

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Informe de Trabajo Final presentado para Optar al Grado de Médico
Veterinario

Modalidad: Práctica preprofesional

DETERMINACION DE BOMBESINA EN ESTÓMAGO DE
CERDOS CON DIAGNOSTICO DE GASTRITIS PROVOCADAS
POR *Helicobacter spp.*

Alumno: Machuca, Lucía Belén

D.N.I.: 37.665.159

Director: Dra. Mac Loughlin, Virginia Hebe

Co-director: Dra. Grosso, María Carolina

Río Cuarto - Córdoba

Diciembre 2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: “Determinación de bombesina en estómago de cerdos con diagnóstico de gastritis provocadas por *Helicobacter spp.*”

Autor: Machuca, Lucía Belén

D.N.I.: 37665159

Director: Mac Loughlin, Virginia Hebe

Co- director: Grosso, María Carolina

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la
Comisión Evaluadora:

Mac Loughlin, Virginia Hebe _____

Grosso, María Carolina _____

Guendulain, Corina _____

Martinez, Ramiro Andrés _____

Fecha de Presentación: ____/____/____

Secretario Académico

INDICE

<u>INDICE DE FIGURAS</u>	iv
<u>INDICE DE TABLAS</u>	v
RESUMEN	vi
SUMMARY	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 GENERALIDADES	1
1.2 ESTÓMAGO DEL CERDO	3
<u>Descripción anatómica</u>	3
<u>Estructura histológica</u>	5
1.3 <i>Helicobacter spp.</i>	15
1.4 <i>Helicobacter</i> DE IMPORTANCIA EN EL CERDO	15
1.5 GASTRITIS	17
1.6 GASTRITIS PROVOCADAS POR <i>Helicobacter spp.</i>	18
1.7 HORMONAS GASTROINTESTINALES	20
1.8 BOMBESINA	22
1.9 HIPÓTESIS	24
2. OBJETIVOS	25
2.1 <u>Objetivo general</u>	25
2.2 <u>Objetivos específicos</u>	25
3. MATERIALES Y METODOS	26
3.1 <u>Muestras gástricas</u>	26
3.2 <u>Histoquímica:</u>	26
3.3 <u>Inmunohistoquímica:</u>	26
3.4 <u>Grupos</u>	27
3.5 <u>Estudio estadístico</u>	28
4. RESULTADOS	29
4.1 <u>Estudio microscópico de biopsias gástricas de cerdos</u>	29
4.2 <u>Resultados estadísticos</u>	36
5 <u>DISCUSIÓN</u>	39
6 <u>CONCLUSIÓN</u>	43
7 <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	44

INDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1:</u> Esquema del aparato digestivo del cerdo.	3
<u>Figura 2:</u> Esquema de la anatomía del estómago del cerdo.	4
<u>Figura 3:</u> Microfotografía de la transición esofagogástrica.	6
<u>Figura 4:</u> Microfotografía de un corte de la pared de la región antropilórica.....	7
<u>Figura 5:</u> Imagen histológica de las glándulas fúndicas del estómago en corte transversal con tinción de Hematoxilina-Eosina.	8
<u>Figura 6:</u> Esquema de una célula mucosa de la superficie, secretora de moco.	9
<u>Figura 7:</u> Esquema de una célula mucosa del cuello, secretora de moco.	10
<u>Figura 8:</u> Esquema de una célula parietal.	11
<u>Figura 9:</u> Mecanismo de secreción del ácido gástrico a partir de las células parietales del estómago.	12
<u>Figura 10:</u> Esquema de una célula principal.	12
<u>Figura 11:</u> Esquema de una célula enteroendócrina.	13
<u>Figura 12:</u> Esquema de una célula indiferenciada	14
<u>Figura 13:</u> Imagen de Helicobacter pylori obtenida mediante microscopía electrónica.	15
<u>Figura 14 :</u> Especies de Helicobacter que afectan al cerdo.	16
<u>Figura 15:</u> Mecanismo de acción de la ureasa.	18
<u>Figura 16:</u> Desarrollo de la infección por Helicobacter pylori.	19
<u>Figura 17:</u> Mecanismo de alteración en la producción de hormonas provocado por Helicobacter spp.	23
<u>Figura 18:</u> Microscopía óptica de biopsias gástricas, región antral con diagnóstico de gastritis aguda.	29
<u>Figura 19:</u> Microscopía óptica de biopsias gástricas, región antral con diagnóstico de gastritis crónica.	30
<u>Figura 20:</u> Microscopía óptica de biopsias gástrica, región antral con diagnóstico de gastritis aguda H(+).	31
<u>Figura 21:</u> Microscopía óptica de biopsias gástrica, región antral con diagnóstico de gastritis crónica H(+).	31
<u>Figura 22:</u> Microfotografía de biopsia gástrica región antral con diagnóstico de gastritis crónica coloreada con la tinción de Warthin-Starry.	32
<u>Figura 23:</u> Microfotografía de biopsia gástrica región antral con diagnóstico de gastritis aguda coloreada con la tinción de Warthin-Starry	33
<u>Figura 24:</u> Inmunoexpresión de células productoras de bombesina en biopsia gástrica con diagnóstico de gastritis aguda H (+)	34
<u>Figura 25:</u> Inmunoexpresión de células productoras de bombesina en biopsia gástrica con diagnóstico de gastritis crónica H (+).	35
<u>Figura 26:</u> Análisis del promedio de las células bombesina positivas	38

INDICE DE TABLAS

<u>Tabla 1.</u> Acciones fisiológicas de algunas hormonas gastrointestinales..	21
<u>Tabla 2.</u> Resumen de los resultados del estudio..	37

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. Existen otras hormonas y neurotransmisores que modifican la secreción de gastrina, ya sea inhibiendo o estimulando su liberación. El *Helicobacter* (H) altera el control inhibitorio de la liberación de gastrina y, a su vez, estimula la liberación de un neurotransmisor, la bombesina, que actúa sobre las células G para que estas secreten gastrina. Esto resulta en una excesiva secreción ácida pudiendo provocar gastritis, linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas y 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 bombesina en biopsias gástricas de cerdos. Se determinó la presencia de *Helicobacter spp* en muestras gástricas de región antro-pilórica de cerdos mestizos de diferentes edades y sexos, provenientes 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* se detectó a través de la observación de cortes histológicos coloreados con Giemsa, Warthin- Starry e Inmunohistoquímica con anticuerpos comerciales. La detección de células productoras de bombesina se realizó por técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos comerciales. Se determinó el porcentaje de células bombesina positivas en biopsias gástricas de cerdos con gastritis agudas H (+)/(-) y gastritis crónicas H (+)/(-). Las gastritis fueron diagnosticadas con H/E, observándose 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 existen al menos dos especies colonizando el estómago, una de mayor tamaño e intensamente espiralada y otra de menor tamaño y con forma de “s” itálica, que se corresponden con *Helicobacter heilmannii* y *Helicobacter pylori*, respectivamente. La inmunodetección de *Helicobacter spp* se expresó en el epitelio, foseta gástrica y glándula gástrica. Se encontró un mayor porcentaje de células bombesina positivas en muestras gástricas de cerdos con diagnóstico de gastritis crónica H (+) con respecto a las muestras con gastritis agudas H (+) ($p=0,04$), en muestras con gastritis crónicas H (+) con respecto a la mucosa normal ($p=0,02$) y en muestras con gastritis crónicas H (-) con respecto a la mucosa normal ($p=0,005$). En estas muestras también se observó que las características morfológicas de dichas células se correspondían con células de tipo abierta. La localización de estas células fue en el epitelio glandular, tejido conectivo subyacente y tejido muscular. En las muestras gástricas de gastritis

agudas H (+), en aquellas H (-) y en mucosas normales no se presentaron diferencias estadísticas significativas. En este estudio los resultados nos indican que el aumento en la producción de hormona bombesina 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.

SUMMARY

Gastric acid secretion is mainly controlled by the gastrin hormone, which is synthesized by the G cells of the stomach mucosa. There are other hormones and neurotransmitters that modify gastrin secretion, either by inhibiting or stimulating its release. *Helicobacter* (H) alters the inhibitory control of gastrin release and, in turn, stimulates the release of a neurotransmitter, bombesin, which acts on G cells to secrete gastrin. This results in excessive acid secretion, which can cause gastritis, lymphoma of lymphoid tissue associated with mucous membranes and peptic ulcers. Studies carried out confirm the implication of *Helicobacter spp* in gastric pathologies of man and other animal species, including the pig. That is why these bacteria could be pathogens responsible for zoonoses. The objective of this work was to study the relationship between *Helicobacter spp* and the functionality of bombesin-producing cells in gastric biopsies of pigs. The presence of *Helicobacter spp* in gastric samples from the antro-pyloric region of mixed-breed pigs of different ages and sexes, obtained from refrigerators in the Río Cuarto area. The gastric samples were subjected to hematoxylin and eosin staining for the diagnosis of acute and chronic gastritis. The presence of *Helicobacter* was detected by observation of histological cut colored with Giemsa, Warthin-Starry and Immunohistochemistry with commercial antibodies. The detection of bombesin-producing cells was performed by immunohistochemical techniques with commercial antibodies. The percentage of bombesin-positive cells was determined in gastric biopsies of pigs with acute gastritis H (+) / (-) and chronic gastritis H (+) / (-). Gastritis was diagnosed with H / E, with a higher proportion of chronic than acute lesions. The presence of *Helicobacter spp* was determined with Giemsa and Warthin-Starry. In gastric samples of pig we can infer that there are at least two species colonizing the stomach, one larger and intensely spiral and another smaller and shaped as italic "s", which correspond to *Helicobacter heilmannii* and *Helicobacter pylori*, respectively. The immunodetection of *Helicobacter spp* was expressed in the epithelium, gastric pit and gastric gland. A higher percentage of bombesin-positive cells was found in gastric samples of pigs diagnosed with chronic gastritis H (+) with respect to samples with acute gastritis H (+) ($p = 0.04$), in samples with chronic gastritis H (+) with respect to the normal mucosa ($p = 0.02$) and in samples with chronic gastritis H (-) with respect to the normal mucosa ($p = 0.005$). In these samples it was also observed that the morphological characteristics of said cells corresponded with open type cells. The location of these cells was in the glandular epithelium, underlying connective tissue and muscle tissue. In the gastric samples of acute gastritis H (+), in those H (-) and in normal mucosa there were no significant statistical differences. In this study, the results

indicate that the increase in the production of bombesin hormone not only refers to its concentration as established by other authors, but also to an increase in the number of cells that produce it. The ability of these microorganisms to colonize naturally and to induce gastric lesions in humans and in different animal species has generated worldwide concern due to their possible zoonotic risk

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

Helicobacter pylori es el principal agente bacteriano implicado en lesiones gastroduodenales inflamatorias en humanos, tales como gastritis crónica, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfomas del tejido linfoide asociado a la mucosa, siendo una de las bacterias patógenas más comunes, con una alta prevalencia a nivel mundial (Pacheco, 2000).

Este microorganismo Gram negativo, 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, efectuándose varios intentos con fines de aislar la bacteria que no lograron prosperar (Tytgort, 1994; Mc Coll *et al.*, 1997; Warren *et al.*, 1997; Morales y Bermudez, 2008). En 1994, *Helicobacter pylori* fue declarado como la principal causa de úlcera péptica y como agente cancerígeno en humano, tal como lo demuestran estudios efectuados sobre el particular (Moreno, 2005). En la actualidad algunos autores sugieren que tanto la gastritis como la úlcera péptica son patologías multifactoriales donde *Helicobacter pylori* no desempeñaría necesariamente un papel relevante en la misma (Valdivia Roldán, 2011). Si bien es sabido que *Helicobacter pylori* está involucrado en enfermedades gástricas de humanos, se ha determinado también la existencia de otras especies de *Helicobacter* que afectarían a diversos animales, tales como *H. mustelae* en hurones, *H. acynonyx* en leopardos y chitas, *H. felis*, *H. heilmannii*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. cynogastricus*, *Flexispira rapini* y *H. bilis* en perros, *H. heilmannii*, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. pylori* y *H. baculiformis* en gatos (Gomez *et al.*, 2006; Odriozola, 2011). Por lo que, el *Helicobacter*, cualquiera sea su especie, es un factor exógeno que podría contribuir a la profundización y perpetuación del cuadro clínico (Hobsley *et al.*, 2008; Valdivia Roldán, 2011; Vikram *et al.*, 2013).

En porcinos se ha logrado reproducir úlcera gástrica mediante la inoculación experimental con *H. pylori* (Rodriguez *et al.*, 2009); además, se ha detectado otra bacteria espiralada, ureasa positiva, que se presenta de manera natural en el cerdo, asociada también a la presentación de úlceras gastroesofágicas. (Queiroz *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 2009). Anteriormente, a este microorganismo se lo identificaba como *Helicobacter heilmannii* o *Helicobacter suis*, los cuales son considerados como la misma especie (Goodwin y Armstrong, 1989; Barbosa *et al.*, 1995; Rodriguez *et al.*, 2009). En la actualidad, se ha determinado que el

Helicobacter heilmannii puede subclasificarse como *H. heilmannii* tipo I y *H. heilmannii* tipo II. El subtipo I está representado por una sola especie, el *Helicobacter suis*, que coloniza el estómago del cerdo; mientras que, el subtipo II, abarca a todas aquellas bacterias conocidas que colonizan la mucosa gástrica tanto de perros como de gatos, incluyendo a *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. cynogastricus*, *H. baculiformis* y *H. heilmannii* (Baele *et.al.* 2008; Smet *et.al.*, 2012; Bento-Miranda, 2014). Más recientemente, se propuso utilizar la terminología *Helicobacter heilmannii sensu lato* para denominar a cualquier bacteria del género *Helicobacter* que no haya sido identificada como *H. pylori* y que haya sido clasificada dentro de los grupos *H.heilmannii* tipo I y II, y la denominación *Helicobacter heilmannii sensu stricto* cuando el microorganismo haya sido identificado mediante técnicas moleculares con su respectivos género y especie (Haesebrouck *et.al.*, 2011; Bento-Miranda, 2014).

La evaluación histológica de muestras gástricas de cerdo con la coloración de Warthin-Starry, reveló la presencia de dos tipos morfológicos de bacterias: la primera, caracterizada por su mayor tamaño y morfología intensamente espiralada, concuerda con las descripciones de *H. heilmannii* y, la segunda, de menor tamaño y con forma de "s" itálica, se corresponde morfológicamente con la bacteria *H. pylori* (Mac Loughlin *et.al.*, 2014). Algunas investigaciones sugieren que estos microorganismos colonizan el estómago del cerdo o que una misma especie podría asumir patrones morfológicos diferentes por causas inherentes al ambiente gástrico del huésped (Makinde *et al.*, 1990; Fox *et al.*, 1997; Rodriguez, 2009).

El *Helicobacter* provoca alteraciones en las células de la mucosa gástrica, afectando la producción de hormonas gastrointestinales, lo que conlleva a la aparición de gastritis. Existen dos teorías que permitirían explicar la patogenia de esta enfermedad, una de ellas postula que los altos niveles de amonio producidos por la enzima ureasa interferiría con la retroalimentación negativa de la gastrina sobre las células parietales; por otro lado, la segunda teoría describe que debido a los cambios inflamatorios inducidos por la bacteria en el tejido gástrico, se alteraría la función normal de la secreción ácida (Levi *et.al.*, 1989)

1.2 ESTÓMAGO DEL CERDO

Descripción anatómica

El estómago es una dilatación del tubo digestivo que se ubica entre el esófago y el duodeno. Su luz está cerrada a proximal por un músculo esfínter que recibe el nombre de cardias, mientras que, en su porción distal, se encuentra obliterada por el píloro. El cardias está ubicado más hacia la izquierda, dentro de la cavidad abdominal y representa la continuación del esófago. El píloro está dirigido hacia la derecha, posee una protuberancia formada por tejido muscular liso y tejido adiposo que se denomina *torus pyloricus* que disminuye la luz del mismo. y se continúa con el duodeno (Konig, 2011). Se encuentra surcado dorsalmente por una pequeña curvatura que recibe el nombre de curvatura menor. A esta se le opone otra curvatura, situada ventralmente, que es la curvatura mayor.

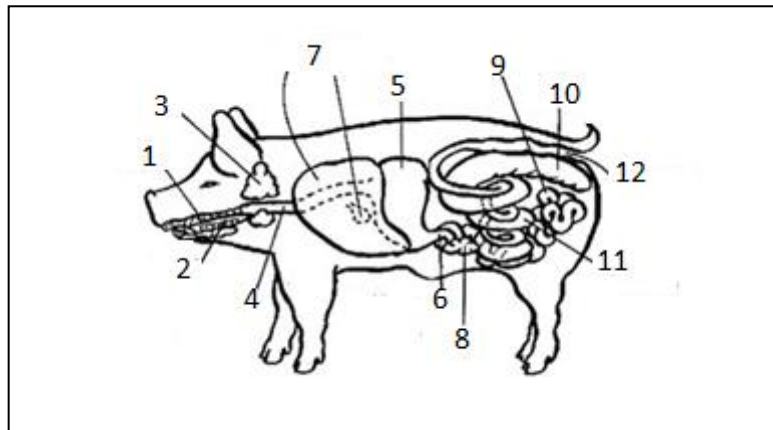


Figura 1: Esquema del aparato digestivo del cerdo. 1- Dientes; 2- Lengua; 3- Glándulas salivales; 4- Esófago; 5- Estómago; 6- Duodeno; 7- Hígado y vesícula biliar; 8- Páncreas; 9- Intestino delgado; 10- Ciego; 11- Intestino grueso-12-Recto. Tomado y adaptado de <http://heritance.me/anatomy-of-digestive-system-of-pig>

La mucosa del estómago del cerdo se puede dividir en cuatro regiones: **la región proventricular** ubicada alrededor del cardias y que se extiende hasta el borde del divertículo a la izquierda. Mantiene las características de la mucosa esofágica, careciendo de glándulas y con bastantes pliegues; **la región glandular cardial** que se extiende hasta la mitad del estómago; **la región glandular fúndica** que es más gruesa que la cardial y de un color rojo oscuro y, **la región pilórica** que es pálida, más gruesa que la fúndica y presenta un número irregular de pliegues (Sisson, 2002).

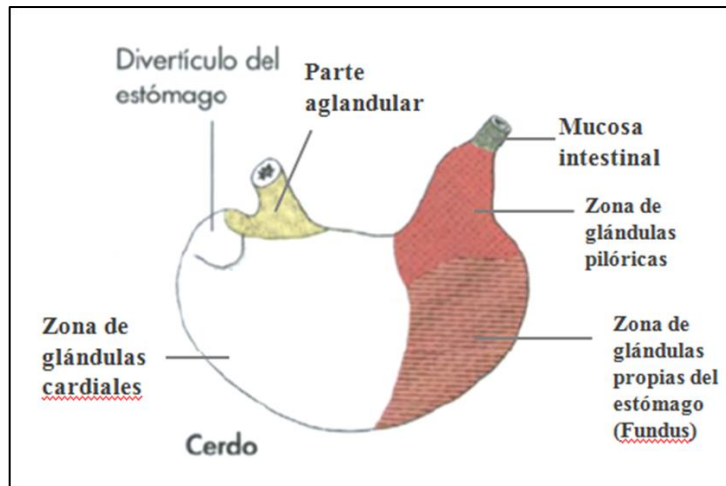


Figura 2: Esquema de la anatomía del estómago del cerdo. Tomado y adaptado de König, 2011.

Vascularización

La irrigación sanguínea del estómago procede de las tres ramas principales de la arteria celíaca.

1. Arteria gástrica izquierda
Es la arteria más grande, alcanza la curvatura menor y se subdivide sobre ambas superficies del estómago.
2. Arteria hepática
 - a. Da origen a la arteria gástrica derecha y a la arteria gastroepiploica derecha. La arteria gástrica derecha alcanza la curvatura menor del estómago y se anastomosa con la arteria gástrica izquierda; mientras que, la gastroepiploica derecha perfunde a la curvatura mayor del estómago.
3. Arteria esplénica,
 - a. Da origen a la arteria gastroepiploica izquierda. Esta perfunde a la curvatura mayor del estómago y se anastomosa con la arteria gastroepiploica derecha. Tanto de la arteria esplénica como de las gastroepiploicas, surgen ramas que se dirigen hacia la curvatura mayor del estómago y lo rodean como una abrazadera (König, 2011).
4. Las venas del estómago discurren al lado de las arterias y se dirigen hacia la vena porta.

Inervación

El estómago está inervado por fibras parasimpáticas dentro de los dos troncos vagales, y por fibras simpáticas. Las fibras parasimpáticas del vago hacen sinapsis sobre células ganglionares en plexos intramurales dentro de la submucosa y las capas musculares, ejerciendo control sobre la motilidad gástrica. En la región cercana al esófago, la actividad vagal suprime la contracción muscular y conduce a la relajación; en la porción cercana al duodeno, la estimulación vagal provoca una actividad peristáltica intensa. El nervio vago también es el encargado de estimular la secreción gástrica (Dyce *et.al.*, 1991 y Konig, 2011)

Sistema linfático

Los vasos linfáticos se dirigen hacia los nódulos linfáticos gástricos, que se localizan en la proximidad de la curvatura menor y junto al cardias. Reciben la linfa proveniente de gran parte del estómago, del extremo caudal del esófago, diafragma y páncreas (Konig, 2011).

Estructura histológica

Histológicamente, el estómago del cerdo presenta una porción glandular y una no glandular. Ambas porciones respetan el patrón de tunicas típico de los órganos huecos.

La porción aglandular está tapizada por un epitelio estratificado plano queratinizado y se localiza alrededor del cardias.

La porción glandular será descrita a continuación y con más detalle debido a que es allí donde se asienta el patógeno en estudio.

Túnica Mucosa

La mucosa de la porción glandular del estómago está compuesta por un epitelio cilíndrico simple, de citoplasma muy pálido debido a la gran cantidad de mucopolisacáridos que se producen y secretan para proteger al epitelio de la acción de enzimas hidrolíticas y del ácido clorhídrico, componentes del jugo gástrico. Este epitelio presenta una serie de pliegues, cuyas salientes se denominan áreas gástricas y, las fosas que quedan entre ellos, que reciben el nombre de criptas gástricas, en las que desembocan las glándulas (Gazquez Ortiz y Blanco Rodríguez, 2004).

Las glándulas gástricas se ubican debajo del epitelio y están rodeadas por una delgada capa de tejido conectivo laxo, que corresponde a la **lámina propia**. Estas glándulas difieren en su constitución dependiendo de la región del estómago en donde se encuentren.

GLÁNDULAS GÁSTRICAS

Región cardial

Las glándulas cardiales están limitadas a una estrecha porción del estómago (cardias) que rodea al orificio esofágico superior. Su secreción, combinada con la de las glándulas esofágicas cardiales, contribuye al jugo gástrico y también ayuda a proteger el epitelio esofágico contra el reflujo ácido del estómago. Son tubulares, un poco tortuosas y ramificadas. Están compuestas por células secretoras de moco con ocasionales células enteroendócrinas entremezcladas (Ross y Pawlina, 2012).

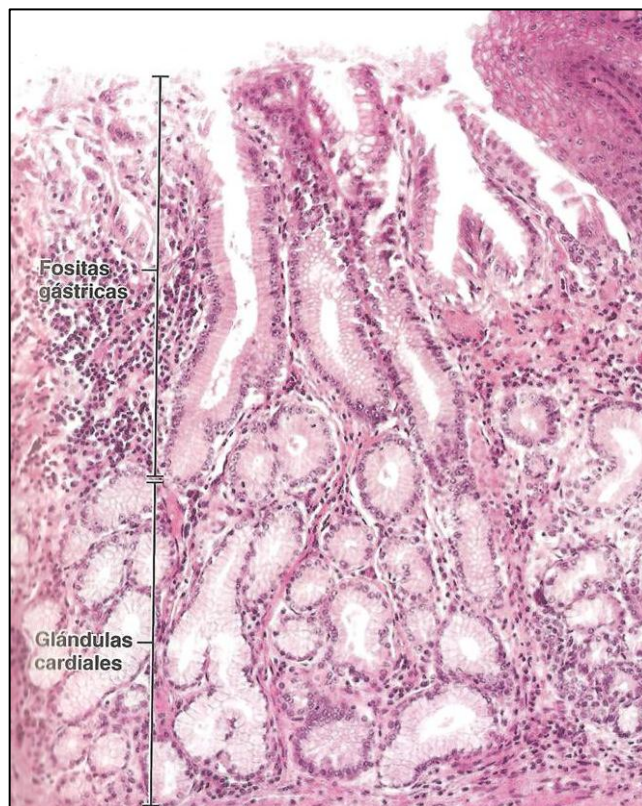


Figura 3: Transición esofagogástrica. Obsérvese el epitelio estratificado plano del esófago en el ángulo superior derecho de la imagen. Las glándulas cardiales son tubulares, un poco tortuosas y a veces ramificadas. 240 x. Tomado de Ross y Pawlina, 2012.

Región pilórica

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 enteroendócrinas y a veces células parietales (Ross and Pawlina, 2012).

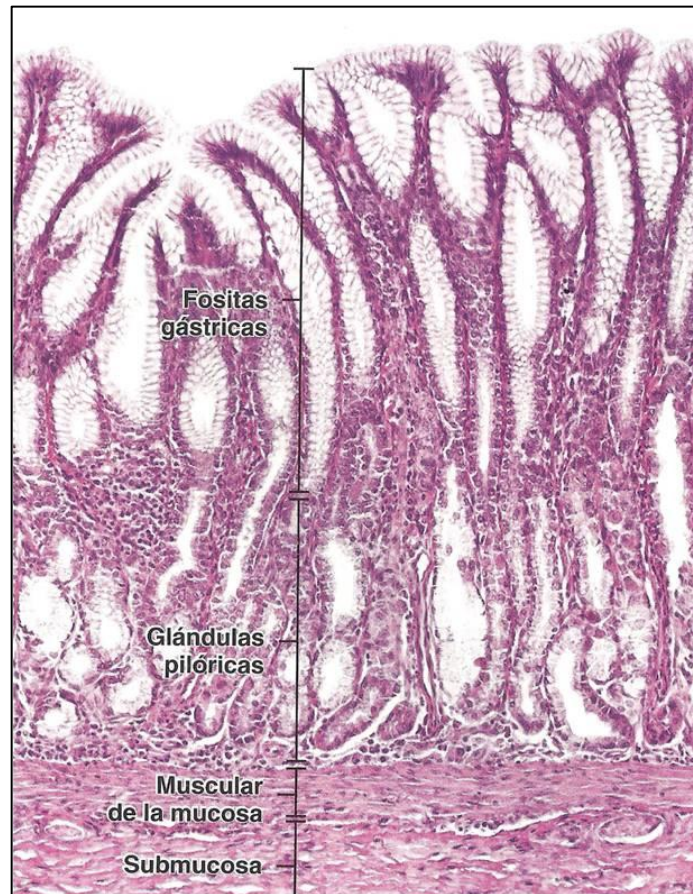


Figura 4: Región antopilórica. Las glándulas pilóricas son bastante rectas en la mayor parte de su longitud pero se enrollan un poco cerca de la muscular de la mucosa. La luz es relativamente amplia y las células secretoras tienen un aspecto similar al de las células mucosas superficiales, lo que indica una secreción bastante viscosa. Están restringidas en la mucosa y vierten su producto en las fositas gástricas. 120 x. Tomado de Ross y Pawlina, 2012.

Región fúndica

Son glándulas de tipo tubular, ramificadas y que se dividen en cuello o istmo, cuerpo y base. Están constituidas por diferentes tipos celulares: células mucosas superficiales y profundas, células parietales, células principales, células enteroendócrinas y células indiferenciadas.

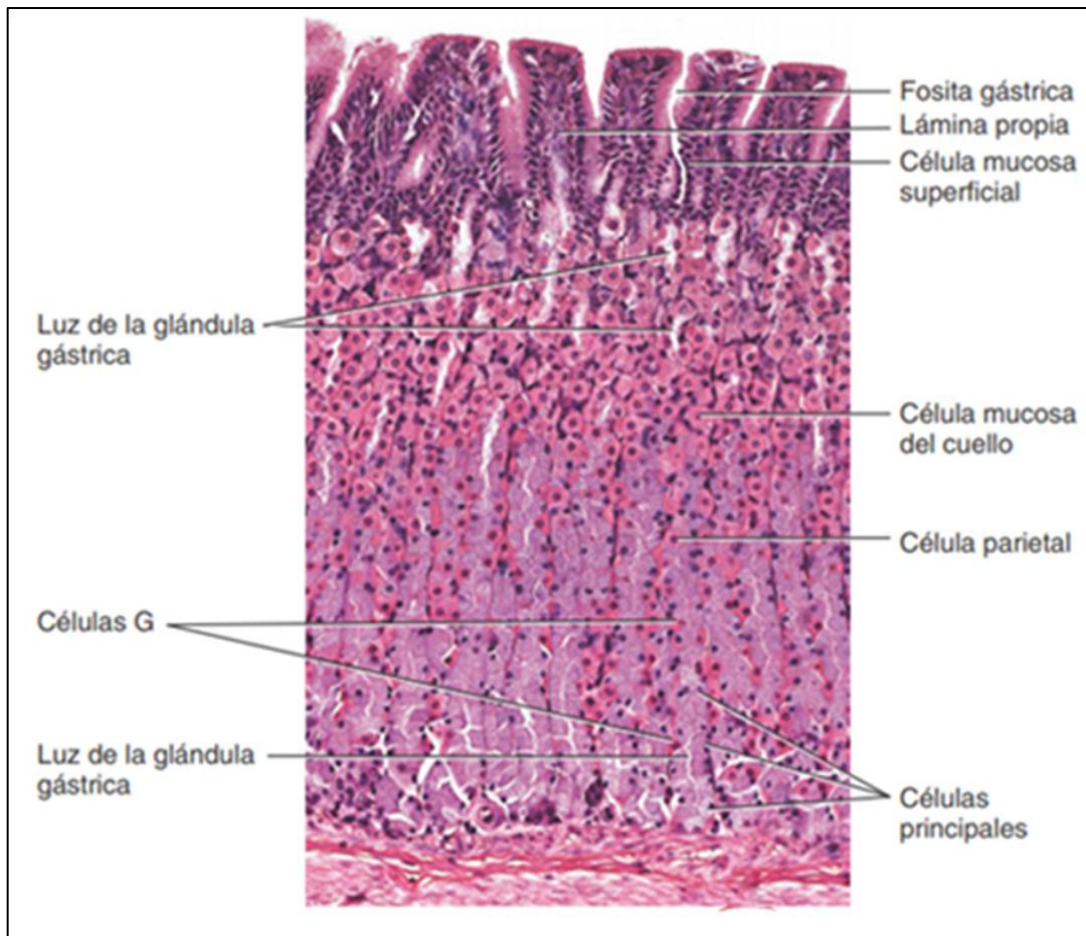


Figura 5: Imagen histológica de las glándulas fúndicas del estómago en corte transversal con tinción de Hematoxilina-Eosina. Mucosa: se observan áreas gástricas, criptas, epitelio cilíndrico simple. En la lámina propia podemos observar las glándulas fúndicas. Se distinguen los tipos celulares: células mucosas superficiales y mucosas del cuello, células parietales, principales y células G. Tomado de Tortora y Derrickson, 2006.

Los tipos celulares que componen las distintas glándulas gástricas son:

a) Mucosas superficiales:

Las células mucosas superficiales son células epiteliales hexagonales con ápices que protruyen hacia la luz gástrica. El núcleo basal es redondeado y el citoplasma presenta cierta basofilia debido a un retículo endoplásmico rugoso prominente y abundantes mitocondrias. Presentan gránulos de moco densos que dan positivos a la reacción de Schiff. Estos contienen una mucina alcalina y viscosa que se adhiere a la superficie de la mucosa para formar una capa protectora que se combina con los iones HCO_3^- , también producidos por estas células (Alaminos García, 2005).



Figura 6. Esquema de una célula mucosa de la superficie, secretora de moco. Tomado de Gartner y Hiatt, 2011.

b) Células mucosas del cuello

Son más escasas y están ubicadas entre el istmo de la glándula y el fondo de las criptas. Son bajas, cilíndricas, con un nucléolo prominente y contienen gránulos de moco y ribosomas libres. El aparato de Golgi está bien desarrollado y presenta escasas mitocondrias. Pueden diferenciarse en células de las criptas o mucosas superficiales e incluso formar células parietales, principales o enteroendócrinas (Alaminos García, 2005).

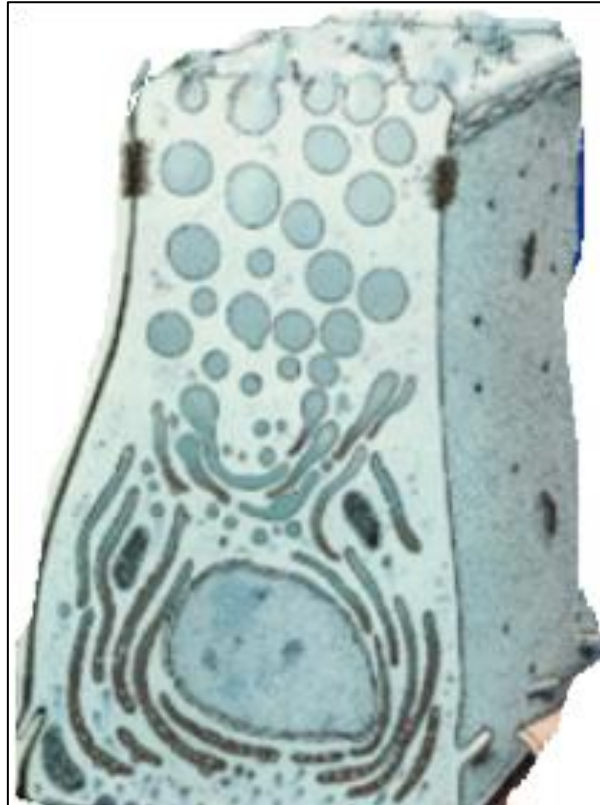


Figura 7: Esquema de una célula mucosa del cuello, secretora de moco. Tomado de <https://www.ec-europe.com/es/ilustracion-medica/gastroenterologia/>

c) Parietales u oxínticas:

Se encuentran en el cuello y cuerpo de las glándulas gástricas. Son de gran tamaño y presentan morfología poliédrica. El núcleo se localiza en posición central y su citoplasma es amplio e intensamente acidófilo. Posee receptores tanto para gastrina como para histamina y acetilcolina.

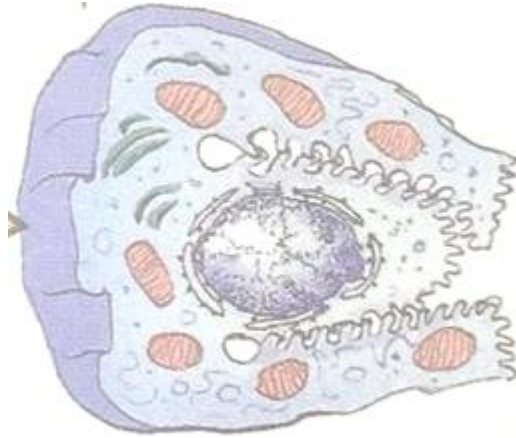


Figura 8: Esquema de una célula parietal.
Tomado de Gartner y Hiatt, 2011.

Esta célula de secreción activa, es la encargada de producir ácido clorhídrico (HCl), el cual es necesario para mantener el pH inferior a 3 y permitir que el pepsinógeno se active a pepsina. Para cumplir esta función, las células parietales pueden ser estimuladas de tres diferentes maneras: a) mediante la liberación de acetilcolina por las neuronas parasimpáticas, b) secreción de gastrina por las células G y c) mediante la histamina, sustancia parácrina liberada por mastocitos de la lámina propia. Es por ello que estas células poseen 3 tipos diferentes de receptores de membrana para estas sustancias: receptores de gastrina, receptores histamínicos H₂ y receptores acetilcolínicos M₃. La acetilcolina y la gastrina actúan estimulando a las células parietales para que secreten más HCl en presencia de histamina, por lo que dicha hormona actúa sinérgicamente y potencia los efectos de la acetilcolina y la gastrina. El principal mecanismo para la estimulación de la célula parietal es la activación del receptor gástrico por la gastrina (Tortora y Derrickson, 2006).

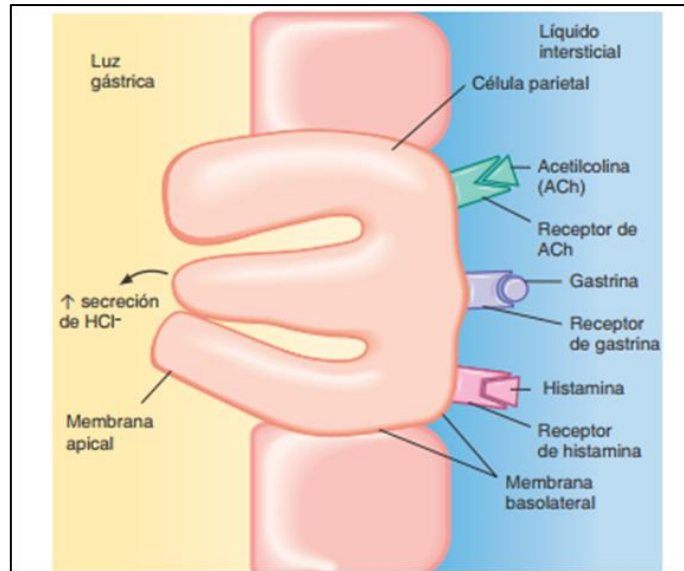


Figura 9: Mecanismo de secreción del ácido gástrico a partir de las células parietales del estómago. Tomado de Tortora y Derrickson, 2006.

d) Principales

Se localizan en el fondo y cuerpo de la glándula. Son más pequeñas que las parietales y su citoplasma es basófilo. El polo apical contiene gránulos de secreción (de zimógeno) de los precursores de las enzimas gástricas, principalmente pepsinógeno. Esta enzima, gracias al pH ácido, se transforma en pepsina, forma activa de la enzima.



Figura 10: Esquema de una célula principal. Tomado de Gartner y Hiatt, 2011.

e) Enteroendócrinas o enterocromafines

Denominadas de esta forma por su reacción ante sales de plata, se localizan en la base de las glándulas gástricas, en contacto con la membrana basal. Forman parte del sistema enteroendócrino, encargado de enviar señales hormonales de una porción a otra del tubo digestivo. En el estómago se localizan las células G, productoras de la hormona gastrina, la cual activa la síntesis y secreción de jugo gástrico y la motilidad gástrica (Gazquez Ortiz, 2004). En cuanto a las células similares a las enterocromafines, en el estómago tenemos las células productoras de histamina, otra de las sustancias involucradas en la secreción de ácido clorhídrico.



Figura 11: Esquema de una célula enteroendócrina. Tomado de Gartner y Hiatt, 2011.

f) Indiferenciadas

Se localizan en el cuello o istmo de la glándula, son cilíndricas o cúbicas sin gránulos u otros componentes específicos en el citoplasma. Pueden sufrir mitosis y dar origen a células que se diferenciaran a los otros tipos celulares de la mucosa gástrica (Geneser, 2000)



Figura 12: Esquema de una célula indiferenciada. Tomada de <https://vdocuments.mx/celulas-del-esofago-y-estomago.html>

Debajo de la lámina propia, se observa una serie de fibras musculares lisas que corresponden a la capa **muscular de la mucosa**.

Túnica Submucosa

Esta túnica está constituida por tejido conectivo laxo, en la que suele haber leucocitos que conforman folículos linfoides aislados, vasos sanguíneos, plexos nerviosos de Meissner y fibras colágenas y elásticas (Gazquez Ortiz y Blanco Rodriguez, 2004; Konig, 2011).

Túnica Muscular

Está conformada por tres capas de músculo liso, cuya disposición es:

- a) Oblicua interna, que se presenta solo en algunas partes.
- b) Circular media
- c) Longitudinal externa

Entre las capas media y externa se encuentra el plexo mioentérico o de Auerbach, del sistema nervioso autónomo que inerva al estómago.

Túnica Serosa

La túnica serosa está conformada por tejido conectivo laxo y recubierta por epitelio plano simple, que se une al peritoneo parietal por medio de un meso dorsal y uno ventral, que lo unen a la pared abdominal (Konig, 2011).

1.3 *Helicobacter spp.*

Las bacterias del género *Helicobacter* son bacilos espiraliformes, gram negativos y móviles, generalmente encontrados en tracto gastrointestinal de humanos y animales. Poseen un tamaño que oscila entre los 2,5-3,5 μm de largo por 0,5-1 μm de ancho. Es microaerófilo, su temperatura óptima es de 37° C, es oxidasa, catalasa y ureasa positiva. Esta última se utiliza como prueba diagnóstica de infección por *Helicobacter pylori* en humanos debido a que al ser una proteobacteria, el *Helicobacter* tiene la facultad de producir grandes cantidades de ureasa en cultivos bacterianos (Madigan *et.al.* 2009).

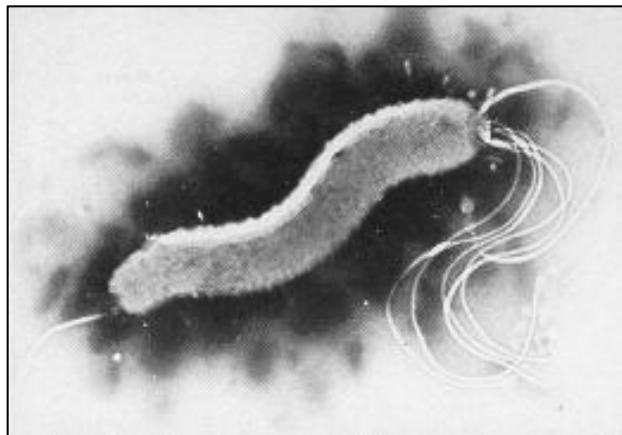


Figura 13. Imagen de *Helicobacter pylori* obtenida mediante microscopía electrónica. Tomado de: www.helicobacterspain.com

1.4 *Helicobacter* DE IMPORTANCIA EN EL CERDO

Helicobacter suis es una bacteria Gram negativa, cuya morfología se corresponde con la de un espiral y que frecuentemente coloniza el estómago de los cerdos. Es considerada como el helicobacter no- *Helicobacter pylori* (NHPH) de mayor prevalencia en humanos, en los que

puede causar gastritis, ulcera gástrica, linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) y, esporádicamente, adenocarcinoma gástrico. Por otro lado, las presentaciones clínicas en cerdos infectados con *Helicobacter suis* incluyen gastritis y reducción de la ganancia diaria de peso, entre otros cambios patológicos a nivel gástrico (Zhang *et. al.*, 2016).

Las infecciones por largos períodos de tiempo, producidas por *Helicobacter suis*, pueden inducir necrosis de las células parietales y son hallazgos frecuentes en pacientes humanos con gastritis crónicas infectados con helicobacter no-*Helicobacter pylori*. Está descrito que otras especies gástricas como *H. pylori*, *H. heilmannii* y *H. felis* también pueden causar pérdida de las células parietales, derivando en una desregulación de la morfología gástrica y en el desarrollo de metaplasia intestinal (Zhang *et.al.*, 2016).

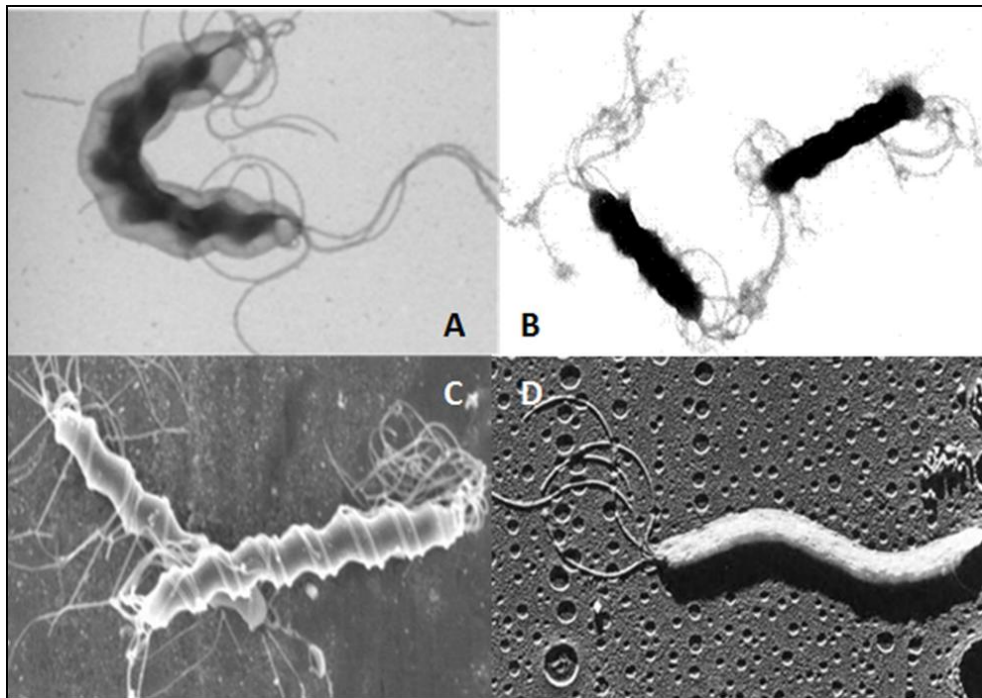


Figura 14 : Especies de Helicobacter que afectan al cerdo. A- Imagen de *Helicobacter suis*. Tomado de Baele *et. al.*, 2008. B- Imagen de *Helicobacter heilmannii*. Tomado de Smet *et.al.*, 2012 C- Imagen de *Helicobacter felis* tomado de http://www.cab.unimelb.edu.au/cab_helicobacter.htm. D- Imagen de *Helicobacter pylori*. Tomado de <http://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter11.htm>

1.5 GASTRITIS

La gastritis es la enfermedad inflamatoria, aguda o crónica, de la mucosa gástrica, provocada por factores endógenos y exógenos, que produce síntomas dispépticos y cuya existencia se sospecha clínicamente y se confirma histológicamente. Es etiológicamente multifactorial observándose que en un solo paciente pueden intervenir múltiples factores, siendo el más común el *Helicobacter pylori* (Valdivia Roldán, 2011).

El daño de la mucosa depende del tiempo de permanencia del factor o factores injuriantes, teniendo especial importancia la capacidad de la barrera gástrica para resistir a ellos. El trastorno de dicha barrera origina la lesión de la mucosa, permitiendo la acción del ácido clorhídrico, proteasas y ácidos biliares, pudiendo llegar hasta la lámina propia (Valdivia Roldán, 2011).

El sistema Sidney propone clasificar a las gastritis en:

Gastritis aguda

Las gastritis agudas se caracterizan por presentar un infiltrado inflamatorio predominantemente neutrofílico, pudiendo acompañarse por hemorragia de la mucosa y erosiones (Valdivia Roldán, 2011).

- a- Gastritis aguda erosiva o ulcerada: En el caso del cerdo, es posible encontrar este tipo de gastritis como secundaria a cuadros patológicos graves con repercusión multiorgánica como estrés, shock, sepsis y lesiones graves del sistema nervioso central. La mucosa del estómago se encuentra hiperémica, edematosa, con petequias dispersas, erosiones e incluso úlceras. Los mecanismos de desarrollo involucrarían una hipersecreción de ácido clorhídrico, modificaciones microcirculatorias a raíz del shock o sepsis, menor producción de mucus y déficit de prostaglandinas (Durarte, 2010; Valdivia Roldán, 2011).

Gastritis crónica

La gastritis crónica es una inflamación que afecta solo a la mucosa, sin alteraciones macroscópicas específicas ni sintomatología definida. Se caracteriza por un infiltrado con linfocitos y/o células plasmáticas y, si además se observa la presencia de leucocitos polimorfonucleares, toma la denominación de gastritis crónica activa. Cuando el infiltrado compromete la zona superficial de la lámina propia, sin comprometer a las glándulas, recibe el nombre de gastritis crónica superficial; mientras que, si el infiltrado abarca a la lámina propia

en toda su extensión, recibe el nombre de gastritis crónica profunda (Durarte, 2010; Valdivia Roldán, 2011).

En el curso de evolución, esta gastritis presenta alteraciones degenerativas de las células epiteliales y reducción de la cantidad de glándulas con áreas variables de atrofia de las mismas, tomando el nombre de gastritis crónica atrófica, pudiendo aparecer también zonas de metaplasia intestinal (Durarte, 2010; Valdivia Roldán, 2011).

1.6 GASTRITIS PROVOCADAS POR *Helicobacter spp.*

La literatura describe al patrón de colonización de esta bacteria como irregular en todo el estómago, con una mayor concentración de microorganismos en el antro y en el cardias. Las bacterias observadas en el cuerpo del mismo se encuentran estrechamente asociadas a las células parietales (Danon *et. al.*, 1998). A pesar de haber sido considerados como flora normal debido a la ausencia de signos inflamatorios, hubo casos en los que estos microorganismos estuvieron asociados a gastritis crónicas activas, agregados linfoides y úlceras. Los pacientes humanos infectados con *Helicobacter pylori* han mostrado exagerados niveles de gastrina, los cuales retornaban a niveles normales luego de la eliminación del agente (Danon *et. al.*, 1998).

Hay dos teorías que permitirían explicar la alteración en la producción de ácido y de gastrina. La primera, propuesta por Levi *et. al.*, (1989) en la que se creía que los altos niveles de amonio producidos por la enzima ureasa que posee el *Helicobacter*, interferían con la retroalimentación negativa de la gastrina sobre las células parietales. Esta liberación continua de gastrina por parte de las células G podría estimular a dichas células para aumentar su masa celular, derivando en una mayor producción de ácido.

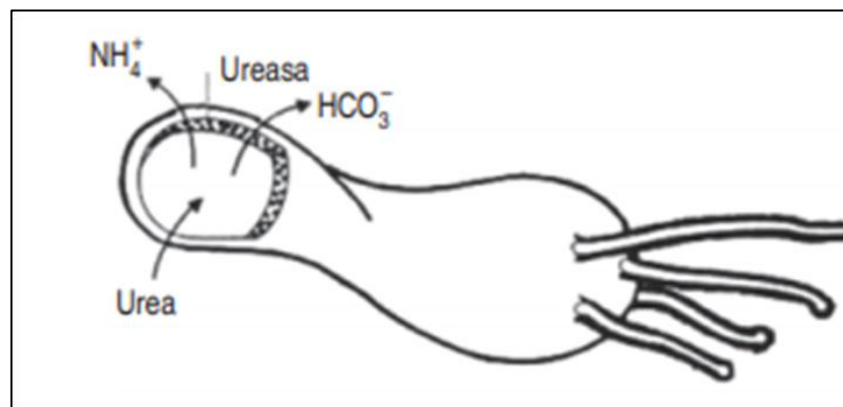


Figura 15: Mecanismo de acción de la ureasa. Tomado de Cervantes-García, 2016.

Por otro lado, la segunda hipótesis, sugiere que los cambios producidos por *Helicobacter pylori* en el huésped están relacionados a la respuesta inflamatoria del tejido gástrico y al desarrollo de úlceras gástricas, que resultan en una alteración de la fisiología gástrica (Danon *et.al.*, 1998).

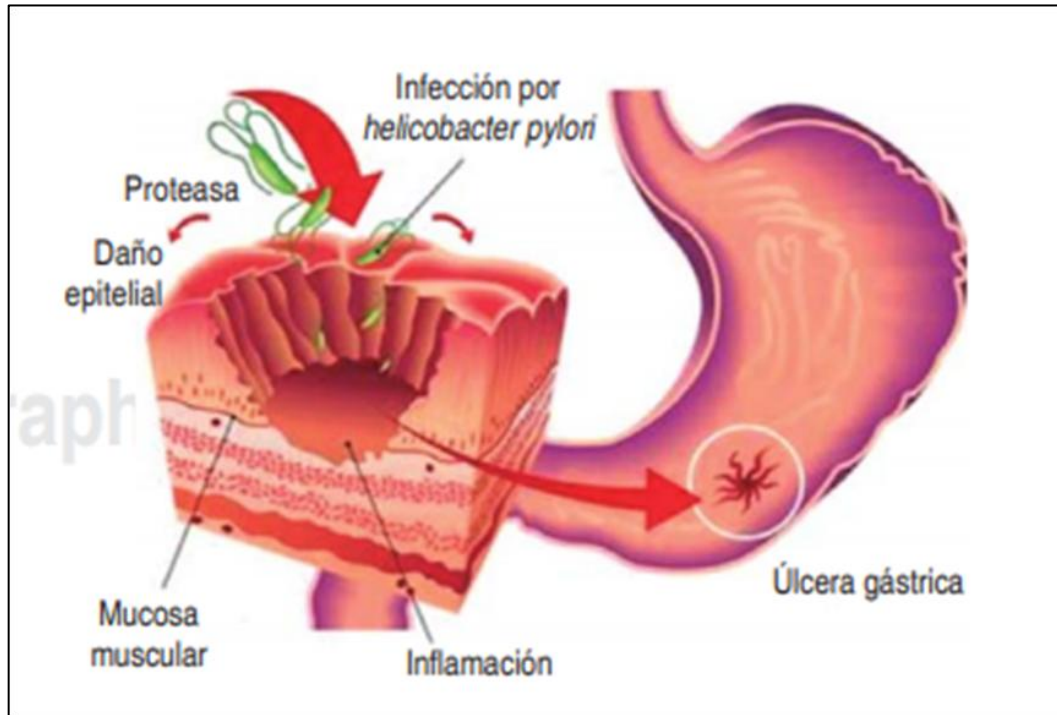


Figura 16: Desarrollo de la infección por *Helicobacter pylori*. Tomado de Cervantes-García, 2016

En contraste con otras especies, las úlceras gástricas en cerdos se desarrollan casi exclusivamente en la *pars oesophagea*, una pequeña área alrededor del cardias desprovista de glándulas. Por este motivo, esta región no posee la protección del mucus y es altamente susceptible a la irritación por ácido clorhídrico, producido por las glándulas fúndicas. La injuria crónica de la *pars oesophagea* resulta en hiperqueratosis, erosión y, por último, ulceración (De Witte *et. al.*, 2017). Sin embargo, estudios realizados por Rodríguez *et. al.*, (2009) y Mac Loughlin *et.al.*, (2017) reportaron que las regiones en las que mayormente se asienta el *Helicobacter*, corresponden a la mucosa fúndica y pilórica del estómago.

Reportes recientes indican que *H. suis* podría alterar la homeostasis de las células parietales de los cerdos y afectar la expresión de genes que codifican para la ATPasa H^+/K^+ , enzima asociada a las células parietales y que está involucrada en la producción de ácido. A su vez, las

células G productoras de gastrina y las células D productoras de somatostatina también pueden verse alteradas (De Witte *et. al.*, 2017).

Modificación de la secreción gástrica según el curso de la infección

De Witte *et.al.*, (2017) llevaron a cabo un experimento en el que analizaron las diferentes modificaciones producidas en ciertos marcadores de secreción ácida gástrica que utilizaron para evaluar la secreción gástrica, así como también las variaciones histológicas en la composición celular de las glándulas gástricas como indicadores de alteración en la fisiología del estómago. A través de este estudio, pudieron determinar que en la fase aguda de la enfermedad no se observaron modificaciones en los marcadores de secreción ácida ni en la composición celular de las glándulas gástricas; mientras que, en la fase crónica de la enfermedad, en la que se observaron lesiones severas, se constató un aumento en los marcadores y en el número de células G productoras de gastrina.

1.7 HORMONAS GASTROINTESTINALES

El aparato digestivo es considerado como el mayor órgano endócrino existente, aunque en vez de tener una estructura delimitada propia de otras glándulas endócrinas, las células de secreción interna se presentan diseminadas a lo largo del tubo digestivo y glándulas anexas. Muchos de estos mediadores también están presentes en el encéfalo y médula espinal y participan no solo en el control de procesos digestivos, sino también de otras funciones como es el caso de la colecistoquinina involucrada en el comportamiento alimentario y maternal. A su vez, existen moléculas de carácter hormonal que ejercen su acción sobre las células cercanas al punto de liberación (parácrina). Un ejemplo de esto es el péptido somatostatina en la mucosa gástrica, donde inhibe a las células productoras de ácido clorhídrico y a las productoras de gastrina, situadas en la cercanía (García Sacristan *et. al.*, 1995).

Las hormonas gastrointestinales son sintetizadas por dos tipos celulares presentes en el aparato digestivo: células endócrinas y neuronas. Las células endócrinas se encuentran situadas tanto en los islotes de Langerhans del páncreas, como a lo largo de la pared del tubo digestivo. Presentan gránulos de secreción que captan sales de plata espontáneamente (células enterocromafines) o al añadir algún agente reductor (células argirófilas) (García Sacristán *et.al.*, 1995). Existen varias hormonas GI que poseen una función perfectamente establecida como lo son la secretina, colecistocinina (CCK), gastrina, péptido gástrico inhibitor (GIP) y motilina (Leite y Castro Chavez, 2002).

Tabla 1. Acciones fisiológicas de algunas hormonas gastrointestinales. Tomado y adaptado de Ross y Pawlina, 2012.

HORMONA	SITIO	DE	ESTIMULA	INHIBE
Gastrina	Células estómago	G del	Secreción gástrica	ácida
Ghrelin	Células estómago	G del	Secreción de STH y percepción del hambre.	Metabolismo lipídico. Utilización de grasas en tejido
Colecistocinina	Células duodeno y yeyuno	I del	Contracción vesícula biliar. Secreción enzimas pancreáticas. Secreción de bicarbonato por el páncreas. Crecimiento pancreático	Vaciamiento gástrico
Secretina	Células duodeno	S del	Secreción enzimas pancreáticas. Secreción de bicarbonato por el páncreas. Crecimiento pancreático.	Secreción gástrica
Péptido inhibidor gástrico	Células duodeno y yeyuno	K del	Liberación de insulina	Secreción gástrica
Motilina	Células duodeno y yeyuno	Mo del	Motilidad gástrica e intestinal.	
Polipéptido pancreático	Células páncreas	PP del	Vaciamiento gástrico y motilidad intestinal	Secreción de enzimas pancreáticas
Péptido YY	Células y colon	L del íleon	Absorción de agua y electrolitos en colon	Secreción gástrica, vaciamiento gástrico e ingesta de alimento
Somatostatina	Células mucosa de todo el tubo digestivo	D de la		Liberación de gastrina. Secreción gástrica. Liberación de otras hormonas gastrointestinales

Histamina	Mucosa de todo el tubo digestivo	Secreción gástrica	ácida		
Bombesina	Estómago	Liberación de gastrina			
Encefalinas	Mucosa y músculo liso de todo el tubo digestivo	Contracción del músculo liso		Secreción intestinal	
Péptido intestinal vasoactivo	Mucosa y músculo liso de todo el tubo digestivo	Secreción de enzimas pancreáticas		Contracción del músculo liso	
		Secreción intestinal		Contracción esfinteriana	

En el tracto gastrointestinal, existen 2 plexos ganglionares: el plexo mientérico o de Auerbach (ubicado entre las capas longitudinales y circular de la musculatura lisa) y el submucoso o de Meissner (situado en la submucosa). Ambos se caracterizan por poseer neuronas sensoriales y motoras, que conectadas sinápticamente por microcircuitos controlan la motilidad, el flujo sanguíneo, la secreción y la absorción del aparato digestivo. Las razones que justifican la inclusión de los neuropéptidos en la patogénesis de la gastritis asociada con *Helicobacter pylori* descansan en la existencia de diversos trastornos funcionales de la secreción clorohidropéptica, el vaciamiento y la motilidad gástricas, que se observan en los pacientes afectados (Piñol Jiménez y Paniagua Estévez, 2006)

1.8 BOMBESINA

El péptido bombesina, de 14 aminoácidos, se aisló de la piel de los batracios y forma parte de un amplio grupo de neuropéptidos con diversas funciones biológicas. Las principales bombesinas de origen mamífero son dos: el péptido liberador de gastrina (GRP) y la neuromedina B (NMB), cuya función aún no está perfectamente establecida (Grider, 2004; Arteaga de Murphy, 2005). Se encuentra inmunorreactividad a este péptido en los nervios y también en las células endócrinas gástricas, existiendo neuronas de bombesina tanto en el cuerpo como en el antro gástrico (Alaminos García, 2005).

Está comprobado que la secreción de ácido gástrico provocada por la bombesina, tanto en humanos como en perros, siempre se ve acompañada por un notable incremento de la actividad de la gastrina en el plasma, lo que sugiere la posibilidad de que la bombesina es un factor liberador de gastrina (Bertaccini *et. al.*, 1973).

Se ha demostrado en numerosos estudios que la bombesina tiene acciones biológicas potentes, entre las que se incluyen funciones secretoras y motoras a lo largo del tracto

gastrointestinal de los mamíferos. Este péptido es el encargado de aumentar la producción de ácido clorhídrico mediante la estimulación de las células parietales. A su vez, posee otras funciones dentro del sistema digestivo, entre las que se encuentra el aumento de la secreción pancreática, de la actividad mioeléctrica intestinal y de la contractilidad del músculo liso (Grider, 2004; Pinol y Paniagua, 2006).

La acción inflamatoria del *Helicobacter spp.* sobre el epitelio gástrico disminuye la cantidad de células D que sintetizan somatostatina, alterando a las células productoras de bombesina, que estimulan a las células G productoras de gastrina. Esto no solo produce un aumento en la cantidad de gastrina sérica, sino también un aumento en el número de células que la producen, incrementándose así la secreción de jugo gástrico y, por consiguiente, la secreción de ácido clorhídrico (Mac Loughlin *et. al.*, 2016).

Por otro lado, la hipergastrinemia ocasionada a raíz de la acción de la bombesina, estimula positivamente a las células enterocromafines para que aumenten la liberación de histamina. Este péptido, al unirse a los receptores presentes en la membrana de las células parietales, estimula aún más la producción de ácido clorhídrico. Si el estímulo de la hipergastrinemia persiste por varias semanas, como sucedería en una gastritis crónica, dichas células responden con una hiperplasia, agravando aún más el cuadro clínico (Delle Fave *et.al.*, 1999).

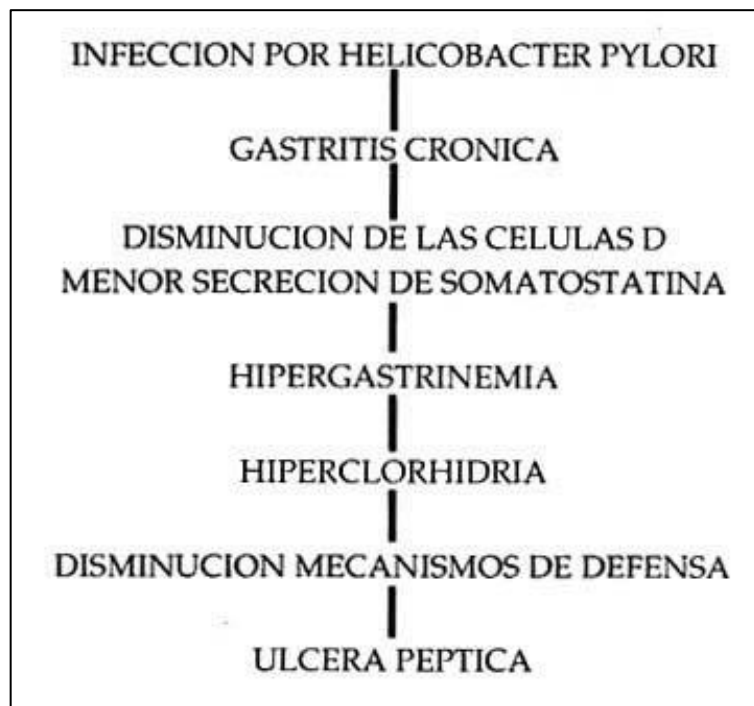


Figura 17: Mecanismo de alteración en la producción de hormonas provocado por *Helicobacter spp.* Tomado de Frisancho Velarde, 1996.

1.9 HIPÓTESIS

Dada la falta de estudios relacionados con la producción de bombesina en cerdos afectados por gastritis, y siendo que existen estudios efectuados en otras especies, también infectadas por dicho agente causal, que han revelado alteraciones en células productoras de bombesina, es de esperarse un comportamiento similar en cerdos que padecen gastritis.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el comportamiento de la hormona gastrointestinal Bombesina en estómago de cerdos afectados por gastritis provocadas por *Helicobacter spp.*

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de gastritis a través de técnicas histológicas convencionales.
- Determinar la presencia de *Helicobacter spp.* en la mucosa gástrica a través de tinciones especiales e inmunohistoquímica.
- Determinar la presencia y expresión cualitativa y cuantitativa de la hormona bombesina mediante la técnica inmunohistoquímica.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Muestras gástricas

Se emplearon cerdos mestizos de diferentes edades y sexos, provenientes de frigoríficos de la zona de Río Cuarto, Argentina (33,11° S, 64,3° O). En todos los casos se trató de animales destinados a faena y considerados libres de enfermedad de acuerdo al examen clínico y postmortem realizado. Se procesaron 60 muestras de estómago de cerdos. Inmediatamente de obtenidas se lavaron con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco) conteniendo 10.000 UI/ml de Penicilina G sódica, 10 mg/ml de sulfato de estreptomicina y 2,5 mg/ml de fungizona, y luego se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio; donde se tomaron porciones de tejido de 4 mm³ aproximadamente, que se fijaron en formol tamponado al 10%. Dichas muestras se incluyeron en parafina y se practicaron cortes de aproximadamente 4 µm.

3.2 Histoquímica:

Parte de las muestras fueron procesadas y coloreadas por la tinción convencional de Hematoxilina-Eosina para realizar el diagnóstico de gastritis mediante el Sistema Sidney; el resto de las muestras fueron sometidas a las tinciones especiales de Giemsa y Warthin Starry para la detección de *Helicobacter spp.* El resto de los cortes se preservó para las técnicas inmunohistoquímicas.

3.3 Inmunohistoquímica:

La técnica de inmunohistoquímica se utilizó para la inmunodetección de *Helicobacter spp* y de células productoras de bombesina.

Se aplicó la técnica indirecta denominada Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) (Gimeno *et al.*, 1997; Paz, 2000; Vissio, 2000;). Los marcadores utilizados fueron anticuerpos primarios comerciales (anti-*Helicobacter pylori* 215A76 Cell Marque Corporation, USA y anti bombesina) mientras que, como reveladores, el Complejo universal avidina-biotina (ABC) y el sustrato peroxidasa diaminobencidina (DAB).

El desarrollo metodológico para esta técnica consistió en:

- Secado en estufa de 37°C.
- Desparafinado con xilol.
- Hidratación con alcoholes de graduación decreciente.
- Lavado con solución buffer fosfato (PBS).
- Incubación con suero normal de caballo.

- Incubación del anticuerpo primario a 4°C en cámara húmeda.
- Incubación con el anticuerpo 2° biotinilado a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Incubación con el Complejo ABC a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Revelado con diaminobencidina (DAB).
- Coloración de contraste con Hematoxilina.
- Montaje.
- Observación, análisis e interpretación al microscopio óptico.
- Obtención de microfotografías mediante una cámara digital Carl Zeiss AxioCam ERc 5s adosada al microscopio óptico.
- Análisis estadístico

3.4 Grupos

Con técnicas convencionales (Hematoxilina/Eosina) se diagnosticaron, en 60 muestras de región glandular de estómago de cerdos, la presencia de gastritis agudas y crónicas; mientras que, con la coloración de Giemsa, se determinó la presencia de *Helicobacter spp.* a fin de corroborar la presencia de dicho microorganismo, se recurrió a la técnica inmunohistoquímica y coloración de Warthin Starry.

Una vez realizados los diagnósticos histopatológicos se clasificaron las muestras en los siguientes grupos:

Grupo A: Gastritis agudas con presencia de *Helicobacter spp*

Grupo B: Gastritis agudas sin presencia de *Helicobacter spp.*

Grupo C: Gastritis crónicas con presencia de *Helicobacter spp.*

Grupo D: Gastritis crónicas sin presencia de *Helicobacter spp.*

Grupo E: Mucosa normal

Luego se procedió a determinar la presencia de la hormona bombesina realizando la técnica inmunohistoquímica de todas las muestras obtenidas empleando, para tal fin, anticuerpos policlonales de conejo anti-bombesina.

La obtención de microfotografías se realizó mediante una cámara digital Carl Zeiss AxioCam ERc 5s adosada al microscopio óptico.

De esas muestras se procedió a identificar las células productoras de bombesina para observar sus características morfológicas, ubicación y conteo de las mismas.

Para el recuento celular se procedió a contar, en cada preparación histológica, 5 (cinco) campos al azar con el fin de obtener el porcentaje de células positivas a bombesina. Se recurrió al conteo a ojo de por lo menos dos investigadores.

3.5 Estudio estadístico

Una vez realizado el conteo de células positivas a bombesina, los resultados fueron sometidos estadísticamente a una Prueba T para muestras independientes utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2011 (Di Rienzo *et. al.*, 2011).

4. RESULTADOS

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

4.1 Estudio microscópico de biopsias gástricas de cerdos

Las muestras gástricas fueron sometidas a tinciones de Hematoxilina-Eosina y Giemsa, lo que permitió analizar las características estructurales de la mucosa gástrica y la presencia de *Helicobacter spp*.

En la Figura 18 se observa una muestra gástrica de la región antral con Hematoxilina-Eosina con diagnóstico de gastritis aguda. Se aprecia una lámina propia de tejido conectivo con abundante células inflamatorias.

En la Figura 19 se observa una biopsia gástrica, región antral teñida con hematoxilina-eosina con diagnóstico de gastritis crónica.

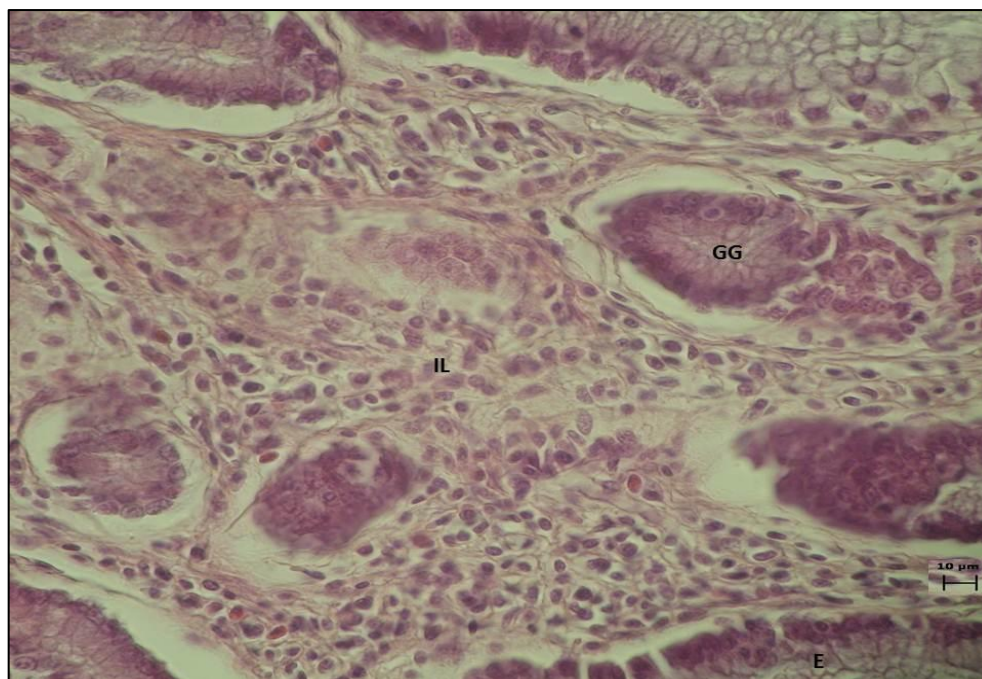


Figura 18: Microscopía óptica de biopsias gástricas, región antral con diagnóstico de gastritis aguda. E: epitelio. GG: glándula gástrica. IL: infiltrado leucocitario. Tinción H/E, 400 x.

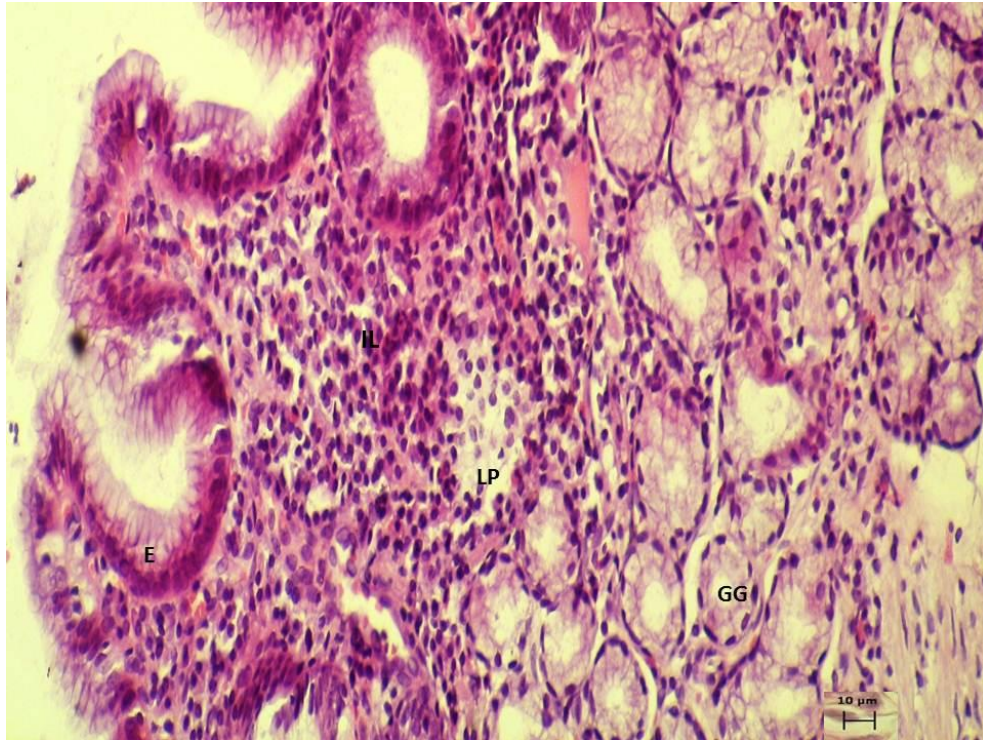


Figura 19: Microscopía óptica de biopsias gástricas, región antral con diagnóstico de gastritis crónica. E: epitelio. LP: lámina propia. GG: glándula gástrica. IL: infiltrado leucocitario. Tinción H/E, 400 x.

En las Figuras 20 y 21 se muestra una biopsia gástrica, región antral con diagnóstico de gastritis sometida a la coloración de Giemsa en la cual se puede observar la presencia de *Helicobacter spp.*

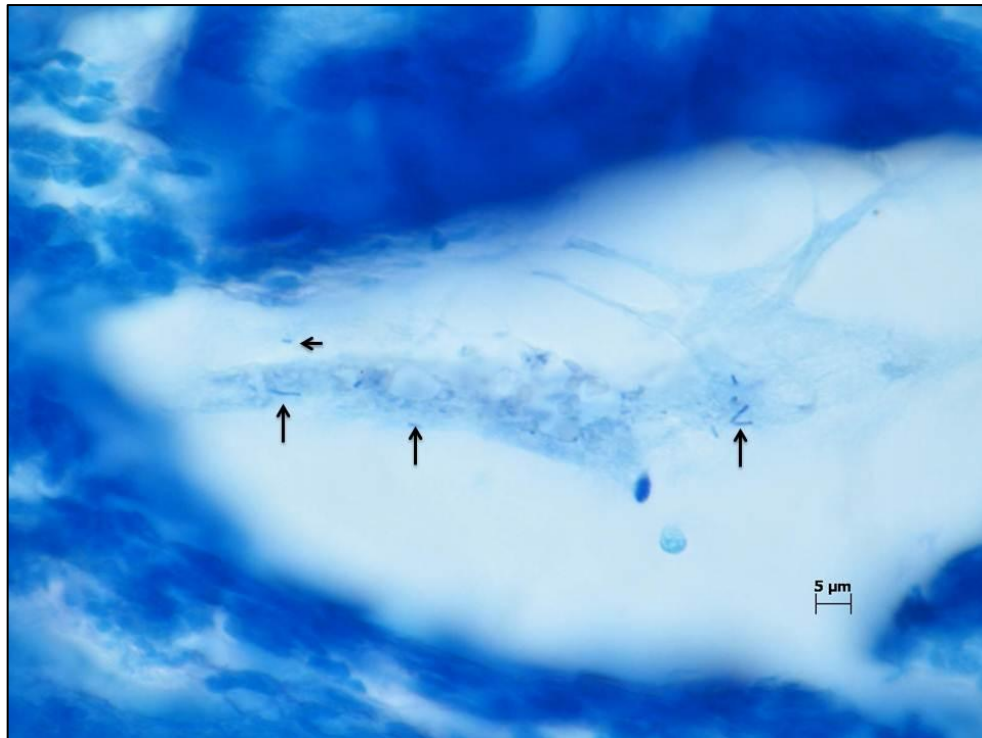


Figura 20: Microscopía óptica de biopsias gástrica, región antral con diagnóstico de gastritis aguda H(+). *Helicobacter* spp. (flecha). Tinción de Giemsa, 1000 x.

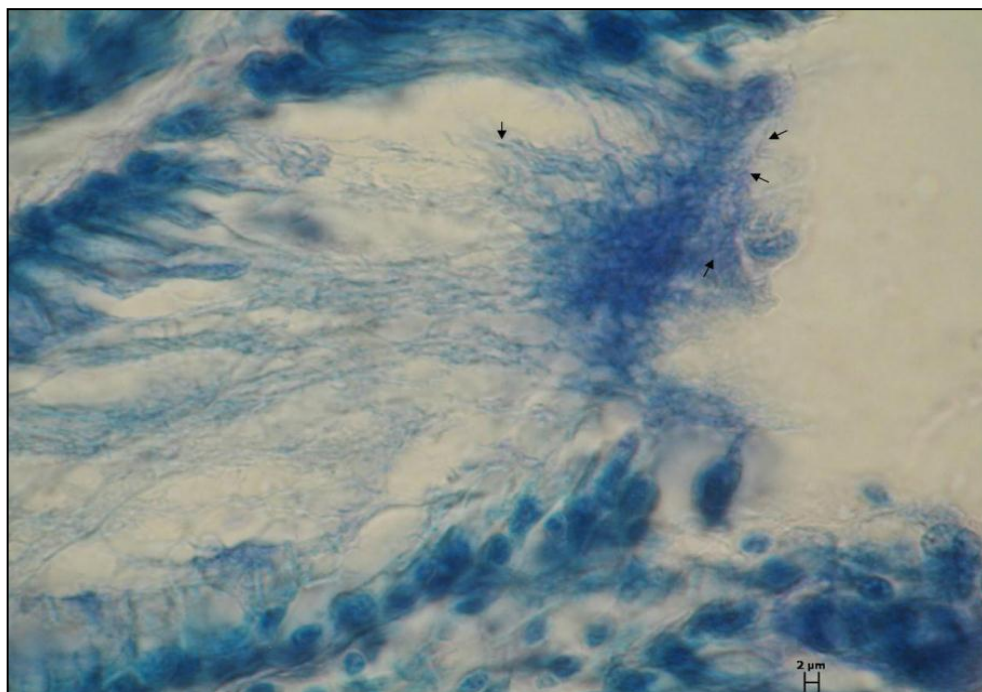


Figura 21: Microscopía óptica de biopsias gástrica, región antral con diagnóstico de gastritis crónica H(+). *Helicobacter* spp. (flecha). Tinción de Giemsa, 1000 x.

La Figura 22 muestra una biopsia gástrica región antral con diagnóstico de gastritis crónica coloreada con la tinción de Warthin-Starry en donde se observan *Helicobacter spp.*

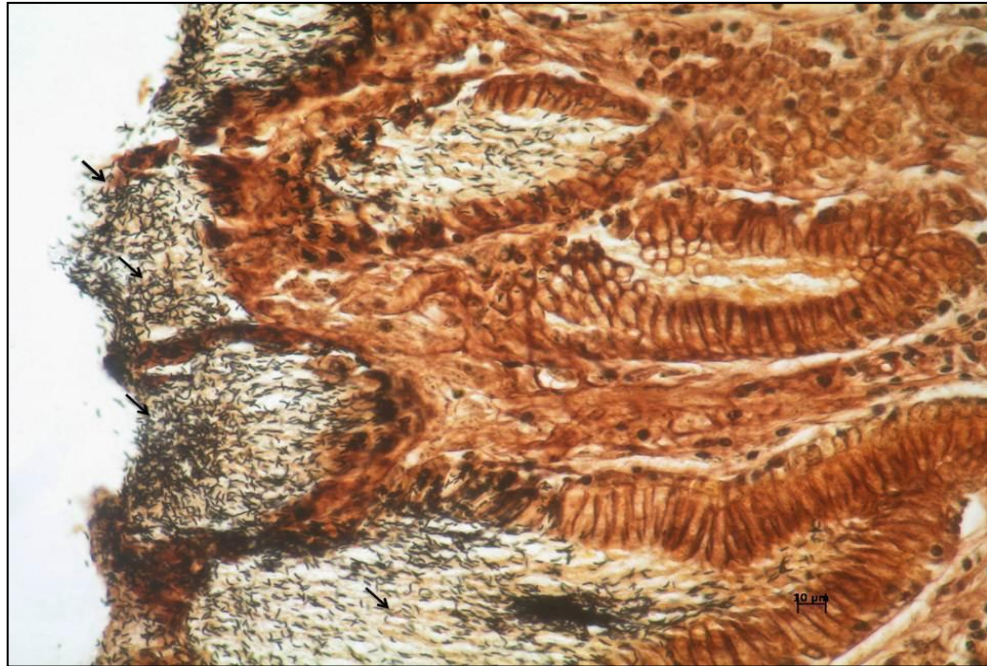


Figura 22: Microfotografía de biopsia gástrica región antral con diagnóstico de gastritis crónica coloreada con la tinción de Warthin-Starry en donde se observan *Helicobacter spp.* (flecha) 1000x.

En la Figura 23 se puede observar una biopsia gástrica de la región antral con diagnóstico de gastritis aguda mediante la tinción de Warthin-Starry, en la que se observa *Helicobacter spp.*

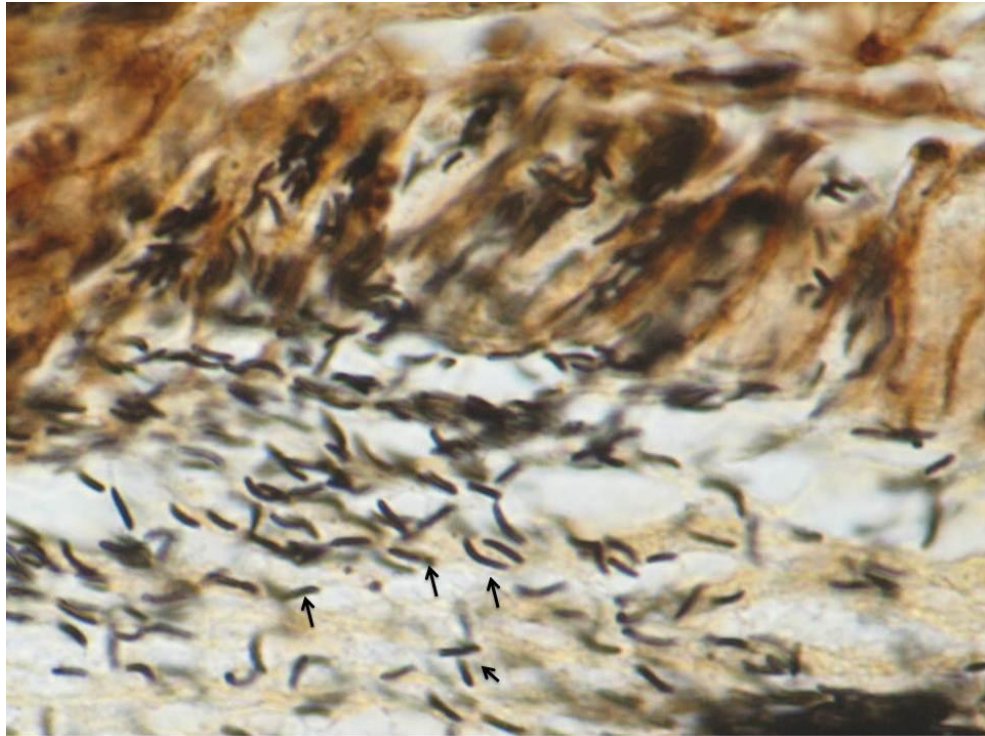


Figura 23: Microfotografía de biopsia gástrica región antral con diagnóstico de gastritis aguda coloreada con la tinción de Warthin-Starry en donde se observan *Helicobacter* spp, (flecha). 1000x.

En la Figura 24 se muestra la inmunomarcación de una célula productora de bombesina en una muestra gástrica región antral con diagnóstico de gastritis aguda H (+).

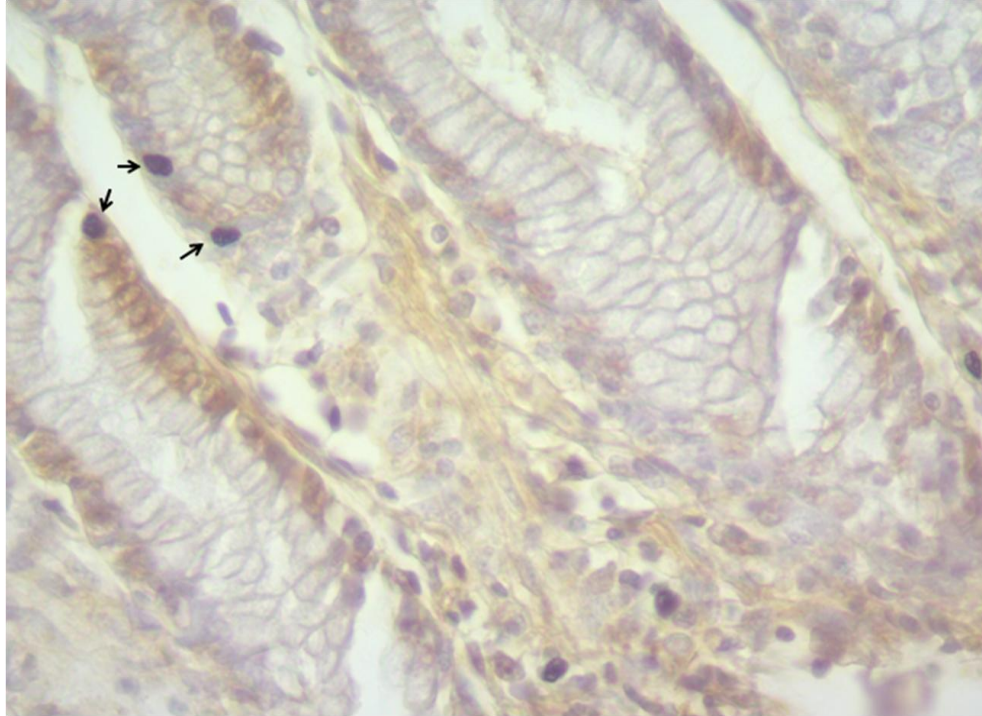


Figura 24: Inmunoexpresión de células productoras de bombesina en biopsia gástrica con diagnóstico de gastritis aguda H (+) (flecha). 400x.

La figura 25 muestra inmunoexpresión de células productoras de bombesina en biopsia gástrica con diagnóstico de gastritis crónica H (+). Tanto en gastritis agudas como en gastritis crónicas se pudo observar que dichas células también se hacían presentes en el tejido muscular.

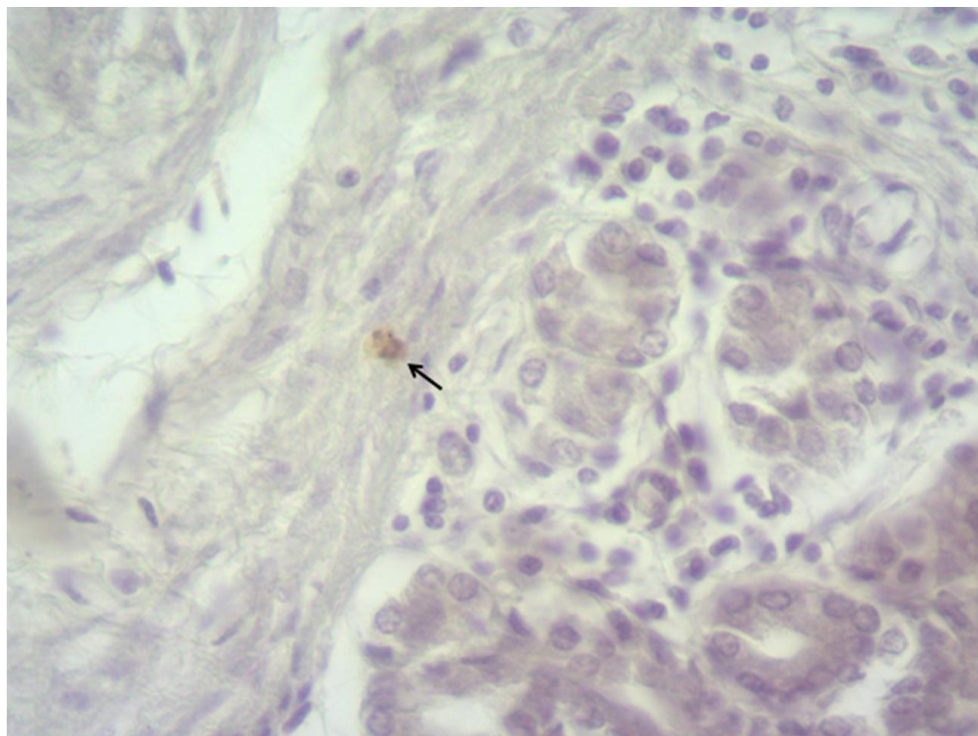


Figura 25: Inmunexpresión de células productoras de bombesina en biopsia gástrica con diagnóstico de gastritis crónica H (+) (flecha). 400x.

En cuanto al estudio cualitativo de las células productoras de bombesina, se determinó que, en las muestras gástricas observadas, se encontraron los dos tipos celulares: cerradas y abiertas. En las muestras con gastritis agudas, las más abundantes fueron las células cerradas; mientras que, en las muestras con gastritis crónicas, las células más abundantes fueron de tipo abierta. Morfológicamente, las células abiertas presentan una forma triangular y su borde apical alcanza la luz de las glándulas. Por otro lado, las células cerradas presentan una forma más redondeada y se observan cerca de la membrana basal, sin llegar a la luz glandular. La distribución de los gránulos en las células con inmunomarcación positiva mostró cierta variación, ya que los mismos no solo se ubicaron en la parte basal de la célula, sino también en otras áreas de la superficie celular. Algunos manifestaron aspecto grueso e intensamente teñidos, mientras que otros fueron más finos y débilmente teñidos. En algunas células, dichos gránulos no evidenciaron diferencia alguna entre sí, mostrando una apariencia homogénea; mientras que en otras, la presencia de gránulos fue escasa.

4.2 Resultados estadísticos

Al evaluar el porcentaje de células bombesina positivas en muestras con gastritis agudas, con presencia o no de *Helicobacter*, se observó que no existen diferencias significativas ($p=0,07$). A su vez, en aquellas muestras con gastritis crónicas positivas y negativas a *Helicobacter*, tampoco se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,87$).

Por otro lado, al comparar biopsias con gastritis agudas y gastritis crónicas positivas a *Helicobacter*, los resultados confirman que en estos grupos si existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,04$).

Al evaluar los porcentajes de células bombesina positivas en muestras con diagnóstico de gastritis agudas y crónicas, sin presencia de *Helicobacter*, la Prueba T determinó que para este tipo de muestras no existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,17$).

Además, al comparar muestras de mucosa normal y muestras con diagnóstico de gastritis aguda *Helicobacter* (+), se observó que en el % de células positivas a bombesina, no existían diferencias estadísticamente significativas ($p=0,11$).

Mientras tanto, los resultados estadísticos entre muestras con mucosa normal y gastritis crónicas con ausencia de *Helicobacter* demuestran que en el % de células positivas a bombesina existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,005$).

En relación a los resultados estadísticos de las muestras con gastritis agudas sin presencia de *Helicobacter* respecto a las muestras con mucosa normal, se observó que no existen evidencias estadísticamente significativas ($p= 0,5$).

Por último, los resultados del análisis de las células productoras de bombesina en muestras con gastritis crónicas positivas a *Helicobacter* y muestras de mucosa normal, mostraron que sí existen evidencias significativas ($p= 0,02$).

Tabla 2. Resumen de los resultados del estudio. Con asterisco se identifican los grupos con evidencias estadísticamente significativas.

Análisis	Grupos	Presencia(+) /Ausencia(-) <i>Helicobacter</i>	Prueba T % células bombesina positivas
1	A (Gastritis aguda) B (Gastritis aguda)	+ -	p=0,07
2	C (Gastritis crónicas) D (Gastritis crónicas)	+ -	p=0,87
3	A (Gastritis aguda) C(Gastritis crónica)	+ +	P=0,04*
4	B(Gastritis aguda) D(Gastritis crónica)	- -	p=0,17
5	A(Gastritis agudas) E(Mucosa normal)	+ -	p=0,11
6	C(Gastritis crónica) E(Mucosa normal)	+ -	p=0,02*
7	B(Gastritis agudas) E(Mucosa normal)	- -	p=0,5
8	D(Gastritis crónica) E(Mucosa normal)	- -	p=0,005*

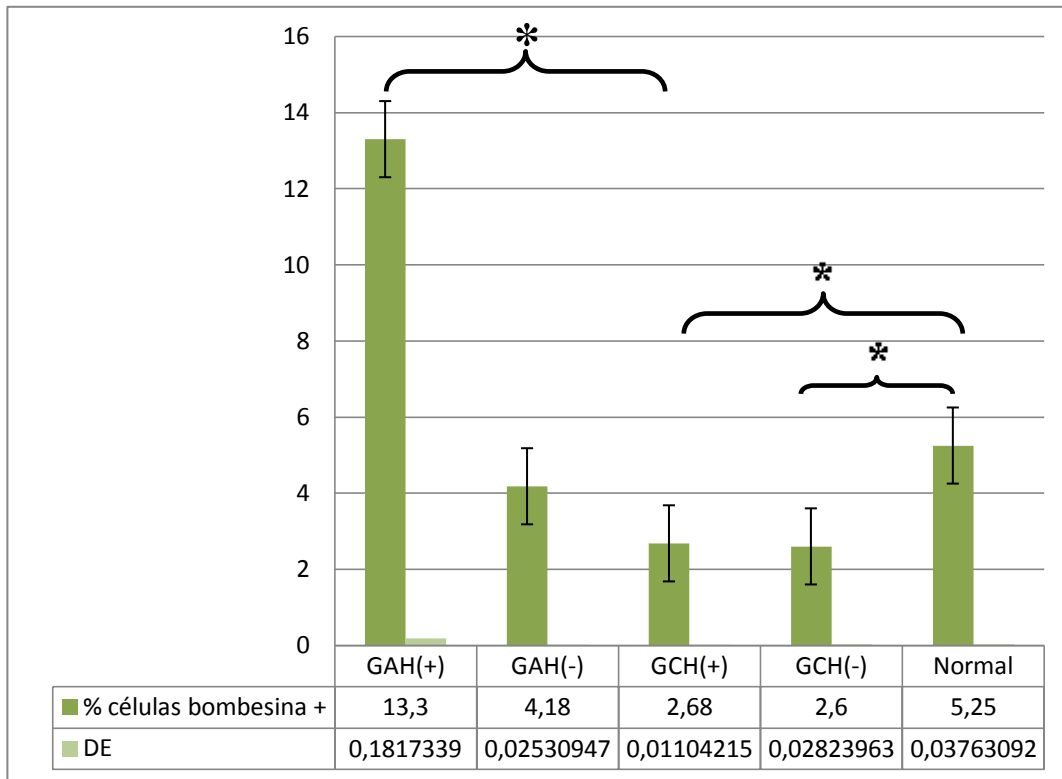


Figura 26: Análisis del promedio de las células bombesina positivas

Al analizar el promedio de células productoras de bombesina en cada grupo, con su correspondiente desvío estándar, podemos determinar que el grupo con mayor número de células bombesina positivas se corresponde con las gastritis agudas con presencia de *Helicobacter*. Por otro lado, los grupos de gastritis crónicas con y sin presencia de *Helicobacter* fueron aquellos en los que se registraron los % más bajos.

5 DISCUSIÓN

La gastritis es definida como la inflamación de la mucosa del estómago, variando su clasificación según la región de la mucosa afectada y su profundidad. A su vez, este proceso inflamatorio puede tener numerosas etiologías y muchas veces resulta de la acción de varios agentes en conjunto. El *Helicobacter* es el agente bacteriano de mayor prevalencia que se ha encontrado en pacientes humanos con gastritis, sin embargo, existen otros pacientes en los que se aísla esta bacteria pero que nunca desarrollan enfermedad (Valdivia Roldán, 2011).

En este estudio, el diagnóstico de gastritis en estómago de cerdos se realizó de acuerdo a los criterios establecidos en la clasificación del sistema Sidney modificado, teniendo en cuenta el grado de gastritis y el tipo de infiltrado leucocitario (agudo o crónico) (Valdivia Roldán, 2011).

En su clasificación histopatológica, la gastritis consiste en la presencia de infiltrado leucocitario en la mucosa gástrica. Dicho infiltrado puede estar compuesto por diversos tipos celulares, tales como neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos, y suele estar acompañado de otras lesiones según el grado de gastritis. Las gastritis provocadas por *Helicobacter spp* se describen en base a la presencia de células inflamatorias, grado de actividad de la inflamación, presencia de atrofia, metaplasia y densidad de colonización del *Helicobacter spp*. (Valdivia Roldán, 2011). Además, basándose en su intensidad y persistencia, puede desencadenar trastornos de orden mecánico y secretorio, tales como hipergastrinemia y disminución de la producción de somatostatina (Mac Loughlin, 2016; De Witte, 2017).

En este estudio, las lesiones de la mucosa gástrica del cerdo concuerdan con las descripciones que corresponden a gastritis agudas con infiltrado de tipo neutrofílico y, las gastritis crónicas, cuyo infiltrado leucocitario estaba conformado, en su mayoría, por células mononucleares (Valdivia Roldán, 2011).

Para la determinación de *Helicobacter spp*. en las biopsias gástricas de cerdo, la técnica histológica utilizada reveló la presencia de bacterias espiraladas que concuerdan con las descripciones de *Helicobacter spp*. Al igual que otros autores, fue de gran utilidad la realización de una técnica sencilla, la tinción Giemsa, que permite la visualización de este patógeno (Delgado *et.al.* 2007).

La evaluación histológica de las biopsias con la coloración de Warthin-Starry permitió observar la presencia de microorganismos con las características morfológicas de *Helicobacter spp*. Además, se logró identificar al menos dos tipos de *Helicobacter*; uno de mayor tamaño e intensamente espiralado y otro de tamaño inferior y con forma de S itálica, que se podrían corresponder con *Helicobacter heilmannii* y *Helicobacter pylori* respectivamente, coincidiendo

con diversos autores que describen a estas dos especies como patógenos frecuentes al igual que *Helicobacter felis* (Goodwin *et al.*, 1989; Rodriguez *et.al.* 2009; Mac Loughlin, 2016).

A través de la técnica de inmunohistoquímica se realizó la inmunodetección de microorganismos correspondientes al género *Helicobacter* en todas las biopsias gástricas estudiadas. Dicha técnica no puede ser utilizada de rutina para el diagnóstico de este agente debido a los altos costos, tiempo de realización y la necesidad de contar con personal debidamente especializado. En concordancia con Mac Loughlin (2014), la inmunolocalización de *Helicobacter* fue en el epitelio, en el interior de las fositas gástricas y en relación a las glándulas gástricas.

De Witte *et. al.* (2017) encontraron un cambio en el sitio de colonización, pasando de la región pilórica en la fase más aguda de la infección a la región fúndica en fases crónicas. En este estudio se estableció que el mayor porcentaje de células bombesina positivas se encontró en las muestras de gastritis agudas *Helicobacter* (+), concordando con lo descrito por De Witte *et. al.* en el año 2017.

Tanto Mac Loughlin (2014) como De Witte *et.al.*, (2017) no han observado grandes efectos en el número de células parietales, células D y células G del estómago con gastritis aguda, esto no concuerda con los resultados obtenidos en este estudio en relación a las células productoras de bombesina, ya que estas sí habían aumentado su número en las gastritis agudas con presencia de *Helicobacter*. Sin embargo, en la fase crónica de la infección, se determinó que el número de células productoras de bombesina era menor que en las gastritis aguda, contrariamente a lo observado por Mac Loughlin (2014) y De Witte *et.al.* (2017) con respecto a las células G. Además, De Witte *et.al.* (2017) han estudiado marcadores de secreción ácida, encontrando resultados similares a lo ocurrido con las células. Esto deriva en el agravamiento de las lesiones encontradas en la fase crónica, pudiendo culminar en metaplasia intestinal y atrofia glandular.

Se observaron evidencias estadísticamente significativas en el número de células productoras de bombesina de las muestras de gastritis aguda con presencia de *Helicobacter spp.*. Esto se contrapone con investigaciones realizadas por Mac Loughlin *et. al.*, (2017) con respecto a las células productoras de gastrina y somatostatina en cerdos, en donde las mismas no aumentan su número. Sin embargo, en biopsias gástricas humanas con diagnóstico de gastritis agudas, se observó que las células G productoras de gastrina sí aumentan tanto en número como en producción, lo que sugiere la existencia de un proceso de patogenia común entre las especies humana y porcina pero que no es igual.

Estudios realizados en diversos modelos animales han demostrado que la bombesina a nivel central tendría un efecto inhibitorio de la secreción ácida, al igual que lo que sucede cuando este

péptido es suministrado de forma exógena a dosis altas (Gutierrez, 1988; Piqueras Ruiz, 2004). Sin embargo, mediante estimulación vagal e infusión de dicho péptido, se produciría un aumento en la secreción de ácido clorhídrico, que se explicaría mediante el aumento de gastrina (Gutierrez, 1988). Mac Loughlin *et.al.* (2016) han determinado que la acción inflamatoria del *Helicobacter* sobre la mucosa gástrica produce una disminución de las células D productoras de somatostatina, hormona encargada de inhibir la secreción de ácido clorhídrico. De esta manera, el estímulo de la bombesina sobre las células G productoras de gastrina se haría más evidente ya que estas perdieron su control inhibitorio. Esto concuerda con nuestras investigaciones ya que se observó un aumento del número de células productoras de bombesina en las muestras con gastritis aguda donde la función gástrica se encuentra totalmente alterada.

La hipergastrinemia asociada con *H. pylori* es producida por la acción de la bombesina ya que, una vez erradicada la bacteria, los niveles de la hormona vuelven a su normalidad, lo cual explicaría la importancia de esta hormona en la infección causada por esta bacteria (Graham *et.al.*, 1991; Piñol Jiménez y Paniagua Estévez, 2006). Asimismo, se ha comprobado que la gastrina por si misma posee efectos tróficos sobre las células parietales, por lo que un estímulo prolongado de la bombesina sobre las células G derivaría en una hiperplasia de las mismas, con el consiguiente aumento en la secreción ácida gástrica (Gutierrez, 1988).

Se identificaron células positivas a bombesina tanto de tipo abierto como cerrado. En las muestras con gastritis aguda, las que prevalecieron fueron las de tipo cerrado; mientras que, en las gastritis crónicas, las más abundantes fueron las abiertas. Esto se relaciona con la función quimiorreceptora que poseen las células abiertas, ya que al tomar contacto con la luz glandular, liberan hormonas según la información obtenida en ese proceso (Gutierrez, 1988; Ross y Pawlina, 2012). Las mismas presentan características similares a las observadas en otras especies animales. Con respecto a la disposición de los gránulos citoplasmáticos, los mismos mostraron cierta variación tanto en su distribución como en la intensidad de tinción.

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. La infección en el cerdo produce disminución de la ganancia diaria de peso y gastritis crónica, pudiendo ocasionar úlceras pépticas y el desarrollo de lesiones similares al linfoma de los MALT, las cuales han sido observadas tanto en humanos como en modelos animales llevados a cabo en roedores (Zhang *et.al.* 2016). 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. Hay datos de que los seres humanos en contacto cercano con cerdos tienen un riesgo más alto de adquirir la infección (Baele et al., 2008; Liang et al., 2013).

La importancia del estudio de *Helicobacter* en cerdo radica en que *Helicobacter suis*, la especie de mayor importancia en porcinos, es una bacteria zoonótica, que produciría preocupación considerando el bienestar animal, intereses económicos de los productores, salud pública y seguridad alimentaria de los trabajadores y consumidores involucrados.

6 CONCLUSIÓN

- ✓ Mediante la técnica histológica convencional de Hematoxilina/Eosina se logró el diagnóstico de gastritis aguda y crónica en muestras gástricas de cerdo.
- ✓ La presencia de *Helicobacter spp* en estómago de cerdos indica la capacidad de este microorganismo de infectar de manera natural a esta especie.
- ✓ A través de las tinciones diferenciales de Giemsa y Warthin Starry se logró determinar la presencia de microorganismos altamente espiralados compatibles con *Helicobacter spp*.
- ✓ La inmunolocalización de *Helicobacter spp* reveló su presencia principalmente en el epitelio, foseta gástrica y glándula gástrica.
- ✓ La mayor colonización por *Helicobacter* fue detectada en la región antral del estómago.
- ✓ La técnica de inmunohistoquímica permitió la identificación de células productoras de bombesina, las cuales se localizaban en el epitelio glandular, en el tejido conectivo subyacente y en el tejido muscular.
- ✓ Se observó un aumento del número de células productoras de bombesina en las muestras con gastritis agudas positivas a *Helicobacter spp*.
- ✓ No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de células productoras de bombesina de las muestras de gastritis crónicas con presencia y/o ausencia de *Helicobacter spp*.
- ✓ En las muestras con gastritis aguda se determinó que la morfología celular predominante de las células productoras de bombesina fue de tipo cerrada.
- ✓ En las muestras con gastritis crónicas, se determinó que la morfología celular más abundante fue de tipo abierta.

7 BIBLIOGRAFÍA

- ALAMINOS GARCÍA, M. 2005. Distribución topográfica de las células enteroendócrinas del estómago en pacientes con ulcus péptico. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada. 123p.
- ARTEAGA DE MURPHY, C. y FERRO-FLORES, G. 2005. Bombesina y bombesinas radiomarcadas: estado actual. *Alas Jour.* 8(30): AJ30-5.
- BARBOSA, A.; SILVA, J.; NOGUEIRA, A.; PAULINO, E. y 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.; HELLEMANS, A.; MAST, J.; CHIERS, K.; DUCATELLE, R. y HAESEBROUCK, F. 2008. Isolation and characterization of *Helicobacter suis sp.* from pig stomachs. *Intern Journ of System and Evol Microb.* 58(6): 1350-1358.
- BARRETT, K.; BARMAN, S.; BOITANO, S. y BROOKS, H. 2010. Ganong: Fisiología Médica. Editorial Mc-Graw Hill. Capítulo 26.
- BENTO-MIRANDA, M. y FIGUEIREDO, C. 2014. *Helicobacter heilmannii sensu lato*: An overview of the infection in humans. *World Journ of Gastroent.* : 20(47): 17779-17787.
- BERTACCINI, G.; ERSPAMER, V. y IMPICCIATORE, M. 1973. The actions of bombesin on gastric secretion of the dog and the rat. *Br. J. Pharmac.* 49, 437-444
- CARDONA, J.; PAREDES, E. Y FERNÁNDEZ, H. 2009. DETERMINACIÓN DE *Helicobacter spp.*, EN ÚLCERAS GÁSTRICAS EN CABALLOS. *Rev MVZ Córdoba* 14(3):1831-1839.
- CECCARELLI, P., PEDINI, V. AND GARGIULO, A.M., 1990. La cellule endocrine del sistema GEP nell'intestino di cavallo. *Atti Soc Ital Sci Vet.* XLIV: 311-313.
- CECCARELLI, P.; PEDINI, V. y GARGIULO, A. 1995. The Endocrine Cells in the Gastro enteric Tract of Adult Fallow Deer (*Dama dama L.*). *Anat Histol Embryol* 24: 171-174. .
- CERVANTES-GARCÍA, E. 2016. *Helicobacter pylori*: mecanismos de patogenicidad. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*; 63 (2): 100-109
- DANON, S.; MOSS, N.; LARSSON, H.; ARVIDSSON, S.; OTTOSSON, S.; DIXON, M. y LEE, A. 1998. *Gastrin release and gastric acid secretion in the rat infected with either Helicobacter felis or Helicobacter heilmannii.* *Journ of Gastroenter and Hepatol.* 13, 95-103
- DELGADO, F.; BRIHUEGA, B.; VENZANO, A.; FUNES, D.; BLANCO VIERA, F.; AUTERI, C.; ROMERO, G.; CAPELLINO, F. y 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*

- DELLE FAVE, G., MARIGNANI, M., MORETTI A., D'AMBRA, G., MARTINO G. Y ANNIBALE, B. 1999. *Hypergastrinemia and Enterochromaffin-like Cell Hyperplasia*. Yale Journ of biol and med 71: 291-301.
- DE WITTE, C.; DEVRIENDT, B.; FLAHOUE, B.; BOSSCHEM, I.; DUCATELLE, R.; SMET, A. y HAESEBROUCK, F. 2017. *Helicobacter suis* induces changes in gastric inflammation and acid secretion markers in pigs of different ages. Vet Res 48: 34.
- 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>
- DURARTE, I. 2010. Patología del estómago- Lecciones anatomía patológica .Universidad Nacional de Chile, 4. Disponible en <http://medicina.uc.cl>.
- DYCE, K.; SACK, W. y WENSING, C. (1991). Anatomía Veterinaria. Ed. Med. Panamericana
- FOX, J.; DANGLER, C.; SAGER, W.; BORKOWSKI, R. y GLIATO, J. 1997. *Helicobacter mustelae* associated gastric adenocarcinoma in ferrets (*Mustelae putorius furo*). Vet Pathol; 34:125-129.
- FRISANCHE VALERDE, O. 1996. *Helicobacter pylori* y la fisiopatogenia de la úlcera péptica. Bolet Soc Per Med Int, Vol 9: 1.
- FOSSMARK, R.; QVIGSTAD, G. y WALDUM, H. 2011. Animal models to study the role of long-term hypergastrinemia in gastric carcinogenesis. J Biomed Biotechnol ; 2011:9755479.
- FURNESS, J. y COSTA, M. 1982. In: Handbook of Experimental Pharmacology. G. Bertaccini ed. Berlín: Springer 59/1: 383-462.
- GARCÍA SACRISTAN, A.; CASTEJÓN MONTIJANO, F.; DE LA CRUZ PALOMINO, L.; GONZÁLEZ GALLEGU, J.; MURILLO LÓPEZ DE SILANES, M. y SALIDO RUIZ, G. 1995. Fisiología Veterinaria. Ed. McGRAW HILL Interamericana.
- GARTNER, L. y HIATT, J. 2011. Atlas en color de histología. Ed. Med. Panamericana.
- GAZQUEZ ORTIZ, A y BLANCO RODRÍGUEZ, A. 2004. Tratado de Histología Veterinaria Ed. Masson.
- GENESER, F. 2000. Histología. Ed. Med. Panamericana.
- GIMENO, E.; MASSONE, A. Y PORTIANSKY, E. 1997. Introducción a las Técnicas de inmunohistoquímica y Aplicaciones en Patología Veterinaria. Manual del Octavo Curso Internacional de Posgrado en Técnicas de Inmunohistoquímica, Lectínhistoquímica y Microscopía Electrónica. Instituto de Patología “Dr. Bernardo Epstein” y Servicio Central de Microscopía Electrónica, p.49-77. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. La Plata

- GÓMEZ, G., LEONARDO, F.; OROZCO, P.; SALAS, S. y SERGIO, A. 2006 Helicobacteriosis canina y felina. Vet Méx, vol. 37/ 1: 97-116
- GOODWIN, C. y ARMSTRONG, J.1989. Aspect microbiological of *Helicobacter pylori* (Campylobacter pylori) .Eur. J. Clin. Microb. Infec.Dis, 9 (1): 1-13.
- GRAHAM, DV.; OPEKUN, A.; LEW, GM.; KLEIN, P. y WLASH, JH.1991. *Helicobacter pylori* associated exaggerated gastrin release in duodenal ulcer patients. The effect of bombesin and urea ingestion. Gastroent 100: 1571-5.
- GRAHAM, DV.; LEW, GM. y LECHAGO, J.1993. Antral G-ceII and D-ceII numbers in *Helicobacter pylori* infection effect of *Helicobacter pylori* eradication. Gastroent 104:1655-160.
- GRIDER, J. 2004. Gastrin-releasing peptide is a modulatory neurotransmitter of the descending phase of the peristaltic reflex. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 287: G1109–G1115
- GUTIERREZ, O. 1988. Péptidos reguladores del sistema digestivo. Acta Med Colomb Vol 13 N°4: 254-258
- HAESEBROUCK, F., PASMANS, F., FLAHOU, B., SMET, A., VANDAMME, P., y DUCATELLE, R. (2011). Non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* species in the human gastric mucosa: a proposal to introduce the terms *H. heilmannii sensu lato* and *sensu stricto*. *HELICOB* 16 (4): 339–340.
- HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; FLAHOU, B.; CHIERS, K.; BAELE, M.; MEYNS, T.; DECOSTERE, A. Y DUCATELLE, R. 2009. Gastric *Helicobacters* in Domestic Animals and Nonhuman Primates and Their Significance for Human Health. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* Vol. 22, No. 2.; p. 202–223. Amer Soc Microb.
- HIB, J. (2003). *Histología de Di Fiore: Texto y Atlas*. 1° edición. Ed Ateneo, 14: 208-217
- HOBSLEY, M.; TOVEY, F. y HOLTON, J.2008. Controversies in the *Helicobacter pylori*/duodenal ulcer story. R. Soc.Trop Med Hyg.102(12):1171-1175.
- KARIYA, Y.; KATO, K.; HAYASHIZAKI, Y.; HIMENO, S.; TAURIS, S. y MATSUBARA K.1986. Expresión of human gastrin gene innormal and gastrinoma tissues. *Gene*, 50(1-3): 345-52.
- KUIPERS ERNST J. AND PENTTI SIPPONEN.2006.*Helicobacter pylori* Eradication for the Prevention of Gastric Cancer. *Helicob* Vol 11/ s1: 52–57..
- KONIG, H. Y LIEBICH, H. 2011. Anatomía de los animales domésticos. 2° edición. Ed. Med. Panamericana. Tomo 2: 41- 48.
- LEVI, S.; BEARDSHALL, K.; HADDAD, G.; PLAYFORD, R.; GHOSH, P. y CALAM, J. 1989. *Campylobacter pylori* and duodenal ulcers: the gastrin link. *Lancet*; i: 1167-8.

- LIANG, J.; DUCATELLE, R.; PASMÁN, F.; ANNEMIEKE, S.; HAESEBROUCK, F. y FLAHOU, B. 2013. Sequence typing of porcine and human gastric pathogen *Helicobacter suis*. *Int J Syst and Evol Microbiol*, 51(3): 920-936.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; DUNLAP, P. Y CLARK, D. 2009. Brock: Biología de los microorganismos. Ed. Pearson. Unidad 3, Capítulo 15, 472; 488.
- MAC LOUGHLIN, V. 2014. Relación entre *Helicobacter spp.* y células productoras de Gastrina. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina. 104 p.
- MAC LOUGHLIN, V.; MERKIS, C.; DAURIA, P.; CRISTOFOLINI, A.; BONINO, F.; SAGRIPANTI, G.; SANCHIS, E.; RITTA, L. y SAVINO, F. 2015. Determinación de células G en estómago de cerdo con *Helicobacter spp.* *Rev.CVPBA*, 63:76-77.
- MAC LOUGHLIN, V.; DAURÍA, P.; VAN DEER VEEN, P.; BONINO, F.; SAGRIPANTI, G.; MARTÍNEZ, R.; NAVARRO, O.; GIMÉNEZ, S.; SONA, L.; RITTA L. y HERNÁNDEZ, A. 2016. Inmunoexpresión de células productoras de bombesina en estómago de cerdos con diagnóstico de gastritis crónica provocada por *Helicobacter spp.* 3° Congreso Virtual de Ciencias Morfológicas.
- MAC LOUGHLIN, V.; NAVARRO, O.; MARTÍNEZ, R.; GROSSO, M.; SAVINO, F.; RITTA, L.; VAN DEER VEEN, P.; GIMÉNEZ, S. y MERKIS, C. 2017. Determinación de *Helicobacter spp.* en cerdos de Río Cuarto, Argentina. *Infopork*, 60: 52-57
- MAKINDE, M. y OBWOLO, M. 1990. Abattoir survey of gastric ulcer in pigs in Zimbabwe. *Zimb Vet J*; 21:116-123.
- MAZELL, S.; EVANS, D. y GRAHAM, D. 1991. *Helicobacter pylori*- catalase. *J. Gen Microb*, 137:57-61.
- MC COLL, K.; EL-OMAR, R. y GUILLEN, D. 1997. The role of *Helicobacter pylori* in the pathophysiology of duodenal ulcer and gastrin cancer. *Semin Gastrointest disease*, 8:142-155.
- 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. y 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.
- ODRIOZOLA, V. 2011. *Helicobacter* gastricos en caninos y felinos. Asociación argentina de medicina Felina. URL: <http://www.aamefe.org/helicobacter.htm>.

PAZ, D. 2000. Técnicas Inmunocitoquímicas. En: Guía de Curso de Posgrado. Departamento de Ciencias Biológicas. Cap.5:21-23.Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de Buenos Aires. Buenos Aires

PIÑOL JIMÉNEZ, F. y PANIAGUA ESTÉVEZ, M. 2006. Neuropeptidos y *Helicobacter pylori* en la gastritis crónica- Rev cubana med v.45 n.3.

PIQUERAS RUIZ, L. 2004. El control de la secreción ácida gástrica en el ratón: cambios asociados a la gastritis o a la falta del receptor de tipo 2 de la somatostatina. Tesis de doctorado. 145 p.

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. Gastroent; 111:19-27. 103.

RAMIREZ, I. y LILIDO, N. 2008. Hormonas gastrointestinales (GHI): la regulación hormonal del aparato digestivo de los animales domésticos. Mundo Pecuario, IV, N° 1, 01-14.

RODRIGUEZ, B.; ARANZAZU, D. Y ORTIZ, L.2009. Association of gastric ulcer and *Helicobacter spp* in pigs in Antioquia, Colombia. Rev. Colom Cien. Pecu, 22:54-60.

ROSS, M. y PAWLINA, W. 2015. Histología “Texto y Atlas color con Biología celular”. 6° edición. Ed. Med. Panamericana, Cap. 16: 481- 493

SILVA KUSZKOWSKI, F.; SOARES DA SILVA, F.; BRANCO DE MIRANDA, N. EMMERICH DA SILVA, T. Y LUCIOLI, J. 2017. Identification of *Helicobacter spp.* on gastric and duodenal mucosa of dogs (*canis familiaris*) by warthin-starry technique. Cienc. anim. bras., Goiânia, v.18, 1-9

SIPPONEN, P. Y MAAROOS, H. 2015. Chronic gastritis. Scandinav Journ of Gastroent 50: 657-667.

SISSON, S. Y GROSSMAN, J. 2002. Anatomía de los animales domésticos. 5° edición. Ed. Masson. Tomo II, 40: 1405-1406.

SLEINSINGER, M.; FELDMAN, M.; BRUCE, M.; SCHARSCH, T. K. y KLEIN, M.2000. Enfermedades gastroduodenales y hepáticas .Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. 6° edición. Ed. Panamericana. Madrid pp 649-661. 104.

SMET, A.; FLAHOU, B.; D’HERDE, K.; VANDAMME, P.; CLEENWERCK, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F. Y HAESEBROUCK, F. 2012. *Helicobacter helimannii* sp. nov., isolated from feline gastric mucosa. Internat Journ System Evol Microb 62: 299-306

SOUSA, D.; CASCON, C.; MELLO, M.; LEITE, J.; MEDEIROS, M.; FONSECA, A. Y FERREIRA, A. 2017. *Helicobacter spp.* in domestic cats: identification and relationship with anatomical and histopathological gastric changes in animals of blood group A. Pesq Vet Bra 37(12):1467-1473.

- TYTGORT, G.1994. Long-term consequences of *Helicobacter pylori* eradication. Scand J Gastroenterol, 205: 38-44.
- TORTORA, G. Y DERRICKSON, B. 2006. Principios de anatomía y fisiología. 13° edición. Ed. Med. Panamericana 24: 982-988.
- VALDIVIA ROLDÁN, M. 2011. Gastritis y gastropatías. Rev Gastroenterol. Perú; 31/1: 38-48.
- VALE, F. y VITOR, J.2010. Trasmisión pathway of *Helicobacter pylori*. Does food play a role rural and urban areas? Int. Journal of food Microbiol, 38:1-12.
- VARVARIGOU, AD.; SCOPINARO, F.; LEONDIADIS, L. *et al*; 2002: Synthesis, chemical, radiochemical and radiobiological evaluation of a new 99mTc-labelled bombesin-like peptide. Cancer Biother Radiopharm 17:317-326.
- VISSIO, P. 2000. Técnicas Inmunocitoquímicas. En: Guía de Curso Posgrado. Departamento de Ciencias Biológicas. Cap.5:21-23.Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de Buenos Aires. Buenos Aires
- UVNÄS-MOBERG, K.1989.El tracto gastrointestinal durante el crecimiento y la reproducción. Investigación y Ciencia: 48-54.
- VIKRAM, K.; ANANTHAKRISHNAN, N. y TOVEY, F.2013. Is *Helicobacter* infection the primary cause of duodenal ulceration or secondary factor? a review of the evidence. Gastroent Res. Pract, 425840.
- 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, G., DUCATELLE, R., MIHI, B., SMET, A., FLAHOUE, B. Y HAESEBROUCK, F. 2016. Helicobacter suis affects the health and function of porcine gastric parietal cells. Vet Res 47:101.