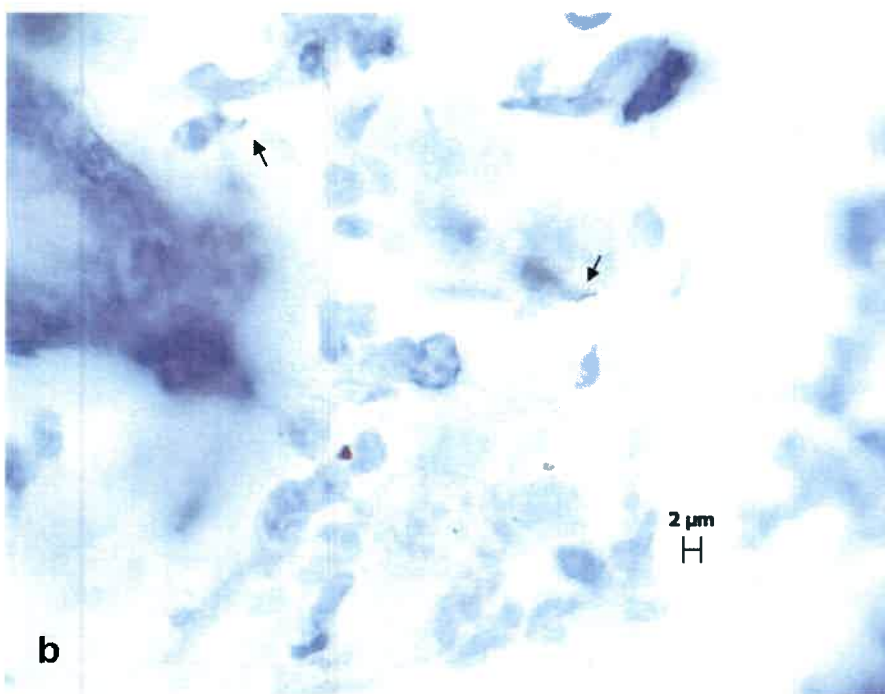
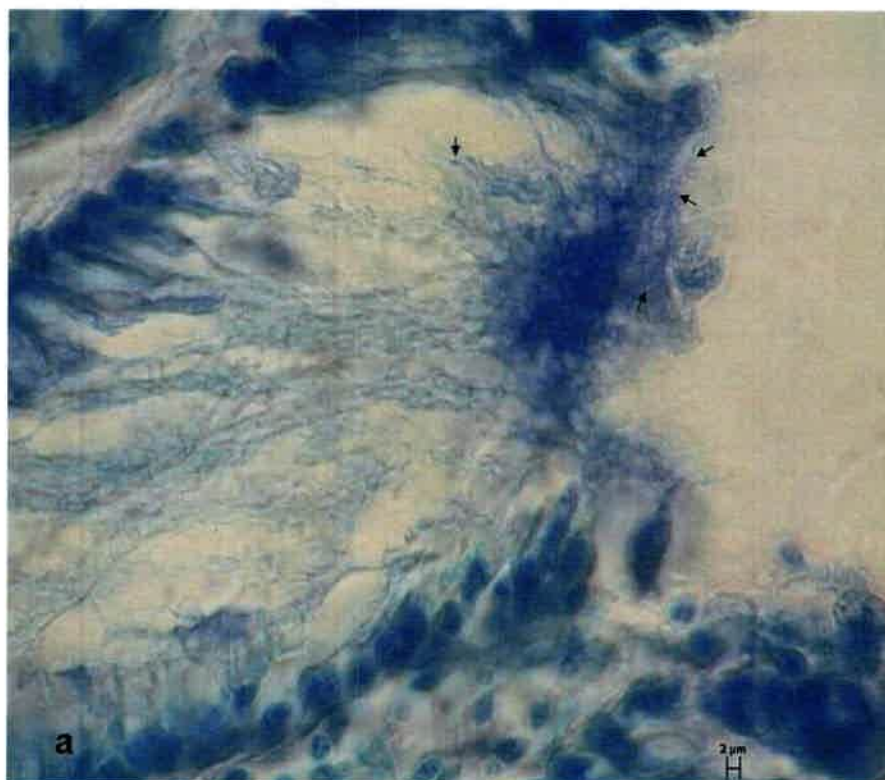


Figura 44– Microfotografías de muestras gástricas de cerdos de la región antral. a) Observación de *Helicobacter spp* (flecha) con Giemsa; b); Inmunomarcación de *Helicobacter spp* (flecha). a) y b) 1000x.



Figura 45 – Microfotografías de muestras gástricas de cerdos de la región antral. a) Inmunoexpresión de célula G (flecha) en una gastritis aguda; b) Inmunoexpresión de célula G (flecha) en una gastritis crónica; a) y b) 1000x.

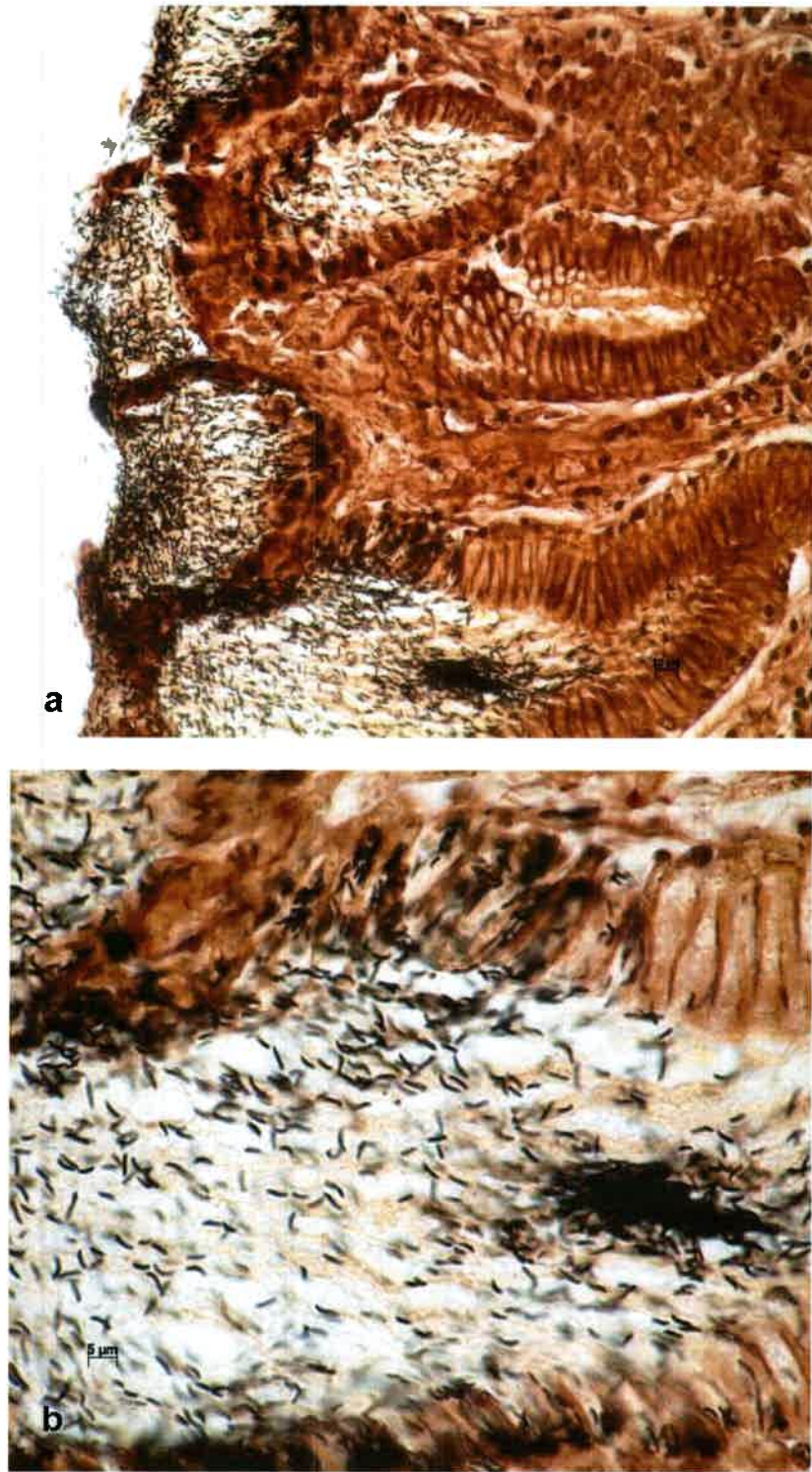


Figura 46 – Microfotografías de muestras gástricas de cerdos de la región antral. a) y b) Observación de *Helicobacter spp* a través de la tinción de Warthin-Starry. a) 400x, b) 1000x.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.1. Prueba t

Biopsias gástricas humanas

Para realizar el estudio estadístico en muestras sometidas a la tinción inmunohistoquímica, se procedió a contar la cantidad de células gastrina positivas tomando 5 campos al azar. Se determinó el porcentaje de células positivas a gastrina y se realizó una Prueba t para muestras independientes.

Cuando se evaluó el porcentaje de células gastrina positivas en mujeres con gastritis, que tenían o no Helicobacter se observó que existían diferencias significativas entre los valores medios poblacionales, siendo mayor en las mujeres con presencia de Helicobacter ($p=0,03$).

En muestras de mujeres con gastritis Helicobacter positivas divididas en dos grupos etarios (30-50 y 50-70 años) no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,55$).

En las muestras gástricas de hombres gastritis Helicobacter positivas y negativas los resultados nos confirman que existen diferencias significativas en el porcentaje de células positivas a gastrina ($p=0,05$).

Cuando se evaluó hombres con gastritis Helicobacter positivas divididas en dos grupos etarios (30-50 y 50-70 años) no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,53$).

Además, al evaluar en conjunto todas las muestras de hombres y mujeres con gastritis y Helicobacter, tampoco se observó diferencias significativas en el porcentaje de células G ($p=0,55$).

En aquellas muestras con diagnóstico de gastritis agudas y crónicas positivas a Helicobacter, la Prueba t determinó que no existen diferencias significativas entre estos tipos de gastritis ($p=0,66$). Sin embargo, en las gastritis agudas y crónicas con ausencia de Helicobacter se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas, siendo mayor el porcentaje de células G en la población de individuos con gastritis crónica ($p=0,016$).

Los análisis realizados a biopsias gástricas con gastritis agudas con y sin Helicobacter, y a biopsias gástricas con gastritis crónicas con y sin Helicobacter demuestran que el % de células positivas a gastrina es mayor en las muestras con presencia de Helicobacter ($p=0,0001$ y $p=0,0004$, respectivamente).

Al comparar muestras de gastritis agudas y crónicas en presencia de *Helicobacter* con respecto a mucosas normales, el porcentaje de células gastrina positivas fue mayor en las muestras gástricas *Helicobacter* positiva ($p=0,0001$, $p<0,0001$).

No existen diferencias estadísticamente significativas entre mucosa normal y gastritis aguda H(-) en humanos ($p=0,74$). Sin embargo, al estudiar el % de células gastrina positivas entre gastritis crónica H(-) y mucosa normal se evidenció un mayor porcentaje de células G en las muestras gástricas con gastritis crónica ($p=0,0137$).

Tabla IV: Análisis estadísticos: Prueba t % de células productoras de gastrina en biopsias gástricas humanas.

Análisis	Grupos	Presencia(+)/Ausencia(-) <i>Helicobacter</i>	Prueba t % células gastrina positivas
1	Mujeres gastritis Mujeres gastritis	+ -	$p=0,03$
2	Mujeres gastritis aguda (30-50) Mujeres gastritis aguda (50-70)	+ +	$p=0,55$
3	Hombres gastritis Hombres gastritis	+ -	$p=0,05$
4	Hombres gastritis aguda (30-50) Hombres gastritis aguda (50-70)	+ +	$p=0,53$
5	Mujeres gastritis Hombres gastritis	+ +	$p=0,55$
6	Gastritis agudas Gastritis crónica	+ +	$p=0,66$
7	Gastritis agudas Gastritis crónica	- -	$p=0,016$
8	Gastritis agudas Gastritis agudas	+ -	$p=0,0001$

9	Gastritis crónica Gastritis crónica	+ -	p=0,0004
10	Gastritis agudas Mucosa normal	+ -	p=0,0001
11	Gastritis crónica Mucosa normal	+ -	p<0,0001
12	Gastritis agudas Mucosa normal	- -	p=0,74
13	Gastritis crónica Mucosa normal	- -	p=0,0137

Muestras gástricas de cerdos

Al evaluar el porcentaje de células gastrina positivas en muestras con gastritis agudas que tenían o no *Helicobacter* se observó que no existen diferencias significativas ($p=0,38$). Sin embargo, en muestras con gastritis crónicas positivas y negativas a *Helicobacter*, el primer grupo mostró los mayores porcentajes de células positivas a gastrina ($p<0,0001$).

Al comparar muestras con gastritis agudas y gastritis crónicas positivas a *Helicobacter*, los resultados nos confirman que en estos grupos existen diferencias estadísticamente significativas, mostrando mayor porcentaje de células positivas a gastrina en las biopsias con gastritis crónica ($p<0,0001$).

Por otra parte, se evaluaron los porcentajes de células gastrina positivas en muestras con diagnóstico de gastritis agudas y crónicas sin presencia de *Helicobacter*. La prueba t determinó que las biopsias gástricas presentan un mayor porcentaje de células productoras de gastrina ($p=0,0018$).

Además, al comparar muestras de mucosa normal y muestras con diagnóstico de gastritis aguda *Helicobacter* (+), entre ellas se observó que en el % de células positivas a gastrina no existían diferencias estadísticamente significativas ($p=0,99$).

Mientras tanto, los resultados estadísticos entre muestras con mucosa normal y gastritis crónica con presencia de *Helicobacter* demuestran que en el % de células positivas a gastrina existen diferencias estadísticamente significativas, mostrando los mayores valores en las muestras gástricas con gastritis crónica ($p=0,0002$).

Sin embargo, al comparar mucosa normal con gastritis aguda *Helicobacter* (-) y mucosa normal con gastritis crónica *Helicobacter* (-), los resultados estadísticos indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,40$ y $p=0,06$, respectivamente).

Tabla V: Análisis estadísticos: Prueba t % de células productoras de gastrina en muestras gástricas de cerdos.

Análisis	Grupos	Presencia(+)/Ausencia(-) <i>Helicobacter</i>	Prueba t % células gastrina positivas
1	Gastritis aguda Gastritis aguda	+ -	p=0,3895
2	Gastritis crónicas Gastritis crónicas	+ -	p<0,0001
3	Gastritis aguda Gastritis crónica	+ +	p<0,0001
4	Gastritis aguda Gastritis crónica	- -	p=0,0018
5	Gastritis agudas Mucosa normal	+ -	p=0,9954
6	Gastritis crónica Mucosa normal	+ -	p=0,0002
7	Gastritis agudas Mucosa normal	- -	p=0,4025
8	Gastritis crónica Mucosa normal	- -	p=0,0653

Biopsias gástricas humanas/muestras gástricas cerdos

Las evaluaciones realizadas en biopsias humanas y muestras gástricas de cerdos con diagnóstico de gastritis agudas con presencia de *Helicobacter* el valor $p=0,0042$ permitió establecer que en este tipo de muestras existen diferencias significativas. El mayor porcentaje de células productoras de gastrina fue en humanos, con un 4% más.

El porcentaje de células gastrina positivas en muestras con diagnóstico de gastritis crónicas con presencia de *Helicobacter*, determinan que entre ambas especies existen diferencias significativas en el % de células productoras de gastrina ($p=0,0317$), siendo el cerdo el que posee un mayor % de células G, alrededor de un 2 % más.

En los análisis realizados con muestras gástricas *Helicobacter* (-) y mucosas normales no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre las especies estudiadas.

Tabla VI: Análisis estadísticos: Prueba t % de células productoras de gastrina en biopsias gástricas humanas y muestras gástricas de cerdos.

Análisis	Grupos	Presencia(+)/Ausencia(-) <i>Helicobacter</i>	Prueba t % células gastrina positivas
1	Gastritis aguda humana Gastritis aguda cerdos	+ +	$p=0,0042$
2	Gastritis crónicas humana Gastritis crónicas cerdos	+ +	$p=0,0317$
3	Gastritis agudas humana Gastritis agudas cerdos	- -	$p=0,55$
4	Gastritis crónicas humana Gastritis crónicas cerdos	- -	$p=0,21$
5	Mucosa normal humana Mucosa normal cerdos	- -	$p=0,84$

5.2. Análisis de la varianza

En humanos, se detectaron diferencias estadísticas significativas entre pacientes *Helicobacter* (+) con gastritis aguda, gastritis crónica y mucosa normal ($p=0,0001$). Las biopsias gástricas que presentaban mucosa normal mostraron el menor porcentaje de células gastrina positiva, mientras que no se observan diferencias entre gastritis aguda y crónica ($p > 0,05$).

Por otra parte, se hallaron diferencias significativas en biopsias gástricas *Helicobacter* (-) con gastritis aguda, gastritis crónica y mucosa normal ($p=0,0118$). El mayor porcentaje de células gastrina positiva se expresó en las biopsias con gastritis crónica. No se observaron diferencias entre gastritis aguda y mucosa normal ($p > 0,05$).

En cerdos, diferencias estadísticamente significativas se detectaron en el porcentaje de células G de muestras gástricas con presencia de *Helicobacter* entre individuos con gastritis aguda, gastritis crónica y mucosa normal ($p<0,0001$). Los cerdos con gastritis crónica presentaron los mayores porcentajes de células gastrina positivas, no hallándose diferencias entre los cerdos con gastritis aguda y mucosa normal ($p>0,05$).

Además, existen diferencias significativas entre los porcentajes de células gastrina positivas de cerdos *Helicobacter* (-) con gastritis aguda, crónica y mucosa normal ($p<0,0001$). Los mayores porcentajes se observaron en aquellas muestras con gastritis crónica, no detectándose diferencias entre gastritis aguda y mucosa normal ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

La gastritis, se define como la inflamación de la mucosa gástrica. Las diferencias entre los diversos tipos de gastritis está relacionada a los diferentes tipos de mucosa que presenta el estómago: por un lado la mucosa fúndica que ocupa el cuerpo y el fundus, y por otro lado la mucosa pilórica que ocupa la zona antral y pilórica (Morales Espinosa *y col.*, 1999; Mulet *et al.*, 2005).

Diversos estudios anatomopatológicos actuales sobre la gastritis, basados en la clasificación del sistema Sidney, en su división histológica, han permitido describir diferentes tipos de inflamación de la mucosa gástrica (Farreras and Rozman, 2009).

La clasificación actualizada de Sydney esta basada en hallazgos endoscópicos, histológicos, etiológicos, topográficos y grado de daño en su división histológica. Estos hallazgos, han permitido describir diferentes tipos de inflamación de la mucosa gástrica, de esta manera, se logra dividir a las gastritis en agudas, crónicas y formas específicas de gastritis, como así también a las gastritis provocadas por la presencia del *Helicobacter* (Valdivia Roldán, 2011). Sin embargo, pueden utilizarse otros criterios para la clasificación de las gastritis, una de ellas es la clasificación anatomopatológica basada en su presentación, prevalencia y etiología. Otro tipo de clasificación se basa en criterios etiológicos, endoscópicos y patológicos (Valdivia Roldán, 2011). Aunque el sistema Sydney es útil para propósitos de investigación, su aplicabilidad en la práctica clínica es limitada por la cantidad de biopsias requeridas de varias regiones del estómago y por la complejidad de su escala de graduación del daño histológico. Es por ello que si bien el sistema de Sydney es citado ampliamente, algunas investigaciones proponen como sistema de clasificación al sistema OLGA, que emplea el protocolo de muestras de biopsias y la escala visual analógica (EVA) recomendados por la versión actualizada de Houston del sistema de Sydney (Rugge *et al.*, 2007; Otero Regino, 2010). En nuestro estudio, la interpretación histológica de las biopsias gástricas humanas se realizó de acuerdo al sistema Sydney, adaptado por el Servicio de anatomopatología del Nuevo Hospital de Rio Cuarto, donde se tiene en cuenta entre otras características a la arquitectura del órgano, las células epiteliales, el infiltrado leucocitario y la presencia de *Helicobacter*. Para el diagnóstico de las muestras gástricas de cerdo, también se procedió de acuerdo a los criterios establecidos según la clasificación propuesta por sistema Sidney modificado, teniendo en cuenta el grado de gastritis y el tipo de infiltrado (agudo o crónico). En los casos de gastritis con infección por *Helicobacter* se consideró el diagnóstico histológico positivo, cuando se observaron formas bacterianas morfológicamente compatibles con este microorganismo.

Histopatológicamente, la gastritis consiste en la presencia de un infiltrado leucocitario donde se destacan, neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y a veces eosinófilos en la lámina

propia, junto con otras lesiones dependiendo del grado de gastritis. Las descripciones de las gastritis provocadas por *Helicobacter spp* se basan en la presencia de células inflamatorias, el grado de actividad de la inflamación, presencia de atrofia, metaplasia y de la densidad de colonización del *Helicobacter spp*. (Mulet *et al.*, 2005). La presencia del *Helicobacter* en la mucosa gástrica desencadena la respuesta inmunológica antes mencionada. Según su intensidad y persistencia, la misma puede acarrear trastornos mecánicos y secretorios tales como hipergastrinemia y disminución de la producción de somatostatina ambos trastornos conducen a un daño de la mucosa del duodeno, que pueden evolucionar hasta una úlcera duodenal (Mulet *et al.*, 2005).

En nuestro estudio en muestras gástricas de humanos las lesiones encontradas concuerdan con las descripciones de lesiones correspondientes a gastritis agudas con infiltrado principalmente de neutrófilos y gastritis crónicas donde el infiltrado observado es predominantemente de células mononucleares.

Las lesiones histopatológicas encontradas en humanos y en cerdos revelan la existencia de un proceso de patogenia común, si bien, algunos autores aseguran la similitud morfológica entre las úlceras porcinas y la humana, esto no implica una patogenia similar, pero si sugieren la presencia de mecanismos comunes para su desarrollo (Eaton *et al.*, 1992; Rodriguez *y col.*, 2009). En el cerdo la aparición de las lesiones causadas por *H. spp* es controversial, mientras que para algunos investigadores la infección por este microorganismo provoca en el antro, una infiltración de células mononucleares de manera difusa y leve con agregado linfocítico o folículos linfoides en la lámina propia (Queiroz *et al.*, 1990) para otros, las lesiones observadas en el antro se destacan por un infiltrado leucocitario granulocítico leve con presencia de exudado neurofílico en el lumen de las glándulas gástricas aunque no aseveran que la presencia de este infiltrado sea propio de la infección por esta bacteria (Park *et al.*, 2004). Hellemans *et al.*, 2007, al inocular cerdos con *H suis* obtenidos de ratones, establece que si bien el proceso patológico inducido por la infección con *Helicobacter* es similar en cerdos y en humanos, el tipo de lesión inflamatoria primaria es diferente. En humanos, los neutrófilos componen en su mayor parte al infiltrado inflamatorio, mientras que en cerdos se observan linfocitos y células plasmáticas como células principales de la inflamación, como así también la presencia de folículos linfáticos, esto sugiere una respuesta inflamatoria más específica por parte del huésped. Mendes *et al.*, 1990 describe en cerdos infectados de manera natural con *H suis* la presencia de un infiltrado difuso de células mononucleares con infiltrado neutrofilico ocasional y folículos linfoides en la región del antro. Por otro lado, cerdos infectados experimentalmente con *H. suis* presentaron lesiones compatibles a gastritis crónicas y lesiones neoplásicas como displasia gástrica e hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosas (Park *et al.*, 2003; Rodriguez *y col.*, 2008). Modelos de estudio en ratones de tipo salvaje (C57BL) inoculados con *H. pylori* y *H. felis* establecen que mientras en los humanos la gastritis provocadas por *H. pylori*

se caracterizan por una inflamación con infiltrado de tipo neutrófilico y con presencia de células mononucleares, los ratones inoculados con estas especies de *Helicobacter* presentaron una respuesta inflamatoria con una marcada presencia de mononucleares. Las lesiones provocadas en la mucosa gástrica fueron de un alto daño a nivel celular epitelial. El *H. felis* indujo a una inflamación mas severa en este tipo de ratones que la provocada por *H. pylori*. (Thompson *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2007). Contrariamente en gerbos de Mongolia las inoculaciones experimentales con *H. pylori* inducen una respuesta inflamatoria temprana muy similar a la ocurrida en humanos, llegando a reproducir lesiones tales como gastritis severas, metaplasia intestinal, úlceras gástricas y cáncer gástrico (Zengh *et al.*, 2004, Zang and Moss, 2012). Sin embargo, en cerdos inoculados con cepas de *H. suis* obtenidas de ratones, las lesiones inflamatorias observadas en la mucosa gástrica se referían a un infiltrado de tipo mononuclear, el tipo de lesión se comprobó que era mas severa en los cerdos inoculados experimentalmente que en cerdos infectados de manera natural (Eaton *et al.*, 1992; Friendship, 2003, Hellemans *et al.*, 2007).

Mulet *et al.*, 2005 establece que los factores que determinan que en algunos animales las lesiones de gastritis crónica permanezcan estables por periodos de tiempo muy prolongados, y en otros evolucionan en una rápida progresión hacia la atrofia, no son bien conocidos. Se cree que están muy relacionados con la heterogeneidad genómica del *Helicobacter* como así también con la susceptibilidad del huésped y las características de la respuesta inmune. Esto en concordancia con los trabajos de otros autores que sugieren que el *H. pylori* no puede asociarse solo únicamente a las gastritis crónicas sino que está en estrecha relación a la severidad de la lesión (Mulet *et al.*, 2005; Bondi, 2006; Cárdenas *et al.*, 2007).

A través de los estudios histopatológicos, nuestros resultados, tanto en biopsias gástricas de humanos como en muestras gástricas de cerdos, corroboran lo detectado por otros investigadores en donde se observó la presencia de un infiltrado leucocitario y de lesiones compatibles con gastritis agudas y crónicas. Estas lesiones pudieron ser comprobadas a través de tinciones histológicas convencionales como hematoxilina/eosina (Rodriguez y *col.*, 2008).

En los cerdos encontramos lesiones compatibles con gastritis agudas y crónicas tales como descritas en los trabajos realizados por Rodriguez y *col.*, 2009. Con respecto a la presencia de úlceras gástricas, investigaciones realizadas en cerdos indican que el patrón morfológico y los cambios inflamatorios de la úlcera gástrica porcina hallados son similares a los observados en humanos, excepto por su localización, que predomina en la *pars oesophagea* en el cerdo y en el bulbo duodenal y la mucosa prepilórica en el humano (Fawcet *et al.*, 1999; Rodriguez y *col.*, 2008). La diferencia en la localización de las úlceras en las dos especies puede explicarse por la presencia de un epitelio no secretor incapaz de producir moco para proteger la mucosa mediante mecanismos de tampón al efecto de la acidez gástrica. Las lesiones histopatológicas encontradas en los

estómagos de cerdo, en nuestro estudio concuerdan con las investigaciones de Rodríguez *y col.*, 2008 y en 2009, en las biopsias gástricas de cerdos evaluadas se encontró una mayor proporción de lesiones crónicas que agudas.

Para la determinación de *Helicobacter spp* en las biopsias gástricas de humanos y cerdos, la técnica histológica utilizada reveló la presencia de bacterias espiraladas que concuerdan con las descripciones previas de *Helicobacter spp*. Coincidiendo con otros autores para la detección de este microorganismo resultó apropiada la utilización de una técnica simple, rápida y económica, como es la de Giemsa, que permitió la visualización evidente del agente patógeno (Delgado *et al.*, 2007).

A través de la técnica inmunohistoquímica pudimos realizar la inmunodetección de microorganismos que corresponden al género *Helicobacter* en todas las biopsias gástricas estudiadas. Sin embargo, coincidimos con otros autores que dicha técnica de rutina no debe utilizarse, debido a los altos costos, al tiempo de realización y a la necesidad de contar con personal especializado. Dicha técnica debe utilizarse juiciosamente y queda supeditada a realizarla en determinadas situaciones (Shukla *et al.*, 2012). En concordancia con Rodríguez *y col.*, 2008 la inmunodetección de *Helicobacter* ocurrió en el epitelio, en el interior de las fosetas gástricas y en las glándulas gástricas tanto en las muestras de humanos como las de cerdos.

En lo que respecta al procesamiento de las muestras, previa a la realización de la técnica inmunohistoquímica, muchos autores recomiendan la utilización de reactivos que permitan una mejor adhesión del material a estudiar, debido a que dicha técnica en su protocolo de realización presenta una serie de pasos y un tiempo prolongado de procesamiento llevando, muchas veces, a la pérdida del material a evaluar. Debido a esto, en nuestro estudio aplicamos diferentes métodos de adhesión, la utilización de vidrios limpios y secos o la de vidrios con gelatina bacteriológica como así también la utilización de vidrios con Vectabon®. Los resultados obtenidos fueron similares en los tres tipos de tratamientos utilizados, las mayores variaciones se observaron en aquellos vidrios en donde los cortes histológicos recién montados no fueron secados en estufa a 37° C durante varias horas, los vidrios que permanecían más tiempo de secado fueron los que mostraron mejores resultados.

La evaluación histológica con la coloración de Warthin-Starry en las especies estudiadas permitió observar microorganismos con las características morfológicas de *Helicobacter spp*. Con esta tinción, en las muestras gástricas de cerdo pudimos observar al menos dos tipos de *Helicobacter spp*: uno de ellos de mayor tamaño e intensamente espiralado y el otro de tamaño menor y con forma de S itálica forma morfológica descripta para *H. helmanni* y *H. pylori* coincidiendo con lo publicado por algunos autores que sugieren que los microorganismos observados en sus investigaciones presentaron una morfología similar a la descripta para *H. heilmannii*, *H. suis* y *H. pylori*, estas especies pueden colonizar de manera natural el estómago de cerdo o bien,

establecen que un mismo género bacteriano podría asumir patrones morfológicos diferentes por causas inherentes al ambiente gástrico particular del huésped. En concordancia con estos autores sería necesario realizar futuros estudios utilizando técnicas específicas para tipificar las especies presentes en los estómagos de cerdos e identificar con precisión los tipos morfológicos encontrados (Fawcett *et al.*, 1999; Rodríguez *y col.*, 2009; Liang *et al.*, 2013).

En nuestros análisis morfométrico observamos microorganismos que van desde 1 μm a 6 μm de longitud y de 0,4 a 1,0 μm de ancho, en base a esta última característica podemos inferir que existen más de una especie de *Helicobacter* colonizando el estómago de los cerdos morfológica y morfométricamente compatibles con *H. pylori* y *H. heilmannii*.

En coincidencia con Mulet *et al.*, 2005, Bondi, 2006 y Cárdenas *et al.*, 2007, nuestros resultados determinaron una mayor colonización de estos microorganismos en la región antral, tanto en los estómagos de humanos como de cerdos.

Diversos estudios sugieren que los microorganismos observados en las muestras de cerdo se presentan colonizando con mayor frecuencia la mucosa fúndica y pilórica, principalmente en las fosetas gástricas en íntima relación con el aparato de secreción ácida del estómago (Eaton *et al.*, 1992; Rodríguez *y col.*, 2008). La colonización con *H. heilmanni* en cerdos produce respuestas inflamatorias gástricas similares a las producidas experimentalmente con *H. pylori* induciendo a la hiperacidez (Rodríguez *y col.*, 2009). En las regiones de la glándula fúndica en cerdos inoculados experimentalmente y cerdos infectados de manera natural con *H. suis*, estos microorganismos se encuentran en estrecho contacto con las células parietales, lo que podría indicar que la bacteria puede tener impacto en estas células productoras de ácido clorhídrico. La infección provocada por *H. suis* se localizó principalmente en el antro (De Grotte *et al.*, 2000; Haesebrouck *et al.*, 2009). En nuestro estudio se confirma la presencia de *Helicobacter spp.* en estómagos de cerdos colonizadas de manera natural, lo que indica la capacidad de estos microorganismos para infectar a esta especie animal e inducir lesiones gástricas, la localización de estos *Helicobacter spp.* concuerdan con los hallazgos de Rodríguez *y col.*, 2009.

Por otro lado, la detección de células G productoras de gastrina se realizó de acuerdo a lo propuesto por Gázquez Ortiz and Blanco Rodríguez, 2004. Los mismos hacen referencia a las células endocrinas del estómago, sin precisar especie animal alguna, como aquellas que se localizan en la base de las glándulas fúndicas en contacto con la membrana basal no siendo observables con las tinciones de rutina de laboratorio. Las células G en el presente trabajo se estudiaron aplicando la técnica inmunohistoquímica, siguiendo el protocolo establecido por Ravi R, en 1998.

Es sabido que la infección por *Helicobacter spp.*, como afirman varias investigaciones, produce anomalías importantes en la secreción de hormonas polipeptídicas gastrointestinales por el antro gástrico, como la gastrina (Eaton *et al.*, 1992; Fawcett *et al.*, 1999; Sleingsinger *et al.*, 2000). La

acción inflamatoria sobre el epitelio gástrico disminuye la cantidad de células D que sintetizan somatostatina, inhibidor natural de las células G productoras de gastrina, lo que provoca un aumento de esta, incrementando de esta manera la secreción del jugo gástrico (Eaton *et al.*, 1997; Cárdenas *et al.*, 2007) y por ende aumenta la secreción de ácido clorhídrico, estos fenómenos provocan un desbalance aumentando los factores agresivos y disminuyendo a los factores defensivos lo que lleva a una pérdida de la homeostasis local generando una lesión ulcerada (Mazell *et al.*, 1991; Frisanche, 1996). Estas anomalías tienen consecuencias importantes en la fisiopatología gástrica y en la patogenia de la ulceración (Morales *et al.*, 1999)

Estudios anteriores revelan que la gastrina además de estimular la secreción de ácido gástrico también actúa como hormona trópica ante las células parietales secretoras de ácido en el cuerpo gástrico (Morales *et al.*, 1999). Como establecen varios autores, la infección por *Helicobacter spp.* está asociada a un incremento en las concentraciones de gastrina sérica. Hasta el momento existen pocos estudios referentes a la morfología de las células productoras de gastrina en las gastritis producidas por este agente causal (Sleinsinger *et al.*, 2000).

En general, a las células enteroendocrinas, se las describen como células pequeñas, con un núcleo redondo esférico y un citoplasma con tinción débil. Están situadas en contacto con la membrana basal en la que asientan las células epiteliales mucosas; muchas de aquellas células no están en contacto con la luz. Las vesículas neurosecretoras se concentran fundamentalmente en la porción basal de las mismas, razón por la cual se las llamó células acidófilas basigranulares, lo cual permite observar una acidofilia más evidente en la zona basal de la célula (UCGS, 2007). Por otra parte, Ross and Pawlina, 2012, atribuyen que la dificultad para ser observadas con tinciones de hematoxilina y eosina se debe principalmente a la escasez de ARN y membranas lo cual imprime a la célula una escasa basofilia y acidofilia, respectivamente, que se traduce en la escases de tinción. Asimismo, Bassan *et al.*, 2000, sobre el particular refiere a la presencia de gránulos secretorios que exhiben metacromasia enmascarada, y reaccionan con la hematoxilina plúmbica, las sales de cromo y las de plata.

En las diferentes muestras examinadas a las que se les realizó la tinción de hematoxilina eosina, la identificación de células G resultó difícil. Esto coincide con lo mencionado en algunas citas bibliográficas en humanos y en animales domésticos (Dauría, 2011).

Desde el punto de vista morfológico, en individuos adultos de diferentes especies, se describen formas celular que varían de redonda a piramidal en humanos (UCGS, 2007; Ross and Pawlina, 2012); redonda, ovalada, de huso y triangular en caballos adultos (Ceccarelli *et al.*, 1995); piramidal en otras especies domésticas y salvajes (Kitamura *et al.*, 1990; Ceccarelli *et al.*, 1995); y células de formas redondeadas y piramidales en fetos de caballo (Dauría, 2011). Las células observadas en nuestro trabajo tanto en biopsias gástricas agudas y crónicas con presencia de *H. spp.*,

presentaron las características típicas de una célula de secreción endocrina. En las biopsias gástricas humanas, las células G, se evidenciaron con las formas piramidales, alargadas y redondeadas, siendo estas últimas las más abundantes. En los cerdos se observaron células con forma piramidal o triangular. En las células de formas redondeadas y piramidales, los núcleos se presentaron redondos y alargados respectivamente ubicándose, los primeros en la porción central de la célula, y los segundos en la parte basal de la misma. Respecto a aquellas que mostraron una forma celular alargada, el núcleo adoptó igual morfología, que la célula, extendiéndose a lo largo de la superficie citoplasmática, esto concuerda con lo observado por otros investigadores en otras especies animales (Kitamura *et al.*, 1990; Ceccarelli *et al.*, 1995; Dauría, 2011).

Con respecto al tipo celular abierto o cerrado, tanto en humanos como en cerdos se identificaron los dos tipos celulares, tal lo descrito en trabajos realizados en diferentes especies (Kitamura *et al.*, 1990; Ceccarelli *et al.*, 1995; Dauría, 2011).

Por otro lado, la distribución de los gránulos en las células con inmunomarcación positiva, en las muestras estudiadas, mostró cierta variación ya que aquéllos no sólo se ubicaron en la parte basal de la célula, como habitualmente se describen en algunas especies animales (Gázquez Ortiz and Blanco Rodriguez; 2004); sino también se localizaron en otras áreas de la superficie celular coincidiendo con estudios realizados en fetos de caballo por Dauría, en 2011. Algunos gránulos de la misma célula, se manifestaron con aspecto grueso e intensamente teñidos, mientras que otros fueron más finos y débilmente teñidos. Sin embargo, en algunas células los gránulos no evidenciaron diferencia alguna entre sí, es decir mostraron una apariencia homogénea, mientras que en otras, la presencia de gránulos fue escasa. Por su parte, Ortea López, 1995, establece que en humanos, los gránulos, en las células G, toman una ubicación basal respecto al núcleo, y en el vértice se encuentra un penacho de microvellosidades lo que le imprime el carácter de tipo abierto dentro del universo de las células enteroendocrinas. En las biopsias estudiadas pudimos apreciar la presencia de las dos formas celulares abiertas y cerradas. Tanto en biopsias gástricas humanas y en muestras gástricas de cerdos, se identificaron células positivas a gastrina en tejido conectivo adyacente y en tejido epitelial glandular, siendo esta última ubicación la más abundante. En este trabajo en las muestras de humanos y cerdos con diagnóstico de mucosa normal y en aquellas con gastritis agudas y crónicas con ausencia de *H. spp* se pudieron observar las células G con las características morfológicas anteriormente descritas, solo que en algunos casos la marcación no era tan intensa.

Con respecto a la producción de gastrina por parte de las células G, estudios experimentales en ratones (modelo ratón INS-GAS) hipergastrinémicos determinaron que en ratones machos tratados con flora alterada de Schaedler (ASF) y *H. pylori*, la respuesta inflamatoria fue mas severa que en ratones hembra con el mismo tratamiento. Además, los machos desarrollaron un 40 % mas

de neoplasias intraepiteliales invasivas gastrointestinales con respecto a ratones hembras (Lertpiriyapong *et al.*, 2014).

Los estudios realizados en gerbos de Mongolia y en el hombre, han asociado la infección con *Helicobacter spp.*, con el desarrollo de carcinomas gástricos, la infección con *H. pylori* induce un aumento de 5 a 10 veces la concentración de gastrina en suero y aumenta con el tiempo. Dos tipos de tumores aparecen luego de la infección prolongada con *H. pylori*: adenocarcinomas y carcinoides de células enterocromafines o ECL. A su vez, en roedores africanos (*Mastomys natalensis*) se investigó el desarrollo de tumores gástricos asociados a ECL, en ellos se observó, que la gastrina esta estrechamente vinculada con la aparición de este tipo de tumores y también se determinó que la misma esta asociada a la aparición de adenocarcinomas (Kariya *et al.*, 1986; Fossmark *et al.*, 2011). Investigaciones anteriores refieren un aumento de concentración sérica de gastrina, pero no se hace referencia al aumento en el número de células productoras de la misma durante esta patología (Sleinsinger *et al.*, 2000). En el presente estudio los resultados obtenidos nos indican que el aumento de gastrina no solo se aplica a su concentración, como establece Sleinsinger *et al.*, 2000 sino también incluye el aumento en el número de células que las producen.

Al estudiar las biopsias gástricas humanas con diagnóstico de gastritis agudas y crónicas con ausencia y presencia de *Helicobacter* observamos que hubo un aumento en el % de células G en aquellas muestras con presencia de este agente causal.

En las biopsias gástricas humanas evaluadas no se encontraron diferencias en cuanto al número de células productoras de gastrina tanto en aquellos pacientes que tenían diagnóstico de gastritis aguda como crónica provocadas por *Helicobacter*, lo que sugiere que probablemente la variación en las concentraciones séricas de las mismas se deba a un aumento en la producción de la hormona en los procesos inflamatorios del estómago y no en el número de células. Nuestro estudio además, permitió comparar en humanos el comportamiento de estas células con respecto a edad y al sexo. En cuanto a la edad de los pacientes, no se observaron diferencias de acuerdo a los grupos etarios estudiados. Por otro lado, se ha comprobado que el aumento en el número de células productoras de gastrina es independiente del sexo.

En las muestras gástricas de cerdos que presentaban diagnóstico de gastritis agudas con presencia o ausencia de *Helicobacter* no existen diferencias en el número de células G, a diferencia de lo que sucedió en humanos, lo que sugiere, en concordancia con lo observado con otros autores, que existe un proceso de patogenia común a humanos pero no similar (Hellemans *et al.*, 2007).

En cerdos, existe un aumento en el número de células productoras de gastrina al comparar biopsias gástricas crónicas con presencia y ausencia del microorganismo. De este mismo estudio se desprende que al comparar biopsias gástricas con gastritis agudas positivas a *Helicobacter* y

crónicas positivas a la misma bacteria, existen evidencias significativas en cuanto al aumento de células G.

Asimismo, al estudiar las muestras de cerdos y humanos con gastritis aguda positivas a *Helicobacter* se encontraron diferencias estadísticamente significativas, hallándose un mayor porcentaje de células G en humanos, alrededor de un 4% más.

Por otra parte en las gastritis crónicas, los resultados nos indican que hubo diferencias entre los estómagos de cerdos y humanos estudiados, siendo el cerdo el que posee alrededor de un 2 % más de células G.

En este estudio los resultados indican que el aumento en la producción de la hormona gastrina, en ambas especies, no solo se refiere a su concentración sino a un aumento en el número de células que la producen.

A través de los diversos análisis estadísticos realizados, podemos decir que independientemente de la presencia de *Helicobacter spp.*, tanto en humanos como en cerdos las muestras gástricas con gastritis crónica presentan un mayor porcentaje de células positivas a gastrina con respecto a aquellas muestras con diagnóstico de gastritis aguda y mucosa normal. Sin embargo, en las gastritis crónicas la presencia de *Helicobacter* está relacionada a un incremento en el porcentaje de células G, tanto en humanos como en cerdos. Por otra parte, no se observaron diferencias en el porcentaje de células G entre individuos con gastritis aguda e individuos con mucosa normal, independientemente de la especie y de la presencia de *Helicobacter*.

Tanto las lesiones histopatológicas como el estudio inmunohistoquímico de células productoras de gastrina encontradas en humanos y en cerdos, sugieren en concordancia con otras investigaciones la existencia de un proceso de patogenia con aspectos comunes, las mismas son semejantes, esto no implica que dicho proceso sea similar, pero si sugiere la presencia de mecanismos comunes para su desarrollo (Eaton *et al.*, 1992) y concuerdan con estudios referidos a ciertas especies de *Helicobacter* que sugieren que no todos pueden alterar de igual manera el número de células endocrinas (Sapierzynski *et al.*, 2007).

No se sabe exactamente como los *Helicobacter* gástricos se transmiten de animales a humanos, pero lo más probable es que se produzca a través del contacto directo. Vivir en proximidad cercana con gatos, perros y en especial cerdos se ha identificado como un factor de riesgo para estas infecciones. La intensidad del contacto con animales es importante también, ya que una mayor incidencia de estas afecciones se ha observado en criadores de cerdos y personal de mataderos (Haesebrouck *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2013). En las afecciones gástricas humanas el *H. pylori* es el microorganismo mas frecuentemente hallado aunque también en esta especie se ha reportado la presencia de *H. suis* (Haesebrouck *et al.*, 2009).

Por otro lado, varios estudios han establecido que el *H. suis* asociado a úlceras estomacales en cerdos, pueden ser causal de muerte súbita, un problema importante para la producción. Estas pérdidas económicas para la industria porcina y el riesgo de que las bacterias puedan infectar a seres humanos justifican la necesidad de futuras investigaciones, los datos demuestran que los seres humanos en contacto cercano con cerdos tienen un riesgo más alto a adquirir la infección (Baele *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2013).

La capacidad de estos microorganismos para colonizar en forma natural y para inducir lesiones gástricas en el hombre y en diferentes especies animales, ha generado preocupación a nivel mundial por su posible riesgo zoonótico, pero hasta el presente esto aún no ha sido dilucidado.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- A través de la técnica histológica convencional hematoxilina/eosina se logró el diagnóstico de los diferentes tipos de gastritis en las muestras gástricas de cerdo y humanos. En muestras gástricas de cerdos pudimos observar mayor proporción de lesiones crónicas que agudas.
- A través de las tinciones diferenciales de Giemsa y Warthin-Starry en las muestras gástricas logramos determinar la presencia de *Helicobacter spp.* En muestras gástricas de cerdo, con la tinción de Warthin-Starry, pudimos visualizar dos especies del género *Helicobacter*.
- En las especies estudiadas la inmunodetección de *Helicobacter spp.* se expresó en el epitelio, fosea gástrica y glándula gástrica. Sin embargo, la mayor colonización por *Helicobacter* fue detectada en la región antral tanto en estómagos de cerdo como en humanos.
- La presencia de *Helicobacter spp.* en estómagos de cerdo indica la capacidad del microorganismo para infectar de manera natural a esta especie animal. En las muestras estudiadas encontramos más de una especie de *Helicobacter*.
- La técnica inmunohistoquímica permitió la visualización de las células G productoras de gastrina, las mismas se localizaron en el epitelio glandular y en el tejido conectivo subyacente.
- En humanos las formas celulares halladas fueron alargadas, piramidales y redondeadas, siendo estas últimas las más abundantes. Las células G observadas en cerdos adoptaron las formas triangulares o piramidales. Tanto en humanos como en cerdos se identificaron células positivas de tipo abierto y cerrado, siendo estas últimas las más abundantes. Las mismas presentan características similares a las observadas en otras especies animales. Con respecto a la disposición de los gránulos citoplasmáticos, en ambas especies estudiadas, los mismos mostraron cierta variación tanto en su distribución como en la intensidad de tinción.

- En lo que respecta al comportamiento de las células productoras de gastrina, en biopsias humanas, el presente estudio indica que la presencia del *Helicobacter* provoca un aumento tanto en el número de células G como en la concentración de gastrina. El aumento del número de células productoras de gastrina es independiente del sexo y la edad.
- En las muestras gástricas de cerdos con diagnóstico de gastritis crónica en presencia y/o ausencia de *Helicobacter* se observó un aumento en el número de células productoras de gastrina. Sin embargo, en aquellas muestras con diagnóstico de gastritis aguda con presencia y/o ausencia de *Helicobacter* no hubo aumento en el número de células productoras de gastrina.
- En las gastritis crónicas tanto de cerdos como humanos las células productoras de gastrina aumentan en número.
- Las lesiones histopatológicas y el estudio inmunohistoquímico de células productoras de gastrina encontradas en humanos y en cerdos sugieren la existencia de un proceso de patogenia común aunque no similar.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Atherton J, Tham K, Peek R, Cover T and Blaser J. (1996). Density of *Helicobacter pylori* infection *in vivo* as assessed by quantitative culture and histology. *J Infect Dis*, 174: 552-556.
- Atherton J, Peek R, Than K, Cover T and Blaser M. (1997). Clinical and pathological importance of heterogeneity in vac A, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 112:92-99.
- Atherton J, Cover T, Twells R, Morales M, Hawkey C and Blaser M. (1999). Simple and accurate PCR. based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microb*, 37:2979-2982.
- Barbosa A, Silva J, Nogueira A, Paulino E and Miranda C. (1995). Higher incidence of *Gastrospirillum sp* in swine with gastric ulcer of the *pars oesophagea*. *Vet Pathol*; 32:134-139.
- Baele M, Decostere A, Vandamme P, Peelen L, Hellems A, Mast J, Chiers K, Ducatelle R and Haesebrouck F. (2008). Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. from pig stomachs. *IJSEM*. 58(6): 1350-1358.
- Balén E, Sáez M, Cienfuegos J, Zazpe C, Ferrer J, Herrera J and Lera J. (2000). Anatomy of the pig applied to experimental general surgery. *Cir Esp*; 67: 586-593.
- Bassan N, Perez F, Vinuesa M, Roma S, Fodor M, Araujo A. (2000). Células enteroendocrinas en ciego y apéndice de conejo. *Analecta veterinaria*. 20, 1:1-4.
- Blaser J. (1992). *Helicobacter pylori*: Its role in disease. *Clin Infect Dis*, 15: 386-393.
- Bondi J. (2006). Aparato digestivo. *Helicobacter pylori*. URL: <http://www.bondisalud.com.ar/34html>.
- Bornstein J and Furness J. (1992). Enteric neurons and their codings. In: advances in the innervation of gastrointestinal tracts. Holle G and Wood J, eds, *Elsevier*.
- Burroni D, Lupetti P, Pagliaccia C, Reyrat JM, Dallai R, Rappudi R and Telford JL. (1998) Deletion of the major proteolytic site of the *Helicobacter pylori* cytotoxin does not influence toxin activity but favors assembly of the toxin into hexameric structures. *Infec Imm*, 66:5547-5550.
- Caceci, T. (2006): Exercise 18: Digestive system 2: stomachs. VM8054 *Veterinary Histology*.
- Capelle L, de Vries A, Haringsma J, The Borg F, de Vries R, Bruno M, Van Dekken H, Meijer J, Van Grieken N and Kuiper E. (2010). The staging of gastritis with the Olga System by using intestinal metaplasia as an accurate alternative for atrophic gastritis. *Gastrointestinal endoscopy*, 71(7).

- Cárdenas Y, Castro V, Nevett A, Patiño P and Undaneta G. (2007). Apoptosis and *Helicobacter pylori*: a new model for infectious oncogenesis. *VITAE Academia Biomédica Digital*; 29. ISSN :1317-987.
- Ceccarelli P, Pedini V and Gargiulo A. (1995). The endocrine cells in the gastro-enteric tract of adult fallow deer (*Dama dama* L.). *Anat. Histol. Embryol.* Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlín. 24,171-174.
- Conigrave A, Quinn S, Brown E. (2000). L-amino acid sensing by the extracellular Ca²⁺-sensing recep. *Prac Natl Acad Sci USA*: 97:4814-9.
- Costa N, Brookes S, Waterman S and Mayo R. (1992). Enteric neuronal circuitry and transmitters controlling intestinal motor function. *Advances in the innervation of the gastrointestinal tracts* In: Holle G and Wood J; eds. *Excerpta Medico*, 101-14.
- Crawford J. (2000). Aparato gastrointestinal. Robbins. Patología estructural y funcional. 6 edición. Madrid. Mc Graw Hill interamericana, 823-830.
- Cui D, Naftel J, Lynch J, Haines D, Yang G and Fratkin J. (2011). Histología con correlaciones funcionales y clínicas. ISBN:978-0-7817-9759-7. Eds Wolters Klumer/Lippicott Williams y Wilkins.
- Dauría P. (2011). Expresión de gastrina y secretina en el tracto digestivo del caballo. Tesis Maestría en Anatomía y Fisiología Veterinaria. Biblioteca Universidad Nacional de Río Cuarto.
- De Groote D, Ducatelle R, Van Doorn L, Tilmant K, Verschuuren A and Haesebrouck F. (2000). Detection of "*Candidatus Helicobacter suis*" in gastric samples of pigs by PCR: comparison with other invasive diagnostic techniques. *J. Clin. Microbiol*, 38:1131-1135.
- Delgado F, Brihuega B, Venzano A, Funes D, Blanco Viera F, Auteri C, Romero G, Capellino F and Sarmiento L. (2007). Adaptation of an immunohistochemistry protocol for the detection of *Leptospira* spp. in samples of formaldehyde-fixed tissue. *Rev Cubana Med. Trop*: 59(1). ISSN 0375-0760 versión *on-line*.
- Dellmann, H and Brown E (1980). Histología veterinaria. Editorial Acribia, Zaragoza España, pp: 223-253.
- Dyce K, Sack W and Wensing C. (1991). Anatomía Veterinaria. Ediciones med. Panamericana: 775-777.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M y Robledo C. (2011). InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dos Santos J. (1970). Anatomía y fisiología. Ediciones Troquel.
- Durante I. (2010) Patología del estómago- Lecciones anatomía patológica. Universidad Nacional de Chile, 4 (material online) <http://medicina.uc.cl>.

- Eaton K, Morgan D, Krakowka S. (1992). Motility as factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*; 37:123-127.
- Eaton K, Cover T, Tummuru M, Blaser M and Krakowka S. (1997) Role of vacuolating cytotoxin in gastritis due to *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infec Imm*, 65: 3462-3464.
- Eynard A, Valentich M y Rovasio, R. Histología y Embriología del ser humano. Bases celulares y moleculares. Ediciones Panamericanas. 4ª edición. Sección 3. Cap 12.
- Farreras and Rozman. (2009). CD Medicina Interna. Ediciones Harcourt. 16º edición. Cap 17 pp 144
- Fawcett P, Gibney K and Vinette K. (1999). *Helicobacter pylori* can be induced to assume the morphology of *Helicobacter heilmannii*. *J Clin Microbiol*, 37:1045-1048.
- Fox J. (1995). Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther*, 9(2):93-103.
- Fox J, Dangler C, Sager W, Borkowski R and Gliato J.(1997). *Helicobacter mustelae* associated gastric adenocarcinoma in ferrets (*Mustelae putorius furo*). *Vet Pathol*; 34:125-129.
- Friendship R. (2003). Gastric ulcers. *Pigs news and information*, 24, 5N-48N.
- Frisanche Valerde O. (1996). *Helicobacter pylori* y la fisiopatogenia de la úlcera péptica. Boletín de la Soc. Peruana de Medicina interna, vol 9 nº1.
- Fossmark R, Qvigstad G, Waldum H. (2010). Animal models to study the role of long-term hypergastrinemia in gastric carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* ; 2011:9755479.
- Garnet L and Hiatt J. (2011)_a. Atlas en color de Histología. 5ª edición. Editorial médica panamericana, cap 14, pp 292-293.
- Garnet L and Hiatt J. (2011)_b. Histología básica. *Elsevier España*. cap 5:60-61.
- Gázquez Ortiz A and Blanco Rodríguez A. (2004). Tratado de Histología Veterinaria. Editorial Masson, S.A, 1º edición. cap.11:260-279.
- Geneser F. (2000). Histología. 3º edición . Ed panamericana, cap 18, pp 488-497.
- Goodwin C and Armstrong J. (1989). Aspect microbiological of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*) .*Eur. J. Clin. Microb. Infec. Dis*, 9 (1): 1-13
- Goto, K., Ohashi H., Takakura A., and T. Itoh. (2000). Current status of *Helicobacter* contamination of laboratory mice, rats, gerbils, and house musk shrews in Japan. *Curr. Microbiol*, 41:161-166.
- Haesebrouck F, Pasmans F, Flahou B, Chiers K, Baele M, Meyns T, Decostere A, Ducatelle R. (2009). Gastric *Helicobacters* in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clin Microbiol Rev*. 22 (2): 202-23.
- Hakanson R and Liedberg G. (1970). The role of endogenous gastrin in the activation of gastric histidine de carboxylase in the rat. Effect of antrectomy and vagal denervation. *Eur J Pharmacol*, 12: 94-103.

- Harris P, Cover T, Crowe D, Orestein J, Graham M, Blaser M and Smith P. (1996) *Helicobacter pylori* Cytotoxin induces vacuolation of primary human mucosal epithelial cell. *Infect Immun*, 64: 4867-4871.
- Hellemans A, Decostere A, Haesebrouck F and Ducatelle R. (2005). Evaluation of antibiotic treatment for eradication of "*Candidatus Helicobacter suis*" in a mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4530-4535.
- Hellemans A, Chiers K, Decostere A, De bock M, Haesebrouck F and Ducatelle R. (2007). Experimental infection of pigs with *Candidatus Helicobacter suis*. *Veterinary Research Communications*: 31 pag 385-395.
- Hersey S and Sachs G. (1995). Gastric acid secretion. *Physiology Rev*, 75:155-89.
- Hib J. (2003). *Histología de Di Fiore: Texto y Atlas*. 1º edición. Ed Ateneo, 14: 208-217.
- Hobsley M, Tovey F and Holton J. (2008). Controversies in the *Helicobacter pylori*/duodenal ulcer story. *R. Soc. Trop Med Hyg.* 102(12):1171-1175.
- Hui W, Ho J and Lam S. (1991). Pathogenic role of *Helicobacter pylori* in duodenal ulcer disease. Multivariate analysis of fact affecting release. *Dig Dis Sci*; 36:424-430.
- Ito S and Winchester R. (1963). The fine structure of the gastric mucosa of the bat. *J Cell Biol*, 16: 574.
- Kariya Y, Kato K, Hayashizaki Y, Himeno S, Tauris S, Matsubara K. (1986). Expression of human gastrin gene in normal and gastrinoma tissues. *Gene*, 50(1-3): 345-52.
- Kitamura N, Yamada N, Watanabe T, Yamashita T. (1990). An immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the musk shrew (*Suncus murinus*). *Histol. Histopath*, 5; 83-88.
- Konoshi H, Isibashi M and Morsed M. (1992). Cytopathic effects of *Helicobacter pylori* on cultured mammalian cell. *J Med. Microb*, 37(2): 118-112.
- Krakowka S, Ringler S, Flores J, Kearns R, Eaton K and Ellis J. (2005). Isolation and preliminary characterization of a novel *Helicobacter* species from swine. *Am. J. Vet. Res.* 66:938-944.
- Ladeira M, Rodriguez M, Salvadri D, Queiroz D and Freire-Maia D. (2004). DNA damage in patients infected by *Helicobacter pylori*. *Cancer Epidemid Biomarkers*, Prev 13(4): 631-637.
- Larsson L, Golterman N, de Magistris L, Retifeld J and Schwartz T. (1979) Somatostatin cell processes as pathways for paracrine secretion. *Science*, 205:1393- 5.
- Leite Moreira A e Castro Chavez P. (2002). *Texto de Apoio. Regulação neuroendócrina da secreção e motilidade gastrointestinais*. Faculdade de Medicina Da Universidade do Porto. Serviço Fisiologia. Brasil.

- Lennart Friis- Hansen. (2007). Lessons from the gastrin knockout mice. *Regulatory Peptides*, 139: 22-5.
- Lentz T. (1997). Cell fine structure: an atlas of drawing of whole. cell structure. Philadelphia.Ed WB Saunders.Pub. co, 218.
- Lertpiriyapong K, Whary M, Muthupalanis S, Lofgren J, Gamazón E, Feng Y, Wang T, Fox J. (2014). Gastric colonisation with a restricted commensal microbiota replicates promotion of neoplastic lesion by diverse intestinal microbiota in the *Helicobacter pylori* INS-GAS mouse model of gastric carcinogenesis. *Gut*, 63 (1):54-63.
- Liang J, Ducatelle R, Pasman F, Annemieke S, Haesebrouck F and Flahou B. (2013). Sequence typing of porcine and human gastric pathogen *Helicobacter suis*. *Int J Syst and Evol Microbiol*, 51(3): 920-936.
- Lopez- Brea M, Alarcón T, Domingo D, Perez- Perez G, Correa P y Shirrow M. (2006). *Retos para el Siglo XXI*. On line. Citado en www.helicobacterspain.com.
- Luna L (1968). Manual of histopathology staining methods of the armed forces institute of pathology 3th ed. E.U: Mc.Graw Hill.
- Mai U, Perez-Perez G, Allen J, Eahl S, Blaser M and Smith P. (1992). Surface Proteins from *Helicobacter pylori*. Exhibit chemostatic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. *J. Exp. Med*, 175: 517-525.
- Magalhaes Queiroz D. (1995). *Helicobacter pylori*: factores de virulencia. *Rev Brasileira de Medicina*, 52: 20-23.
- Makinde M and Obwolo M. (1990). Abattoir survey of gastric ulcer in pigs in Zimbabwe. *Zimb Vet J*; 21:116-123.
- Marshall B. (1994)_a. Virulence and pathogenicity of *Helicobacter*. *J Gastroent Hepatol*, 6 (2):121-124.
- Marshall B. (1994)_b. *Helicobacter pylori*. *American Journal of Gastroenterology*, 89:5116-5128.
- Marshall D, Dundon W, Beesley S and Smyth C. (1998). *Helicobacter pylori* a conundrum of genetic diversity. *Microbiol*, 144:2925-2939.
- Mazell S, Evans D and Graham D. (1991). *Helicobacter pylori*- catalase. *J. Gen Microb*, 137:57-61.
- Mc Coll K, El-Omar R and Guillen D. (1997). The role of *Helicobacter pylori* in the pathophysiology of duodenal ulcer and gastric cancer. *Semin Gastrointest disease*, 8:142-155.
- Megraud F and Lamouliatte H. (1992). *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer. Evidence suggesting causation. *Dig Dis Sci*, 37(5):769-772.

- Mendes, E., Queiroz D, Rocha G, Moura S, Leite V and Fonseca M. (1990). Ultrastructure of a spiral micro-organism from pig gastric mucosa ("Gastrospirillum suis"). *J. Med. Microbiol*, 33:61-66
- Morales A y Bermudez V. (2008). Modelos Animales para el estudio de la infección por el género *Helicobacter* en Humanos. *Rev Soc Med Hosp Emerg Perez de Leon* ; 39(1):30-33.
- Morales-Espinosa R, Castillo-Rojas G, González-Valencia G, Ponce de León S, Cravioto A, Atherton J and López-Vidal Y. (1999). Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different vacA and cagA genotypes. *J Clin Microbiol*; 37: 3001-4.
- Moreno R. (2005). La bacteria que destronó al stress. *Diario El país*. España.
- Mulet Perez A, Gomez Escalona M, Medina Menendez F and Mulet Gomez A. (2005). Antral chronic gastritis by *Helicobacter pylori* associated or not to duodenal ulcer. *Rev. Científico Médico de Holguín*, 9(2).
- Nakamura M, Murayama S, Serizawa H, Sekiya Y, Eguchi M, Takahashi S, Nishikawa K, Takahashi T, Matsumoto T, Yamada H, Hibi T, Tshuchimoto K and Matsui H. (2007). "*Candidatus H. Heilmannii*" from a cynomolgus monkey induces gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas in C57BL/6 mice. *Infect. Immun.* 75:1214-1222.
- Odriozola V. (2011). *Helicobacter* gastricos en caninos y felinos. Asociación argentina de medicina Felina. <http://www.aamefe.org/helicobacter.htm>.
- Ortea Lopez, D.(1995). Estudio del comportamiento secretor de las hormonas gastrointestinales implicadas en la motilidad vesicular de la coledocistitis. Tesis Doctoral: 34 .Universidad Complutense de Madrid.
- Otero Regino W. (2010). El gastroenterólogo y la gastritis crónica en la práctica clínica diaria. *Rev Col Gastroenterol*; (25) 3: 301-305.
- Park J, Seok S, Cho S, Baek M, Lee H, Kim D, Park J (2003). Experimental infection of mice with tightly coiled spiral bacteria (*Candidatus Helicobacter suis*) originating from the pig's stomach. *J.Comp. Pathol*, 129:154-160.
- Park J, Seok S, Cho S, Baek M, Lee H, Kim D, Park J (2004). The high prevalence of *Helicobacter* sp. in porcine pyloric mucosa and its histopathological and molecular characteristics. *Vet Microbiol*, 104 :219-225.
- Piñol Jimenez F y Paniagua Estevez M. (2006). Neuropeptidos y *Helicobacter pylori* en la gastritis crónica. *Rev. cubana Medicina*, 45(3).
- Queiroz D, Rocha G, Mendes E, De Moura S y Rocha A. (1996). Association between *Helicobacter* and gastric ulcer disease of the *pars oesophagea* in swine. *Gastroenterology*; 111:19-27.

- Queiroz, D, Rocha G, Mendes E, Lage A, Carvalho A and Barbosa A. (1990). A spiral microorganism in the stomach of pigs. *Vet. Microbiol*, 24:199-204.
- Ramos Vara J. (2005) Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 42:405-426
- Ray J, Squires P, Curtis S, Meloche M and Buchan A. (1997)_a. Expression of the calcium-sensing receptor on human antral gastrin cell in culture. *J Clin Inv*, 99:2328-2333.
- Ray J, Squires P, Meloche M, Nelson D, Snutch T, Buchan A. (1997)_b. L-type calcium channels regulate gastrin release from human antral G-Cells. *Am J Physiol*, 273:6281-6288.
- Ravi R. (1998). Induction of gastrin releasing peptide by all-trans retinoic acid in small cell lung cancer cells. *Oncol. Rep*, 5: 497-501.
- Rodriguez B, Aranzazu D, Giraldo G, Alvarez L, Lopera J y Valencia F. (2008). Determinación de *Helicobacter spp* en cerdos en el departamento de Antioquia, Colombia. *Rev. Colom Cien. Pecua*, 21(2): 210-218.
- Rodriguez B, Aranzazu D y Ortiz L. (2009). Association of gastric ulcer and *Helicobacter spp* in pigs in Antioquia, Colombia. *Rev. Colom Cien. Pecua*, 22:54-60.
- Ross M and Pawlina W. (2012). Histología "Texto y Atlas color con Biología celular". 5º edición. Editorial Panamericana, Cap. 16: 518-661.
- Rugge M, Meggio A, Pennelli G, Pisciole F, Giacomelli L and De Pretis G. (2007). Gastritis staging in clinical practice: the OLGA staging system. *Gut*; 56:631-6.
- Sáinz-Samitier R, Mearín-Manrique F, Piqué Badía JM, Saperas-Franch E, Lanás-Arbeola A, Borda-Celaya F (2009). Enfermedades del estómago y del duodeno. En: Farreras Rozman (Eds) Medicina Interna. Ediciones Harcourt. Capítulo 21
- Samar M, Avila R. (1991). Técnicas histológicas. Aspectos teórico-prácticos. Ediciones Atica.
- Sapierzynski R, Fabisiak M, Kizerwetter-Swida M and Cywinska U. (2007). Effect of *Helicobacter sp.* infection on the number of antral gastric endocrine cells in swine. *Pol J Vet Ciencia*, 10(2): 65-70.
- Sissons S and Grossman (1969). Anatomía de los animales domésticos. Ediciones Salvat. 4ª edición.
- Shukla S, Pujani M, Agarwal A, Pujani M and Rohtagi A. (2012). Correlation of serology with morphological changes in gastric biopsy in *Helicobacter pylori* infection and evaluation of immunochemistry for *H. pylori* identification. *Arabia J Gastroenterol*, 18(6): 369-374.
- Schubert M, Edwards N and Makhlouf G. (1998). Regulation of gastric somatostatin secretion in the mouse by luminal acidity a local feed back mechanism. *Gastroenterology*, 94:317-22.
- Skirrow M. B (1999). Campylobacter enteritis "a new disease". *British Medical Journal*, 2: 9 -11.
- Sleisinger M, Feldman M, Bruce M, Scharsch t K and Klein M. (2000). Enfermedades gastroduodenales y hepáticas .Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. 6º edición. Editorial Panamericana. Madrid pp 649-661.

- Soriano A. (1998). El rol del *Helicobacter pylori* en la fisiopatología de la enfermedad ulcerosa duodenal y el cancer gástrico. HNERM-IPSS, vol 1(2).
- Trautmann, A. y Tzt. Jos. (1970). Histología y Anatomía Microscópica comparada de los animales domésticos. Edición Revolucionaria, Instituto Cubano del Libro, La Habana, Cuba, pp.201-221.
- Thibaut J, Paz V, Paredes E y Ernest S. (2007). Determinación de la presencia de *Helicobacter spp* en perros mediante biopsia gastrica obtenida por endoscopia. *Rev Cient* (Maracaibo) Venezuela, 17(3). ISSN 0798-2259.
- Thompson L, Danon S, Wilson J. (2004). Chronic *Helicobacter pylori* infection with Sydney strain 1 and a newly identified mouse-adapted strain (Sydney strain 2000) in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect Immun*, 72 :4668–79
- Tytgort G. (1994). Long-term consequences of *Helicobacter pylori* eradication. *Scand J Gastroenterol*, 205: 38-44.
- UCSG -Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. (2007). Sistema endocrino: célula endocrina y especialización tisular disponible en:<http://www.bibli/2007/inernet/histolog/c3/ada/estructura/celu.htm>. [on line],
- Vale F and Vitor J. (2010). Trasmisión patway of *Helicobacter pylori*. Does food play a role rural and urban areas? *Int. Journal of food Microbiol*, 38:1-12.
- Valdivia Roldán M. (2011). Gastritis y gastropatías. *Rev. Gastroenterol. Perú*; 2011; 31-1: 38-48.
- Vega González, G. (1974). Resumen del desarrollo anatómico de aves y mamíferos. Edición Revolucionaria, Instituto Cubano del libro, La Habana, Cuba, pp. 228-229, 1974.
- Vikram K, Ananthkrishnan N and Tovey F. (2013) Is *Helicobacter* infection the primary cause of dupodenal ulceration or secondary factor? a review of the evidence. *Gastroenterology Res. Pract*, 425840.
- Vilches L, Eneida E; Eneida Núñez, Forment; S.y Díaz Alvarez. (2005). Manual de Biología Animal. Ed Félix Varela, La Habana, pp. 46-74.
- Walsh J. Gastrin. (1994). In: Johnson LR. Editor Physiology of the Gastrointestinal tract. 3º edición. Ed. New York Raven Press:3-31.
- Warren J. (1997). The discovery and pathology of *Helicobacter pylori*. In xth int. workshop on gastroduodenal pathology and *Helicobacter pylori*: the logic of eradication: 7-13.
- Zhang S and Moss S. (2012). Rodent models of *Helicobacter* infection, inflammation, and disease. *Methods Mol Biol*, 921:89-98.
- Zheng Q, Chen X, Shi Y. (2004). Development of gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol Hepatol*, 19:1192-1198,

ANEXOS

25 JUL 2011



Comité de Ética de la Investigación
Universidad Nacional de Río Cuarto

Por la presente se deja expresa constancia que Virginia Hebe Mac Loughlin, de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, ha presentado ante este Comité de Ética de la Investigación de la UNRC, para su evaluación el Proyecto de Investigación denominado "Relación de Helicobacter spp. y células productoras de gastrina", con el siguiente **Resultado** de la Evaluación del Comité:

Aprobado

Se expide la presente constancia a los fines que hubiere lugar en Río Cuarto a los 25 días del mes de Julio de 2011.

HA. GARRA

.....
Coordinador del Comité

.....
Miembro del Comité



**SECRETARÍA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, 1 de junio de 2009.-

**Al Sr. Decano de la
Facultad de Ciencias Médicas de la
Universidad Nacional de Córdoba**

Dr. Gustavo Irico

S _____ / _____ D

Distinguido Señor Decano:

Los que suscriben, miembros de la Comisión de Bioética de esta Facultad, comunican a Ud que tras haber examinado el proyecto de Tesis Doctoral de la Médica Veterinaria Mac Loughun Virginia, este Comité, se aprueba el proyecto presentado.

Sin otro particular, le saludamos con nuestra mayor consideración.

Prof. Dr. Pedro L. Saracho Cornet


Prof. Dr. Mario Forteza

Prof. Dr. Víctor Cinelli


Prof. Dr. Edgardo F. Secchi


Lic. Cristina Arrambide de Nores

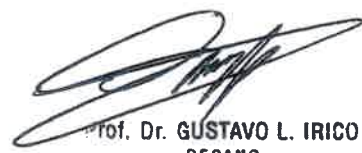


ES COPIA FIEL



Estela Arrambide

JEFA DE DIVISION
DESPACHO DE ALUMNOS - AREA ENSEÑANZA
Secretaría de Graduados en Ciencias de la Salud
F.C.M. - U.N.C.



Prof. Dr. GUSTAVO L. IRICO
DECANO
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba

NUEVO HOSPITAL RIO CUARTO
SERVICIO DE ENDOSCOPIA DIGESTIVA

CONSENTIMIENTO INFORMADO DE ENDOSCOPIAS DIGESTIVAS

- Formulario -

Río Cuarto,..... dedel 200..

-NOMBRE Y APELLIDO:
-FECHA Y LUGAR DE NACIMIENTO:
-ESTADO CIVIL:
-DOCUMENTO DE IDENTIDAD No.:
-DOMICILIO:
-OCUPACION:

SEXO:

TIPO:
T.E.:

-TIPO DE PROCEDIMIENTO:

1) He sido ampliamente informado acerca de la naturaleza y objetivos del procedimiento, sus riesgos predominantes y relevantes, beneficios, y las alternativas u opciones posibles para lograr la finalidad buscada. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas completa y satisfactoriamente.

2) Reconozco que no se me han dado garantías o seguridades respecto de los resultados que se esperan del procedimiento.

3) Entiendo que durante el curso del procedimiento pueden presentarse condiciones imprevistas que requieran procedimientos diferentes de los aquí referidos. Por ello, consiento expresamente la utilización de técnicas y la realización de procedimientos adicionales o alternativos que se juzguen necesarios (por ej. cirugía.....)

4) Asimismo consiento la administración de los anestésicos locales que se consideren adecuados, y en su caso, de medicación sedante y/o antiespasmódica y/o anestesia general. Reconozco que siempre hay riesgos para la salud asociados con la anestesia y tales riesgos me han sido completamente explicados.

5)OBSERVACIONES:.....
.....
.....

Confirmando que he leído y comprendo perfectamente los términos de este formulario y de la información brindada por mi médico en forma verbal, que he tenido la oportunidad de hacer preguntas, que éstas me han sido contestadas,

Firma del paciente o familiar 1(*):

Aclaración de firma:

Firmas del acompañante (opcional):

Aclaración de firma:

Parentesco o tipo de vínculo:

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Lugar y fecha-----

Por medio de la presente autorizo que: las biopsias obtenidas por técnicas endoscópicas una vez realizado el diagnóstico histopatológico puedan ser utilizadas en el trabajo de investigación: "Relación entre *Helicobacter pylori* y células productoras de gastrina".

El objetivo del estudio es: investigar la relación de la presencia del *Helicobacter pylori* con respecto a la funcionalidad de células productoras de gastrina en pacientes con gastritis provocadas por dicho agente.

Declaro que se me ha informado que mi participación en dicho proyecto no afectará mi integridad física y que dicho estudio constituye un aporte a las ciencias médicas.

El investigador se ha comprometido a brindarme la información necesaria en caso que lo requiera.

Se me ha explicado que conservo el derecho de retirarme del estudio si lo considero conveniente.

Se me ha dado la seguridad de que **no se me identificará** en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los **datos relacionados con mi privacidad** serán manejados en forma **confidencial**.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del investigador

75183

U.N.R.C
Biblioteca Central



73183



UNRC - UNICAMP - UNESP



73183

U.N.R.C.
Biblioteca Central

