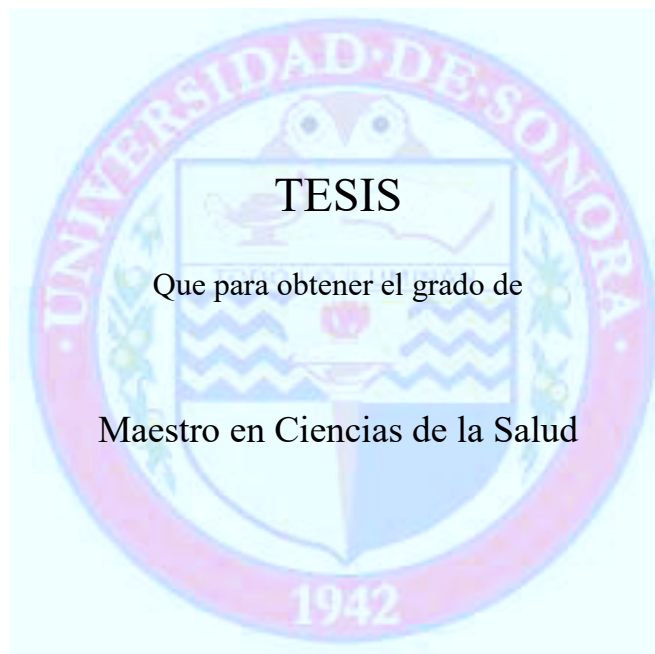


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Desarrollo de un modelo murino (Cepa CD1) para evaluar el efecto de la infección por *Helicobacter pylori* sobre la hipertensión arterial



Presenta

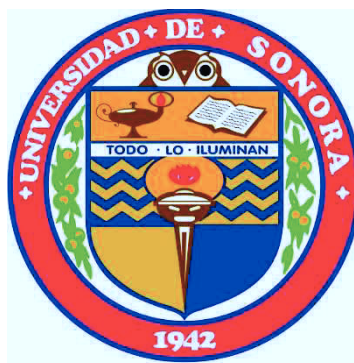
Bianca Vargas Tequida

Hermosillo, Sonora

Diciembre de 2012

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar la Tesis de Bianca Vargas Tequida, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



Dr. Humberto Francisco Astiazarán García

Director




Dr. Eduardo Ruiz Bustos

Secretario



M.C. Rafael Canett Romero

Vocal



M.C. María Lucila Rascón Durán

Suplente

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la oportunidad y el financiamiento otorgado para la realización de mis estudios de maestría.

A la Universidad de Sonora, por acogerme nuevamente estos dos años, y a mis maestros del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud por compartir sus conocimientos científicos y por hacerme realizar el mayor esfuerzo siempre.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD, A.C.) por las facilidades brindadas para el desarrollo de este proyecto. Especialmente al Laboratorio de Patología Experimental.

A mi director de Tesis, el Dr. Humberto Astiazarán García, por aceptarme como su estudiante, por su confianza, por compartir su experiencia, por su tiempo y apoyo, y también por su amistad. Gracias por contagiarme con su energía positiva!

A mis sinodales, al Dr. Eduardo Ruiz Bustos por apoyarme y alentarme a seguir adelante, al MC. Rafael Canett Romero y MC. Lucila Rascón Durán por su apoyo y sus consejos oportunos. Al Dr. Guillermo López Cervantes por su colaboración en este proyecto.

A mis compañeros y amigos de maestría, gracias por los momentos juntos, tanto los buenos como los sufridos!

A mis amigas de siempre, por su apoyo, su cariño y por creer en mí y demostrarme que se pueden hacer las cosas.

Especialmente, gracias a todo el equipo del Laboratorio de Patología Experimental (incluyendo mis ratones) por su amistad y tiempo, gracias QB. Bertha Pacheco por tu paciencia y por tu apoyo técnico; Vero, Orlando, Karina, Gema y Rocío gracias por ser la parte divertida de la maestría.

Finalmente agradezco a Dios y a mi familia, porque siempre estuvieron ahí echándome porras, dándome confianza y amor, sin ustedes no habría cumplido esta meta en mi vida.

DEDICATORIAS

A ti mamá por su amor, por la educación y ejemplo que me diste, y por todos tus esfuerzos para que fuera alguien exitosa en la vida.

A ti Joel, por tu amor, por tu apoyo, tu paciencia interminable en los momentos difíciles, por querer siempre lo mejor para mí, por ser mi soporte y caminar a mi lado por tantos años.

A mis hijas Ana Sofía y Valeria, por que sufrieron el estrés conmigo, por ser el empuje en mi vida, por sus cariños y sus sonrisas que siempre me hicieron levantarme.

Esto es para ustedes, los quiero!!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIAS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
OBJETIVOS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i>.....	4
Morfología.....	4
Crecimiento.....	5
Genoma.....	5
Epidemiología.....	6
Vías de transmisión.....	6
Patogénesis de la Infección.....	7
Factores de virulencia.....	7
Motilidad y adhesión bacteriana.....	7
Liberación de enzimas.....	8
Toxinas.....	9
Respuesta inflamatoria.....	10
Mecanismos de inflamación en la infección por <i>H. pylori</i>.....	11
Daño celular directo.....	11
Respuesta de quimiocinas epiteliales.....	12
Inmunidad No-específica.....	12
Inmunidad específica.....	13
Modelos animales para la infección por <i>H. pylori</i>.....	13

Enfermedades asociadas a <i>H. pylori</i>	14
Gastritis crónica.....	14
Úlcera duodenal.....	15
Gastritis atrófica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico.....	15
Desórdenes gastroduodenales.....	15
Hipertensión.....	16
Definición.....	17
Regulación.....	18
Hipertensión e inflamación.....	18
Sitios de inflamación en hipertensión.....	18
Mecanismos por los cuales las células inflamatorias promueven hipertensión.....	19
Hipertensión y modelos murinos.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Modelo animal y mantenimiento.....	23
Cultivo de <i>H. pylori</i>	23
Turbidimetría de McFarland.....	24
Inoculación de <i>H. pylori</i>	24
Medición de presión arterial.....	24
RESULTADOS Y DISCUSION.....	27
Estandarización para la medición de la presión arterial.....	27
Es posible inducir hipertensión en la cepa CD1.....	27
Cultivo e identificación de <i>H. pylori</i>	31
Inoculación de ratones.....	31
Evaluación de la presión arterial en ratones CD1.....	35
CONCLUSIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXOS.....	47

LISTA DE TABLAS

I. Estandarización para la medición de la presión arterial.....	28
II. Resultados de prueba para inducir hipertensión en la cepa CD1.....	30
III. Resultados de presión arterial de grupo control.....	36
IV. Resultados de presión arterial de grupo experimental.....	37
V. Comparación de presión sistólica y diastólica.....	40

LISTA DE FIGURAS

1. Diseño experimental.....	25
2. Crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i> en agar Brucella con suero bovino al 10%.....	32
3. Pruebas bioquímicas de <i>Helicobacter pylori</i>	33
4. Inoculación de modelo murino con la suspensión de <i>Helicobacter pylori</i>	34
5. Efecto de la infección por <i>H. pylori</i> sobre la presión sistólica.....	38
6. Efecto de la infección por <i>H. pylori</i> sobre la presión diastólica.....	39

OBJETIVOS

Objetivo General

Conocer mediante el desarrollo de un modelo experimental en ratones la relación entre la infección por *Helicobacter pylori* y el incremento en la presión arterial.

Objetivos Particulares

1. Establecer un modelo experimental de infección con *Helicobacter pylori* en ratones Cepa CD1 singénica.
2. Realizar un bioensayo para valorar los niveles de presión arterial en diferentes grupos de estudio (experimentales y controles).
3. Buscar la asociación entre los valores de presión arterial y la infección por *Helicobacter pylori*.

RESUMEN

La colonización del estómago por *Helicobacter pylori* es la más común de las infecciones bacterianas crónicas en el humano. Este microorganismo fue inicialmente observado en pacientes con gastritis, y también se ha asociado con úlcera péptica, linfoma y adenocarcinoma gástrico. Estudios epidemiológicos han reportado una asociación entre la infección de *H. pylori* y un incremento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares, como la *hipertensión arterial*, que también es un problema de salud pública. Para examinar las características de las infecciones por especies de *Helicobacter* se han establecido algunos modelos en roedores. Al día de hoy los estudios realizados sobre la asociación entre *H. pylori* e hipertensión arterial, han sido escasos y con resultados contradictorios en sus hallazgos. Por esta razón, nuestro estudio tuvo como objetivo realizar un bioensayo en ratones cepa CD1, el cual, bajo condiciones controladas permitiera estudiar la asociación entre estos dos factores. Se demostró que la cepa CD1 es susceptible a presentar elevación de presión. Se formaron los grupos de estudio estandarizados para las mediciones de presión arterial inoculándose con la cepa ATCC 43504 de *H. pylori*. Se realizaron las mediciones de presión arterial a tiempos 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días. Al analizar estos datos, se encontró una elevación de la presión arterial, tanto sistólica como diastólica, a partir de los 15 días en el grupo infectado con *H. pylori* ($p < 0.05$), elevación no observada en el grupo control ($p > 0.05$). Esta elevación pudo deberse al proceso inflamatorio crónico causado por *H. pylori*, que pudo haber conducido a la remodelación y engrosamiento vascular generando la elevación de la presión arterial en el ratón. De acuerdo a lo anterior, *H. pylori* está relacionado con hipertensión arterial en el modelo animal utilizado, al menos en una etapa aguda.

INTRODUCCIÓN

La colonización del estómago por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es la más común de las infecciones bacterianas crónicas en el ser humano, afectando alrededor del 60% de la población mundial. Su prevalencia varía notablemente entre diferentes naciones, e incluso entre grupos poblacionales dentro de un mismo país, variación que está relacionada principalmente con el nivel socioeconómico de los habitantes y de manera menos clara, con factores genéticos, raciales y culturales (Ramírez y Sánchez, 2009).

Helicobacter pylori es una bacteria gram negativa, que mide 2-4 μm de largo y 0.5-1 μm de ancho. Aunque usualmente tiene forma espiral, la bacteria puede aparecer en forma de bastoncillo, mientras las formas cocoides aparecen después de cultivos prolongados *in vitro* o por tratamientos con antibióticos. La bacteria posee de 2-6 flagelos unipolares de aproximadamente 3 μm de largo, los cuales portan un bulbo distintivo al final. El flagelo le confiere motilidad y le permite rápido movimiento en soluciones viscosas como la mucosa que cubre las células del epitelio gástrico (Kusters y col., 2006).

Es un microorganismo bien adaptado a la mucosa gástrica, con capacidad de penetrar en el moco de la mucosa, desplazarse a través de él, adherirse a las células epiteliales, evadir y modular la respuesta del sistema inmune generada por el hospedero y así mantener una colonización persistente. Es un patógeno exógeno que, a diferencia de la mayoría de los microorganismos persiste por décadas en el tracto gastrointestinal. *Helicobacter pylori* produce inflamación gástrica crónica que termina en úlcera péptica y puede conducir a neoplasia gástrica en un gran número de personas; esto se debe a que supera la barrera ácida estomacal, donde casi ningún microorganismo puede competir, y la respuesta inmune es esencialmente inefectiva. El 98% de las bacterias que infectan, reside en el moco, mientras que el 2% se encuentra adherido a células epiteliales, siendo este último porcentaje el que mantiene la infección (Cava y Cobas, 2003).

Helicobacter pylori fue inicialmente observado en pacientes con gastritis, pero desde su descubrimiento se ha asociado no sólo con esta afección, sino también con úlcera péptica, linfoma y adenocarcinoma gástrico (Hernández, 2001).

Algunos modelos en roedores fueron establecidos para examinar las características etiológicas de infecciones por especies de *Helicobacter*, como son ratas, ratones y jerbos Mongólicos. En general estos animales solo apoyan la colonización por cepas específicas de *H. pylori*. Comparados con modelos de primates no humanos, los modelos roedores son fáciles de manejar y son económicos (Kodama y col., 2005). En mayor o menor grado, todos estos modelos animales exhiben progresión a enfermedad similar a las patologías en el humano asociadas a *H. pylori*, y esto es útil para estudiar infecciones crónicas, inflamación gástrica, lesiones, y respuestas inmunes en el hospedero (Guo y Mekalanus, 2002).

Algunos estudios, principalmente epidemiológicos, han reportado una asociación entre la infección por *H. pylori* y un incremento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Los mecanismos que pueden contribuir a esta asociación incluyen anomalías en los niveles de ciertas proteínas sanguíneas (por ejemplo fibrinógeno o la proteína C reactiva) secundario a una infección crónica, y el aumento en la presión sanguínea en las personas infectadas con *H. pylori* (Harvey y col., 2001). Sin embargo esto no deja de ser solamente una hipótesis a demostrarse experimentalmente.

En el mismo contexto, la *hipertensión arterial*, o presión arterial alta, es un problema importante de salud pública en el mundo, por su alta prevalencia y por su vínculo con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (Goldman y Bennett, 2002). La hipertensión arterial es un factor de riesgo de aterosclerosis cuya patogénesis es desconocida. Cada vez más estudios destacan su papel como causal de disfunción endotelial. Se ha encontrado una posible asociación entre la infección por *H. pylori* y desórdenes cardiovasculares y autoinmunes. La liberación de sustancias citotóxicas ya

sean de origen bacteriano o producidas por el hospedero pueden representar mediadores de estas secuelas sistémicas (Migneco y col., 2003).

Algunos estudios como los realizados por Lip y col. (1996), sugieren una relación entre *H. pylori* e hipertensión; mientras que por otro lado, Harvey y col. (2001) reportaron en su estudio que la medida de la presión arterial sistólica fue más alta en los individuos infectados con *H. pylori* que en los que no fueron infectados y, aunque esto fue estadísticamente significativo, es poco probable que sea clínicamente importante y puede ser explicado por factores residuales desconocidos.

Es claro que los estudios realizados sobre la asociación entre *H. pylori* e hipertensión arterial hasta el día de hoy, han sido escasos y no coinciden en sus hallazgos, por consiguiente es necesario el desarrollo de un modelo experimental mediante el cual, bajo condiciones controladas se pueda comprobar claramente la asociación entre estos dos factores.

ANTECEDENTES

Generalidades de *Helicobacter pylori*

Datan los hechos de 1983, cuando J. Robin Warren escribió una publicación inédita a *The Lancet* donde exponía múltiples casos clínicos en los que aparecía una bacteria bacilar con forma espiral. Se la asociaba con gastritis crónica, gastritis activa crónica, inflamación y en cualquier caso siempre acompañada de infiltración de polimorfonucleares al *antrum* humano. Un profesor de medicina interna llamado Barry Marshall estuvo interesado en las observaciones de Warren y juntos aislaron los microorganismos procedentes de esas biopsias utilizando métodos empleados con *Campylobacter* (Cava y Cobas, 2003).

En 1984, Barry J. Marshall y J. Robin Warren escribieron juntos a *The Lancet*, para relatar que los bacilos curvados o espirales encontrados en 58 de 100 pacientes eran gramnegativos, flagelados y microaerofílicos y se creía que se trataba de una nueva especie del género *Campylobacter*. Era una bacteria espiral nunca cultivada antes, y su asociación con la gastritis activa crónica no se había descrito. Su morfología se parecía a *Campylobacter*, al igual que sus requerimientos atmosféricos y su composición de DNA. Pensaron que era temprano llamarla *Campylobacter pyloridis* y la llamaron “pyloric campylobacter”. Finalmente, este microorganismo es hoy conocido como *Helicobacter pylori* (Cava y Cobas, 2003).

Morfología

Helicobacter pylori es una bacteria gram negativa, que mide 2-4 μm de largo y 0.5-1 μm de ancho. Aunque usualmente tiene forma espiral, la bacteria puede aparecer en forma de bastoncillo, mientras las formas cocoides aparecen después de cultivos prolongados *in vitro* o por tratamientos con antibióticos. La bacteria tiene de 2-6 flagelos unipolares de aproximadamente 3 μm de largo, los cuales portan un bulbo distintivo al final. El

flagelo le confiere motilidad y le permite rápido movimiento en soluciones viscosas como la mucosa que cubre las células del epitelio gástrico (Kusters y col., 2006).

Crecimiento

Un dato importante de *H. pylori* es que es microaerofílico, con óptimo crecimiento a niveles de O₂ de 2-5% y la necesidad adicional de 5-10% de CO₂ y alta humedad. No hay necesidad de H₂, sin embargo no es perjudicial. Muchos laboratorios utilizan condiciones microaeróbicas estándar de 85% N₂, 10% CO₂ y 5% O₂ para el cultivo de *H. pylori*. El crecimiento ocurre a 34-40°C, con una temperatura óptima de 37°C. Aunque su hábitat natural es la mucosa gástrica ácida, *H. pylori* es considerado ser un neutralófilo. La bacteria puede sobrevivir brevemente al exponerse a pH de 4, pero el crecimiento ocurre solamente a rangos relativamente cercanos a pH de 5.5- 8.0, con óptimo crecimiento a pH neutro. *H. pylori* es un microorganismo fastidioso y requiere un medio de cultivo complejo. En ocasiones estos medios son complementados con suero o sangre (Kusters y col., 2006).

Genoma

El tamaño de dos genomas secuenciados de *H. pylori* es aproximadamente 1.7 Mbp, con un contenido de G-C de 35-40%. El genoma de la cepa 26695 de *H. pylori* incluye 1587 genes, mientras que el genoma de la cepa J99 incluye solo 1491 genes. Ambos genomas contienen dos copias de los genes rRNA 16S, 23S y 5S. En contraste con otras bacterias patógenas que son altamente clonales, *H. pylori* es genéticamente heterogéneo. Esto resulta en que prácticamente cada sujeto *H. pylori*-positivo porte una distinta cepa, sin embargo las diferencias entre ellas puede ser pequeña. La heterogeneidad genética es posiblemente una adaptación de la bacteria hacia las condiciones gástricas del hospedero, así como también de los distintos patrones de la respuesta inmune mediada por el hospedero hacia la infección por *H. pylori* (Kusters y col., 2006).

Epidemiología

La colonización del estómago por *Helicobacter pylori* es la más común de las infecciones bacterianas crónicas en el ser humano, afectando alrededor del 60% de la población mundial (Ramírez y Sánchez, 2009). La prevalencia de *H. pylori* muestra grandes variaciones geográficas. En varios países en desarrollo, más del 80% de la población es *H. pylori* positiva, aún los jóvenes. La prevalencia en países industrializados generalmente se mantiene baja (~40%) y es considerablemente menor en niños y adolescentes que en adultos y personas mayores. Dentro de áreas geográficas, la prevalencia de *H. pylori* esta inversamente correlacionada con el nivel socioeconómico, en particular en relación con las condiciones de vida durante la niñez (Kusters y col., 2006).

Vías de Transmisión

H. pylori tiene un estrecho rango de hospedadores y es encontrada casi exclusivamente en humanos y algunos primates no humanos. La infección ocurre como consecuencia de la transmisión directa de humano a humano, ya sea vía oral-oral ó fecal-oral, incluso ambas. *H. pylori* se ha detectado en saliva, vómito, reflujo gástrico y heces, pero no hay evidencia concluyente de la vía de transmisión predominante de ninguno de estos productos. Como resultado de investigaciones realizadas, se cree que la adquisición ocurre principalmente en la niñez temprana, más probablemente entre los miembros de la familia. Otras posibles fuentes de infección son el agua y alimentos contaminados, pero aunado a que *H. pylori* sobrevive brevemente en alimentos refrigerados y a su extrema sensibilidad a la presión de oxígeno atmosférico, falta de nutrientes y temperaturas externas de 34-40°C; la transmisión directa de persona a persona sigue siendo la principal ruta de transmisión (Kusters y col., 2006).

Patogénesis de la Infección

Helicobacter pylori es un microorganismo bastante adaptado a la mucosa gástrica; posee la capacidad de penetrar en el moco de la mucosa, nadar a través del mismo, adherirse a las células epiteliales, evadir y modular la respuesta del sistema inmune generada por el hospedero y mantener una colonización persistente. Este microorganismo daña la capa de moco mediante su adhesión al epitelio y altera la fisiología normal de la secreción ácida, volviendo a la mucosa gástrica más susceptible al pH ácido; libera enzimas y toxinas y genera un proceso inflamatorio crónico que perpetúa al daño tisular (Ramírez y Sánchez, 2009).

Factores de Virulencia

H. pylori coloniza y persiste en un nicho único que es el lumen gástrico. Los determinantes patogénicos putativos de *H. pylori* se dividen en dos grupos: factores de virulencia que contribuyen a efectos patogénicos de la bacteria y factores de mantenimiento que permiten a la bacteria colonizar y permanecer en el hospedero. Los factores de virulencia se clasifican según sus efectos patogénicos en el hospedador: inflamación gástrica, ruptura de la barrera de la mucosa gástrica y alteración de la fisiología gástrica. Muchos de los factores de *H. pylori* funcionan como factores de virulencia y mantenimiento *in vivo* (Cava y Cobas, 2003).

Motilidad y adhesión bacteriana. La motilidad de *H. pylori* es esencial para la colonización, esta le permite a la bacteria desplazarse a través de la mucosa viscosa que cubre las células de la mucosa gástrica. *H. pylori* posee de 5 a 7 flagelos unipolares. Una propiedad particular de estos flagelos es la presencia de una membrana que cubre el filamento flagelar. Esta membrana está compuesta de una doble capa de fosfolípidos y son los que protegen al flagelo de la acidez gástrica (Marais, 1999).

Los análisis del genoma de *H. pylori* sugieren la existencia de al menos 40 proteínas involucradas en la regulación, secreción y ensamble de la estructura flagelar (Marais, 1999).

H. pylori ha desarrollado propiedades metabólicas y fisiológicas que le permiten sobrevivir y crecer en un nicho particular. Sin embargo, hay algunas ventajas adicionales que le permiten migrar al ambiente más favorable. Así, la quimiotaxis puede ser crucial para la colonización gástrica (Marais, 1999).

La adhesión de *H. pylori* al epitelio gástrico, esta mediada por muchos factores bacterianos. La multitud de adhesinas probablemente refleja su importancia para las bacterias, una de las más estudiadas y documentadas han sido tres proteínas Hop. La proteína BabA (HopS) representa probablemente la proteína de adhesión de *H. pylori* más estudiada, y es codificada por el gen baba. La BabA media la unión a los antígenos del grupo sanguíneo de Lewis b (Le^b) fucosilado. Estudios en animales sugieren que la adhesión mediada por BabA es importante para la colonización y patogénesis de *H. pylori*. La proteína OipA (HopH) es otro miembro de la familia de las proteínas Hop, la cual puede servir como una adhesina pero originalmente era identificada como una proteína inductora de respuesta inflamatoria. Por último, la proteína SabA (HopP) media la unión al ácido siálico conteniendo glicoconjugados. Debido a esto el papel de la SabA es probablemente durante la inflamación crónica y durante las etapas de la enfermedad atrófica (Kusters, 2006).

Liberación de enzimas. *H. pylori* libera varias enzimas que pueden causar daño celular mediante mecanismos directos o indirectos (Ramírez y Sánchez, 2009). *H. pylori* produce niveles elevados de ureasa, la cual constituye cerca del 6% de la proteína total de la bacteria. Esta enzima desdobra la urea en amonio y dióxido de carbono, brindando un ambiente de amonio que neutraliza los ácidos, el cual protege a la bacteria de la acidez gástrica. La ureasa de *H. pylori* posee características inusuales comparadas con

las de otras especies de bacterias. Primero, la enzima es encontrada en el citoplasma así como en la superficie de la bacteria. Segundo, tiene dos pH óptimos, uno de ellos es ácido, y presenta mayor afinidad al sustrato que otras ureasas bacterianas. Y tercero, está compuesta de solo dos subunidades, UreA y UreB, mientras que otras ureasas contienen tres subunidades (Marais, 1999).

La acción de las fosfolipasas altera la estructura e integridad de la mucosa gástrica, originando un cambio en su tensión superficial, hidrofobicidad y permeabilidad (Ramírez y Sánchez, 2009).

Helicobacter pylori produce mayor cantidad de catalasa que la mayoría de las bacterias. Esta enzima funciona como antioxidante y protege a la bacteria de los compuestos tóxicos de oxígeno liberados por la activación de neutrófilos permitiendo su supervivencia y proliferación en una mucosa dañada por la inflamación (Ramírez y Sánchez, 2009).

Toxinas. Las cepas bacterianas VacA⁺ expresan la citotoxina VacA, proteína de 87 KDa, capaz de causar daño celular gástrico *in vitro* e *in vivo*. Luego de ser secretada, se inserta en la membrana celular epitelial y forma canales dependientes de voltaje selectivos para aniones, capaces de incrementar la permeabilidad del epitelio gástrico a la urea, bicarbonato y otros aniones orgánicos. Aunque todas las cepas de *H. pylori* poseen el gen que codifica la toxina VacA, sólo la expresan aquellas cepas que contienen un gen asociado a la toxina A (CagA). Este gen, codifica una proteína de 128 a 140 KDa cuya función es aún desconocida, pero debido a que es necesaria para la expresión del gen de VacA, actuaría como un factor de transcripción, excreción y regulador de la función de la toxina VacA. Las cepas que expresan el gen CagA han sido asociados a un mayor grado de severidad de gastritis (Ramírez y Sánchez, 2009).

Respuesta Inflamatoria

H. pylori estimula una profunda respuesta inmunológica e inflamatoria en casi todas las personas infectadas. Esta respuesta inflamatoria es la consecuencia del reclutamiento de neutrófilos, seguidos de linfocitos T y B, células plasmáticas y macrófagos con el consiguiente daño tisular (Ramírez y Sánchez, 2009).

Dado que la bacteria no invade el tejido gastroduodenal, este proceso inflamatorio sería desencadenado por la adhesión de *H. pylori* a las células epiteliales. La bacteria posee varias sustancias antigénicas que son captadas y procesados por los macrófagos de la lámina propia gástrica con la consecuente estimulación de los linfocitos T. El resultado final es el incremento en la producción de citocinas inflamatorias como la IL-1, IL-2, IL-6, TNF α e IL-8 (Ramírez y Sánchez, 2009).

La IL-8 juega un papel central en el proceso inflamatorio generado por la infección por *H. pylori*. Esta interleucina es un potente factor quimiotáctico que activa a los neutrófilos y recluta células inflamatorias en la mucosa gástrica. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) estimula a la mucosa inflamada a producir IL-8. La infección por *H. pylori* activa tanto a los linfocitos B y linfocitos T. La respuesta mediada por linfocitos B ocurre de manera local en la mucosa gastroduodenal y de manera sistémica (Ramírez y Sánchez, 2009).

Estudios de vacunación realizados en ratón durante la década pasada han llevado a la búsqueda de una correlación inmunológica de protección. Sin embargo, evidencia reciente sugiere que *H. pylori* puede persistir en la mucosa debido a su habilidad de regular negativamente la inflamación, y que la vacunación puede tener éxito debido a la activación de células T que, en respuesta, son capaces de promover inflamación suficiente para erradicar a *H. pylori* (Blanchard, 2004).

Mecanismos de Inflamación en la Infección por *H. pylori*

Cuando se consideran los mecanismos de inflamación de la mucosa, inducida por *H. pylori*, es útil considerar las rutas potenciales por las cuales el organismo puede interactuar con las células del hospedero para iniciar tanto daño celular directo como una respuesta inmune. *H. pylori* coloniza el epitelio gástrico humano, habitando dentro de la capa mucosa en proximidad con la superficie epitelial (con la cual se puede adherir), pero sin invadir la mucosa. Existen dos mecanismos principales por los cuales *H. pylori* (o sus productos) pueden producir inflamación gástrica. Primeramente, el organismo puede interactuar con las células de la superficie epitelial, produciendo ya sea daño celular directo o la liberación de mediadores pro-inflamatorios derivados del epitelio (quimiocinas). En segundo lugar, los productos derivados de *H. pylori* pueden ganar acceso a la mucosa subyacente, así estimulan directamente respuesta inmune específica y no específica en el hospedero, involucrando la liberación de una variedad de mensajeros de citocinas (Bodger y Crabtree, 1998).

Daño Celular Directo

Existen varias maneras por las cuales *H. pylori* puede causar daño directo sobre la superficie epitelial, así como contribuir a cambios en la permeabilidad de la mucosa y mejorando la exposición al antígeno. La adherencia del organismo a las células del epitelio gástrico es bien reconocida y se sabe que es acompañada por pérdida de microvellosidades, irregularidades en el borde luminal, y cambios intracelulares incluyendo pérdida de citoplasma y vacuolización. La degeneración de la superficie epitelial está correlacionada con el número de *H. pylori* en contacto cercano con la membrana plasmática epitelial, un descubrimiento que apoya un efecto tóxico directo de los productos bacterianos en las células epiteliales (Bodger y Crabtree, 1998).

Respuesta de Quimiocinas Epiteliales

Diferentes quimiocinas muestran una marcada especificidad celular hacia miembros de la sub familia C-X-C (ejemplo IL-8, GRO- α) que tienen actividad quimiotáctica específica para neutrófilos, y hacia miembros de la familia C-C (ejemplo RANTES, MIP-1 α) que tienen efectos en monocitos y linfocitos. Una variedad de estudios han mostrado que el epitelio gástrico es una importante fuente de quimiocinas, las cuales son liberadas en respuesta a *H. pylori* y por exposición a mediadores endógenos pro-inflamatorios. La respuesta por quimiocinas epiteliales puede ser particularmente importante en las etapas tempranas de la inflamación inducida por *H. pylori*, con el epitelio actuando como una crucial primera línea de defensa contra la infección microbiana (Bodger y Crabtree, 1998).

Inmunidad No-Específica

El mecanismo primario de defensa del hospedero hacia el ataque microbiano usualmente involucra la respuesta de células polimorfonucleares. La persistencia de un componente neutrófilo activo en la infección crónica implica un importante papel en el desarrollo, de la inflamación inducida por *H. pylori*. Además de la respuesta de citocinas quimiotácticas epiteliales, la difusión de varios productos bacterianos directamente dentro de la mucosa, puede resultar en reclutamiento y activación de neutrófilos. *In vitro*, *H. pylori* es una potente fuente de factores capaces de inducir quimiotaxis y activación de neutrófilos. Los fagocitos mononucleares juegan un papel central en la respuesta inmune temprana hacia la bacteria, sirviendo como una importante fuente de mediadores pro-inflamatorios y como células presentadoras de antígenos involucradas en la iniciación de la inmunidad específica (Bodger y Crabtree, 1998).

Inmunidad Específica

La presencia de linfocitos T y células plasmáticas en el infiltrado inflamatorio en gastritis crónica por *H. pylori*, sugieren que los mecanismos inmunes antígeno-específico y humoral son importantes. La infección por *H. pylori* resulta en el desarrollo de folículos linfoides gástricos organizados, los cuales disminuyen gradualmente en número después de la erradicación del organismo, sugiriendo que se requiere la estimulación antigénica específica hacia *H. pylori*. Las células CD4⁺ (cooperadoras) juegan un papel importante en la respuesta inmune antígeno-específica y la infección está asociada con un incremento en células gástricas CD4⁺ T. Las células CD4⁺ están clasificadas en dos tipos principales, dependiendo de las características del perfil de citocinas. En la respuesta tipo Th1, los linfocitos secretan IL-2 e interferon gamma, y median las respuestas inmunes celulares, mientras que las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-10 las cuales ayudan en la activación de células B y producción de anticuerpos, incluyendo respuestas IgA en mucosa. Se ha reportado que *H. pylori* induce producción de IFN- γ por los linfocitos periféricos, e incrementan las células productoras de IFN- γ en la mucosa gástrica (Bodger y Crabtree, 1998).

Modelos Animales para la Infección por *H. pylori*

Poco después de que Marshall y Warren cumplieron los postulados de Koch para *H. pylori* y gastritis aguda, mediante el experimento de infección en ellos mismos, era aparente que un modelo animal era necesario para permitir la elucidación de los mecanismos que gobiernan el desarrollo de la enfermedad y las propiedades patogénicas de *H. pylori*, así como para probar los efectos de tratamientos y vacunación de la patogénesis de la infección por este patógeno (Kusters y col., 2006).

Marchetti y col. (1995), propusieron un modelo de infección de *H. pylori* en ratón después de una colonización exitosa de estómagos por cepas de *H. pylori* expresando las citotoxinas vacA y cagA. Como en otros estudios, empleando diferentes cepas de ratón

para probar patogenicidad de *H. pylori*, estos autores se enfocaron en el desarrollo de gastritis durante la infección, pero los efectos de esta bacteria en secreción gástrica y el nivel de cicatrización de la úlcera habían sido poco estudiadas en estas especies (Konturek y col., 1999).

Se han desarrollado un gran número de modelos experimentales animales para definir la asociación entre la infección por *H. pylori* y la enfermedad gastrointestinal, tales como lechones, perros, ratones, primates no humanos (Rhesus y japonés), jerbos mongolianos, entre otros (Kodama y col., 2005). Sin embargo, el ratón es el hospedero animal más utilizado para las investigaciones de la patogenicidad de *H. pylori* y otras bacterias. Además su mantenimiento es relativamente económico (Kusters y col., 2006).

Enfermedades Asociadas a *H. pylori*

La colonización con *H. pylori* no es una enfermedad por sí misma, pero si es una condición que afecta el riesgo relativo de desarrollar varios desórdenes clínicos de la parte alta del tracto gastrointestinal y posiblemente del tracto hepatobiliar (Kusters y col., 2006).

Aunque la colonización gástrica con *H. pylori* induce gastritis histológica en todos los individuos infectados, solo una minoría desarrolla algún signo clínico aparente.

Gastritis crónica

La colonización con *H. pylori* siempre lleva a infiltración de la mucosa gástrica en antro y cuerpo, con células neutrofílicas y mononucleares. Esta gastritis crónica es la condición primaria relacionada a la colonización de *H. pylori*, y otros desórdenes asociados, en particular resultantes de estos procesos inflamatorios crónicos. Cuando la colonización se convierte persistente, una correlación cercana existe entre el nivel de secreción de ácido y la distribución de la gastritis, esto resulta de los efectos

contraproducentes de ácido en el crecimiento bacteriano contra los efectos del propio crecimiento, con la asociada inflamación de mucosa en la regulación y secreción de ácido. Esta interacción es crucial en la determinación del desarrollo de la infección de *H. pylori* (Kusters y col., 2006).

Úlcera Duodenal

El mecanismo por el cual *H. pylori* causa úlcera péptica aún no se conoce por completo. Se sugiere que la bacteria incrementa la producción de gastrina postprandial, lo que trae como consecuencia un incremento de ácido producido por la mucosa. Este, junto con el consumo de drogas antiinflamatorias no esteroideas y tabaco, permite que *H. pylori* colonice la mucosa duodenal promoviendo su ulceración (Hernández, 2004).

Gastritis Atrófica, Metaplasia Intestinal y Cáncer Gástrico

La inflamación crónica inducida por *H. pylori* puede eventualmente terminar en la pérdida de la arquitectura normal de la mucosa gástrica, con destrucción de glándulas gástricas y remplazo por epitelio intestinal y fibrosis. Se ha estimado que la colonización por *H. pylori* incrementa el riesgo de cáncer aproximadamente diez veces y debido a esto en 1994, fue designado como carcinógeno clase I por la Organización Mundial de la salud (Kusters y col., 2006).

Desórdenes Extragastrroduodenales

Helicobacter pylori ha sido ligado con una variedad de desórdenes extra gástricos. Entre ellos se incluyen enfermedad coronaria cardiaca, desórdenes dermatológicos (como son rosácea y urticaria idiopática), enfermedad tiroidea autoinmune y púrpura trombocitopénica, escleroderma, migraña, anemia por deficiencia de hierro, Fenómeno de Raynaud y síndrome Guillain-Barré (Kusters y col., 2006).

La infección por *H. pylori* ha sido asociada con un riesgo, hasta 2 veces mayor de padecer enfermedades cardiovasculares. La asociación es independiente de otros factores, como hábito de fumar, hipertensión arterial e hiperlipidemias. A pesar de informes contradictorios, la infección por *H. pylori* ha sido relacionada en estudios prospectivos, con el infarto del miocardio y con la enfermedad coronaria. En diabéticos, la presencia de *H. pylori* en el aparato gastrointestinal se asocia con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares (Hernández, 2001).

Muchos estudios han reportado una asociación entre la infección por *H. pylori* y un incremento en el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular. La fuerza de la asociación ha sido difícil de evaluar debido a la variedad de métodos de los estudios y de la heterogeneidad sustancial de los resultados. Entre los mecanismos que pueden contribuir a esta asociación se incluyen, anomalías en los niveles de ciertas proteínas sanguíneas (por ejemplo fibrinógeno o proteína C reactiva) secundarios a la infección crónica y elevación de la presión arterial en personas infectadas con *H. pylori* (Harvey y col., 2001).

Hipertensión

La hipertensión arterial, o presión alta es un problema importante de salud pública en el mundo industrializado, y representa el principal factor de riesgo de infarto al miocardio y falla cardíaca. Un tercio de la población es hipertensa, mientras otra tercera parte tiene pre-hipertensión y comúnmente desarrollan hipertensión en 2 años. A los 70 años de edad, el 70% de los ciudadanos de Estados Unidos tienen hipertensión. A pesar de la frecuencia de esta enfermedad, su causa en la mayoría de los adultos es desconocida. Virtualmente en todos los casos de adultos con hipertensión, la resistencia vascular sistémica esta incrementada, sugiriendo una causa vascular de la enfermedad (Harrison y col., 2012).

Además, el riñón está implicado en hipertensión. La mayoría de los defectos genéticos heredados que causan hipertensión afectan el nefrón distal, llevando a retención de sodio y volumen. Finalmente, hay amplia evidencia de que el sistema nervioso central es alterado en la hipertensión. Los mecanismos precisos mediante los cuales estos sistemas interactúan para causar hipertensión no han sido aclarados (Harrison y col., 2012).

Definición

Es usualmente definida por la presencia de una elevación crónica de la presión arterial sistémica arriba de cierto valor límite. La hipertensión es un síndrome cardiovascular progresivo derivado de etiologías complejas e interrelacionadas. Algunos marcadores tempranos del síndrome son a menudo presentados antes de una elevación sostenida de la presión sanguínea; por lo tanto, la hipertensión no puede ser clasificada solamente por discretos límites de presión arterial. Su progresión está fuertemente asociada con anomalías cardíacas y vasculares, sean funcionales o estructurales, que dañan el corazón, los riñones, cerebro, vasculatura, y otros órganos y llevan a morbilidad prematura y la muerte (Giles y col., 2009).

La hipertensión esencial se agrupa en familias y representa un conglomerado de enfermedades o síndromes de base genética, con varios factores fisiopatológicos y bioquímicos heredados subyacentes. En la mayor parte de los casos la hipertensión es producto de una interacción compleja de factores genéticos, ambientales y demográficos. La hipertensión, combinada con otros factores de riesgo cardiovascular, conduce a aterosclerosis y otros tipos de enfermedad vascular, al lesionar el endotelio (Goldman y Bennett, 2002). La toma de decisiones sobre el tratamiento de hipertensión es influenciada por la severidad de la hipertensión y por la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular (Lu y col., 2007).

Regulación

Estudios farmacológicos han demostrado que la presión sanguínea es regulada por una compleja interacción de muchas rutas bioquímicas, las más importantes de estas son el sistema renina-angiotensina; el sistema nervioso simpático-catecolamina; sistema péptido natriurético; el sistema óxido nítrico; y la vasopresina, endotelina y prostaglandina. Estos sistemas tienen acciones hipertensivas y anti-hipertensivas, que mantienen el balance normal de la presión sanguínea (Sugiyama y col., 2001).

Hipertensión e Inflamación

La hipertensión arterial también ha sido considerada como la resultante de un proceso inflamatorio con remodelación y engrosamiento de las paredes vasculares, al que se asocia una respuesta inmunológica. De esta forma, se describe a lo largo de los vasos sanguíneos arteriales y venosos, la concurrencia de células inflamatorias, con formas de inmunidad innata y con formas de inmunidad adaptativa (Pastelín y Rosas, 2007). Algunos patógenos que han sido implicados en hipertensión incluyen *Chlamydia pneumoniae*, *H. pylori* y herpes simple. Estudios recientes han incluido en sus estudios la hipótesis de la carga de patógenos infecciosos, esto es, que no un simple patógeno, sino el agregado del patógeno lleva a incrementar el riesgo de hipertensión (Liu y col., 2007).

Sitios de Inflamación en Hipertensión

Como se mencionó líneas arriba, los órganos implicados más a menudo en hipertensión son la vasculatura, los riñones y el cerebro. Las células inflamatorias son acumuladas en todos estos órganos en la creación de la hipertensión, aunque la mayoría de las investigaciones se han enfocado en la vasculatura y el riñón. En los vasos sanguíneos, se ha encontrado que la infusión crónica de angiotensina II causa acumulación vascular de células T, B, macrófagos, y en menor medida, células dendríticas. Así, estas células son

predominantemente acumuladas en la adventicia y el tejido adiposo perivascular de los vasos más grandes y en los vasos de menor resistencia como son la arcada mesentérica. La razón precisa por la que las células inflamatorias se acumulan en la región perivascular permanece sin ser aclarada, sin embargo los nervios simpáticos terminan en estas regiones y pueden contribuir a la señalización de este proceso inflamatorio. El tejido vascular adiposo libera factores que afectan el tono vascular y generan moléculas quimiotácticas que promueven la inflamación (Harrison y col., 2012).

También hay evidencia que las células inflamatorias se acumulan en las regiones perivasculares del riñón, y dentro y alrededor del glomérulo. Aunque menos estudiado, el cerebro es también un sitio de inflamación en hipertensión. Las células de la microglia son particularmente importantes, las cuales son células inmunes residentes del sistema nervioso central. La microglia es derivada de células monocíticas y desarrolla propiedades similares a los macrófagos activados durante la inflamación (Harrison y col., 2012).

Mecanismos por los Cuales las Células Inflamatorias Promueven Hipertensión

Mientras que varios estudios apoyan fuertemente el papel de las células inflamatorias en hipertensión, el mecanismo preciso involucrado en este proceso, permanece siendo de atención en la investigación. En el caso de células T, varios estímulos hipertensivos incrementan el porcentaje de células T circulantes con un fenotipo efector. Estas células son acumuladas en el tejido adiposo perivascular y en el riñón, donde liberan citocinas que parecen tener un papel crítico en la elevación de la presión sanguínea (Harrison y col., 2012). Una citocina de particular importancia parece ser la interleucina 17 (IL-17) la cual es producida por las células T activadas. Su producción es inducida en infecciones, enfermedades autoinmunes y en otros eventos inflamatorios. La IL-17 está involucrada en la defensa del hospedero, pero también en destrucción del tejido

inflamatorio. Tiene un papel en la inflamación vascular crónica de la aterosclerosis y posiblemente en cambios vasculares hipertensivos (Vietinghoff y Leyk, 2010).

Por otro lado, la interleucina 6 (IL-6) actúa en conjunto con el factor de crecimiento transformador para polarizar las células CD4⁺ y CD8⁺ hacia la producción de IL-17. Se han encontrado concentraciones de IL-6 elevadas en plasma en pacientes con características de síndrome de resistencia a la insulina, sugiriendo que IL-6 puede directa o indirectamente impactar en la patogénesis de la arterosclerosis e hipertensión. Estudios prospectivos han mostrado que estas concentraciones en plasma son asociadas significativamente con elevaciones de la presión arterial sistólica y diastólica. La IL-6 circulante, además estimula el eje hipotálamo-pituitaria-suprarrenal, el cual, cuando es activado, es asociado con el desarrollo de hipertensión (Sesso y col., 2007).

Se ha hecho evidente que las citocinas inflamatorias como IL-17 e IL-6 contribuyen a la hipertensión, probablemente porque favorecen la elevación de la presión arterial y por causar daño en órganos diana.

Harrison y col., en el 2012, propusieron que la inflamación relacionada con el sistema nervioso central, el riñón y la vasculatura, y la disfunción producida por ellos, lleva a una elevación de la presión arterial. Esto lo explican de la siguiente manera: un estímulo como angiotensina II, alto nivel de sal, o estrés crónico activa regiones del cerebro, llevando a un incremento en el flujo de salida simpático y tal vez otras señales que causan modestas elevaciones en la presión sistémica (pre-hipertensión) y promueve producción local de citocinas. Las elevaciones en la presión, en conjunto con la liberación directa de angiotensina II y el incremento de neurotransmisores como la norepinefrina, llevan a dañar el tejido, a liberación de citocinas derivadas de tejido como la IL-6 y formación de neoantígenos, tal vez debido a modificaciones oxidativas. Las células presentadoras de antígenos, incluyendo células dendríticas y macrófagos están involucradas en presentar estos neoantígenos, llevando a la activación de células T. Las células T activadas producen citocinas como la IL-17, la cual es crítica en el proceso

hipertensivo. Este medio inflamatorio, compuesto de IL-17, IL-6, catecolaminas, angiotensina II y especies oxígeno reactivas (ROS) promueven la retención de sodio en los riñones y en la vasculatura causando vasoconstricción y remodelamiento vascular. Estos eventos causan progresión de pre-hipertensión a severa hipertensión.

Hipertensión y Modelos Murinos

Por muchos años, la hipertensión fue estudiada en modelos de ratas, pero la nueva señalización de genes y las tecnologías transgénicas han permitido desarrollar al ratón como modelo de estudios de hipertensión (Sugiyama y col., 2001). La manipulación del genoma del ratón ha brindado a la investigación cardiovascular muchos nuevos modelos de enfermedad. La extracción de la máxima información de estos modelos requiere de sistemas que puedan obtener cambios reales en la función cardiovascular del ratón (Whitesall y col., 2004).

Los modelos animales de hipertensión en ratón comparten muchas características comunes con la hipertensión humana. Muchos de estos modelos han sido desarrollados mediante la utilización de factores etiológicos que presumiblemente son responsables de la hipertensión en el humano como son ingesta excesiva de sal, hiperactividad del sistemas renina-angiotensina-aldosterona y factores genéticos (Badyal y col., 2003).

La medición de presión sanguínea es generalmente realizada en ratones conscientes usando ya sea sistemas no invasivos de bandas elásticas inflables acopladas a un transductor de señales o mediante radiotelemedría con catéter implantados quirúrgicamente. El sistema de bandas elásticas inflables detecta el flujo de sangre arterial en la cola, con presión sistólica siendo determinada mediante la presión que es aplicada a una banda elástica colocada en la base de la cola. Este procedimiento es realmente sencillo para medir gran número de ratones y detectar incrementos sustanciales en la presión sanguínea. Sin embargo, han existido algunos problemas con respecto a las mediciones de presión por este método, incluyendo la imposibilidad de

mediciones continuas (24 horas por día), el estrés potencial inducido por la necesidad de inmovilizar al ratón, y la precisión de los datos. Un procedimiento alternativo es el uso de radiotelemedría para mediciones de presión sanguínea. Esta técnica tiene el beneficio de permitir la continua adquisición de presión sanguínea a lo largo del día en ratones en libre movimiento. Sin embargo, hay advertencias acerca del uso de la radiotelemedría, especialmente en lo relacionado a estudios de aterosclerosis en modelos murinos. Un problema práctico es el costo de este método, el cual puede prohibir estudios que involucran muchos ratones por grupo experimental (Lu y col., 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo Animal y Mantenimiento

Se utilizaron 30 ratones machos de 6 a 8 semanas de edad, cepa CD1 singénica, como modelo experimental. Se formaron 2 grupos: control (15) y experimental (15). Los ratones se mantuvieron 12 horas en ayuno y sin agua, previo a las inoculaciones; y se conservaron en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas, a temperatura de 20-25°C, con libre acceso a agua y alimento. No se utilizó ningún pre tratamiento especial (como inhibidor de ácido o antibióticos) antes de la inoculación intragástrica o antes del sacrificio de los animales. Los ratones se mantuvieron en un sistema de alojamiento metálico con jaulas individuales. Los ratones tuvieron libre acceso a agua purificada y alimento estéril durante el experimento, este último fue de la marca Harlan Taekland 18% de proteína 2018S (No. Catálogo 8604) y agua purificada (Wirth y col., 1998).

Cultivo de *Helicobacter pylori*

Se utilizó la cepa ATCC 43504 de *Helicobacter pylori*, que proviene de epitelio antral humano y genotípicamente corresponde a una cepa CagA⁺/VacA⁺, la cual se sembró en el medio sólido agar *Brucella* enriquecido con suero fetal bovino utilizando un aplicador, para esparcir la cepa en toda la placa, y así obtener mayor recuperación en la siembra. Una vez sembradas las placas se incubaron a 37°C, en condiciones microaerofílicas de 15% CO₂, 80% N₂ y 5% O₂, (se utilizó una jarra BBL Campy GasPack) por 3 – 5 días (Sawai y col., 1999). Cuando se observó crecimiento se procedió a realizar las pruebas bioquímicas para su identificación; las cuales fueron la prueba de ureasa, catalasa y oxidasa. Además de confirmó la presencia de *H. pylori* mediante la tinción de gram (Ver Anexos).

Turbidimetría de McFarland

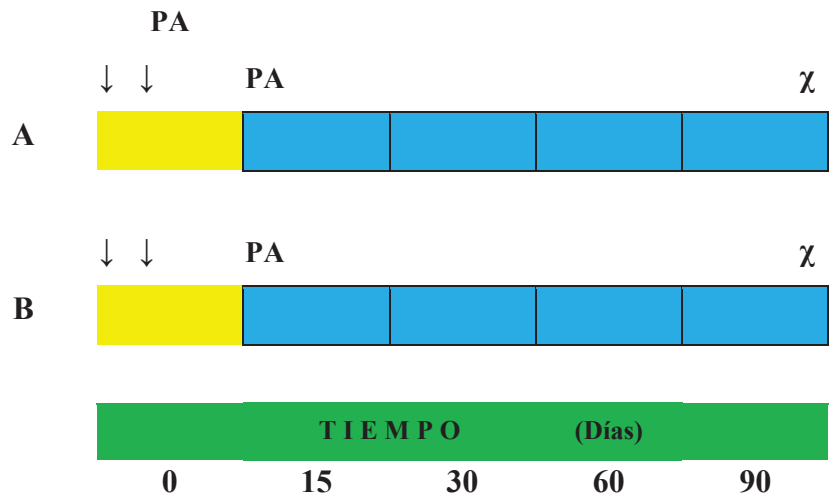
Esta prueba se utiliza para producir un cultivo de una densidad deseada (MacFaddin, 2003). De la cepa aislada e identificada de *Helicobacter pylori* se tomaron cuatro o cinco colonias aproximadamente, del mismo tipo morfológico y se inocularon en un tubo con caldo *Brucella*, se colocaron en incubación bajo condiciones microaerofílicas hasta observarse turbidez; posteriormente se ajustó la turbidez del inóculo problema con respecto a la turbidez obtenida del tubo correspondiente, en base a la escala del nefelómetro de McFarland sobre un fondo blanco bien iluminado que presenta líneas negras gruesas, y así se obtuvo la concentración aproximada de bacterias viables en el caldo de cultivo.

Inoculación de *Helicobacter pylori*

Se preparó una suspensión de la cepa obtenida para en caldo *Brucella* de 1×10^9 bacterias/mL, concentración ajustada por turbidimetría según la escala de McFarland. Inmediatamente, se inocularon con 100 μ L de esta suspensión bacteriana a los ratones. La inoculación se realizó mediante sonda intragástrica, en caldo *Brucella* estéril a través de una jeringa. Los animales control se inocularon con idénticos volúmenes de caldo *Brucella* sin bacteria (Wirth y col., 1998). La inoculación se realizó por duplicado a los 0 y 7 días (Figura 1).

Medición de Presión Arterial

La presión arterial se midió en la cola de los animales del grupo control y experimental, en un equipo automatizado: IITC Life Science/Blood Pressure Amplifier with Built-in pump. Las mediciones se realizaron por quintuplicado a tiempo cero y post infección con *Helicobacter pylori* cada 15 días durante un período de 90 días en total. El equipo IITC mide la presión arterial sistólica, es un método indirecto no invasivo, en la cola de los ratones conscientes. Estos se acondicionan en una cámara térmica por 10-20



A= GRUPO CONTROL

B= GRUPO EXPERIMENTAL

↓ = INOCULACIÓN Caldo Brucella

↓ = INOCULACIÓN *H. pylori*

PA= PRESIÓN ARTERIAL

χ = SACRIFICIO

Figura 1. Diseño experimental.

minutos por día, por al menos 3 días antes de la medición. Después de estos 3 días de entrenamiento, los ratones permanecen tranquilos e inperturbados cuando se colocan dentro del posicionador biomecánico (restreiner) el día de la prueba. El acondicionamiento ocurre más rápidamente cuando el ratón ha sido manejado gentilmente y no es forzado a entrar en el posicionador. La cámara es mantenida de 31-33°C, y un tubo en la oscuridad ayuda a calmar y asegurar el ratón en el posicionador (Whitesall y col., 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estandarización Para la Medición de la Presión Arterial

El grupo de 30 ratones, se mantuvieron en entrenamiento previo en el posicionador biomecánico. El equipo se mantuvo encendido antes de su uso por 25 minutos para lograr tener la temperatura de 34°C. Se introdujeron los ratones dentro de los posicionadores y se probó con diferentes tiempos de incubación dentro de la cámara térmica (5, 10, 15 y 25 minutos) y con diferentes presiones de inflado (100, 150 y 200mmHg), Con base en el registro y estabilidad del registro cardiaco y disminución de la variabilidad en las determinaciones de presión, se concluyó que las condiciones óptimas son 25 minutos dentro de la cámara térmica a una presión de inflado de 150 mmHg, y mediciones por quintuplicado cada 3 segundos para así obtener mediciones precisas, estas condiciones resultaron ser similares a las utilizadas por Whitesall y col. (2004). En base a los resultados obtenidos en esta prueba, se lograron establecer los valores de presión arterial sistólica y diastólica para nuestro grupo de estudio; se obtuvieron medias de 115.6 mmHg para la presión sistólica y 94.27 mmHg para la diastólica (Tabla I). Cholewa y Mattson (2001) reportaron en su estudio una media de 122mmHg para la presión sistólica y 102mmHg para la diastólica, al medirla en ratones machos de la cepa Swiss-Webster de 6-8 semanas de edad. Considerando esta referencia podemos decir entonces, que nuestros valores son similares a los reportados, aun cuando esta reportado que los valores pueden presentar pequeñas variaciones de cepa en cepa.

Es Posible Inducir Hipertensión en la Cepa CD1

Se realizó una prueba en un grupo de ratones cepa CD1 a los cuales se les indujo hipertensión con norfenefrina vía oral y se les determinó posteriormente la presión arterial, esto para comprobar que nuestra cepa es susceptible a desarrollar hipertensión.

Tabla I. Estandarización para la medición de la presión arterial en ratones CD1. Condiciones óptimas: 25 minutos de calentamiento (34°C), a 150 mmHg y 5 mediciones cada 3 segundos. N=30.

	PRESION SISTÓLICA	PRESION DIASTÓLICA
	(mmHg)	(mmHg)
Media	115.6	94.27
DS	9.65	10.31
Mínimo	87.49	66.96
Máximo	139.3	123.17

La norfenefrina es un agente simpaticomimético con actividad predominantemente alfa-adrenérgica. La respuesta cardiovascular principal a la administración de norfenefrina, es la elevación de la presión sanguínea. Los ratones fueron clasificados en 2 grupos de 5 ratones cada uno, grupo I (GI) a los cuales se les administraron vía oral 4 mg de norfenefrina/kg peso del ratón (GI), mediante sonda intragástrica; y grupo II (GII) al cual no se le administró medicamento. A ambos grupos se les midió la presión arterial antes del tratamiento y posteriormente a las 2 horas. Los resultados obtenidos para el grupo I (GI) mostraron un incremento significativo en la presión arterial sistólica (35.65 mmHg, $p=0.0000$), siendo estos de 115.46 ± 4.37 mmHg para la presión sistólica basal y 151.11 ± 9.41 mmHg para la post-tratamiento; de igual manera GI mostró un incremento significativo en la presión diastólica (36.47 mmHg, $p=0.0000$) siendo tales resultados de 94.68 ± 5.92 mmHg para la presión diastólica basal y 131.15 ± 10.6 mmHg en la posterior al tratamiento, en comparación con el grupo control (GII) al cual no se le administró el medicamento, donde observamos que no hubo incremento significativo en la presión arterial sistólica ($p=0.0147$) ni en la diastólica ($p=0.2397$) (Tabla II). Esto indicó que la cepa CD1 si puede desarrollar hipertensión y puede ser utilizada en nuestro estudio. Bivalacqua y col. (1999) utilizaron ratones CD1 anestesiados para analizar el papel de los receptores AT1 y del sistema nervioso autónomo, en respuesta a la administración de Angiotensina II y norepinefrina, donde pudo obtener elevaciones en la presión arterial y pulso cardíaco en respuesta a esta administración. Lu y col. (2007) mencionan que el ratón cepa C57BL/6 tiene transgenes que expresan tanto angiotensinógeno como renina humana, resultando en un incremento en la presión sanguínea (hasta 23 mmHg). De igual manera comentan que procedimientos quirúrgicos como son la colocación de 1 clip en un riñón, genera un incremento mayor de 60 mmHg en la presión arterial, en el ratón apoE-/- la cual es asociada con estimulación en el sistema renina-angiotensina.

Tabla II. Resultados de prueba para inducir hipertensión en la cepa CD1.

GRUPO	PRESIÓN SISTÓLICA (mmHg)		p*	PRESIÓN DIASTÓLICA (mmHg)		p*
	Antes	Después		Antes	Después	
GI	115.46±4.37	151.11±9.4	0.0000	94.68±5.92	131.15±10.6	0.0000
GII	116.53±3.70	119.43±2.18	0.0147	96.77±4.32	98.64±4.18	0.2397

GI: Grupo de 5 ratones CD1 a los cuales se les administraron vía oral 4 mg de norfenefrina/peso del ratón. GII: Grupo control de 5 ratones sin la administración, Datos son Promedio de 5 mediciones ± DS, * T de student pareada.

Cultivo e Identificación de *Helicobacter pylori*

Se realizó la reactivación de la cepa ATCC 43504 de *H. pylori*, la cual se sembró en el medio agar Brucella, el cual fue suplementado con suero bovino al 10% previamente inactivado con calor, posteriormente se incubó por 15 días en condiciones microaerofílicas. Obteniendo crecimiento lento de colonias pequeñas y transparentes como gotas de rocío, a los 15 días de incubación (Figura 2).

Se preparó el medio para la prueba de ureasa, y debe ponerse especial cuidado en el pH final del mismo, que debe ser 6.8 ± 0.2 . Como mencionó Hernández (2004) el rojo de fenol es un indicador de pH bastante sensible, por lo que si el pH del medio no es el adecuado, no podrá hacerse la interpretación de los resultados. Se utilizó el N,N,N,N-tetrametil dihidrocloruro de p-fenilendiamina para la prueba de oxidasa, el cual debe ser preparado al momento de utilizarse, ya que se oxida rápidamente. El inóculo para esta prueba y para la catalasa debe ser abundante, para que la observación de la reacción sea adecuada. Los resultados obtenidos para esta cepa fueron ureasa, oxidasa y catalasa positiva (Figura 3). Mientras que en la tinción de gram, pudimos observar bacilos curvos gram negativos, con lo cual se identificó totalmente a la bacteria.

Inoculación de Ratones

A partir de la cepa de *H. pylori* 43504 confirmada en agar Brucella, se prepararon los inóculos en caldo Brucella para la infección de los grupos de estudio, los cuales fueron ajustados según la escala de McFarland. Los ratones se mantuvieron en ayuno sin agua ni alimento por 12 horas para permitir una mejor absorción de la suspensión. Las inoculaciones se realizaron por duplicado a los 0 y 7 días para asegurar el establecimiento de la infección, mediante el uso de sonda intragástrica (Figura 4).

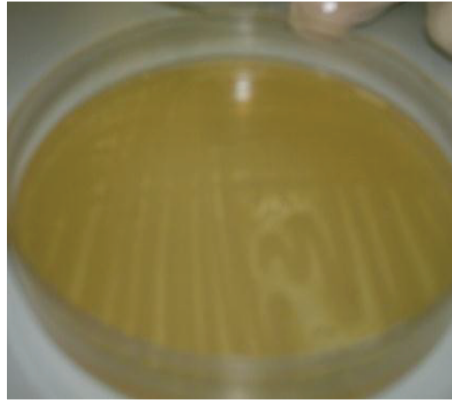


Figura 2. Crecimiento de *H. pylori* en agar Brucella con suero bovino al 10%.

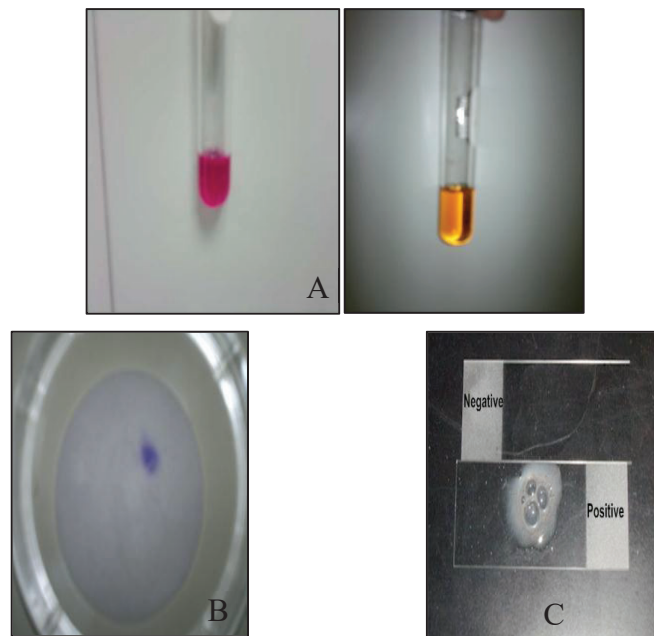


Figura 3. Pruebas bioquímicas de *Helicobacter pylori* **A)** Ureasa, izquierda cepa ATCC 43504, derecha control negativo. **B)** Catalasa, arriba control negativo, abajo cepa ATCC 43504 **C)** Oxidasa, cepa ATCC 43504.



Figura 4. Inoculación de modelo murino con suspensión de *H. pylori*.

Evaluación de la Presión Arterial en Ratones CD1 Infectados por *H. pylori*

Se midió la presión arterial a los grupos control y experimental antes de ser inoculados con caldo Brucella estéril y con *H. pylori* (T=0), respectivamente, obteniéndose los resultados mostrados en la Tablas III y IV. Donde los valores, tanto de la presión sistólica como de la diastólica para ambos grupos, estuvieron dentro de los valores normales obtenidos en la estandarización de la medición al inicio del estudio. Se realizaron pruebas de normalidad con los valores obtenidos, y en base a que nuestros resultados no son semejantes a la curva normal (no paramétricos), se decidió utilizar la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon, la cual se utiliza para comparar dos muestras tomadas de poblaciones independientes. En esta prueba se evaluaron los resultados de las mediciones a T = 0 donde pudimos observar que no hay diferencias significativas en los valores de presión sistólica al comparar los grupos (p= 0.8323) (Tabla V); por el contrario si se observaron diferencias significativas en la presión diastólica (p= 0.0025), esto puede deberse a varios factores individuales como son la edad, el peso, estrés, etc. A los 15 días después de la primera inoculación, encontramos que los valores de presión arterial fueron normales para el grupo control, mientras que el grupo experimental mostró una incremento significativo en ambas presiones de 10-13 mmHg (p=0.0000) al compararse con las mediciones obtenidas, antes de la infección con *H. pylori* (Figura 5 y 6).

Además podemos decir que hay diferencias significativas al comparar ambos grupos (control vs experimental) a los 15 días (p=0.000) (Tabla V). Elevaciones similares se han observado en otros estudios al inducir hipertensión, más no se han reportado elevaciones por efecto de la infección por *H. pylori* en ratones como en el presente estudio. Cholewa y Mattson (2001) describieron un incremento en la presión arterial de 40 ± 3 mmHg al inyectar una dosis única de sustrato de renina sintética en ratones consientes de la cepa C57BL/6J, adicionalmente probaron la influencia de una administración intravenosa sostenida de sustrato de renina sintética donde observaron un

Tabla III. Resultados de presión arterial de grupo control.

TIEMPO (días)	PRESION SISTÓLICA (mmHg)				PRESION DIASTÓLICA (mmHg)			
	M	DS	Min	Max	M	DS	Min	Max
0	117.38	3.79	107.04	125.61	94.12	4.40	79.67	105.33
15	119.50	4.25	110.46	134.41	97.92	3.58	88.95	110.95
30	115.94	3.80	105.08	122.68	96.06	3.28	86.27	102.88
45	117.43	3.22	104.11	121.21	96.25	3.67	74.05	100.20
60	118.79	4.47	101.17	136.85	97.31	5.05	68.91	119.50
75	117.54	3.61	107.4	124.63	97.13	3.15	85.04	104.11
90	116.88	3.57	108.99	122.68	97.69	3.20	90.42	103.37

*promedio de mediciones de 15 ratones

M= media

DS= desviación estándar

Tabla IV. Resultados de presión arterial de grupo experimental.

TIEMPO (días)	PRESIÓN SISTÓLICA (mmHg)				PRESIÓN DIASTÓLICA (mmHg)			
	M	DS	Min	Max	M	DS	Min	Max
0	117.05	4.61	102.15	124.14	96.61	3.78	83.82	106.55
15	130.16	4.56	118.28	139.30	107.52	4.94	97.02	118.52
30	123.83	5.37	112.9	136.36	100.93	4.32	90.66	109.97
45	119.81	3.45	114.37	132.94	98.67	3.43	93.11	111.93
60	120.51	6.14	99.22	148.09	99.12	7.25	69.16	137.1
75	119.72	3.14	112.41	127.57	98.74	4.56	75.76	108.02
90	118.86	8.63	90.91	138.81	98.08	7.59	63.24	115.84

*promedio de mediciones de 15 ratones

M= media

DS= desviación estándar

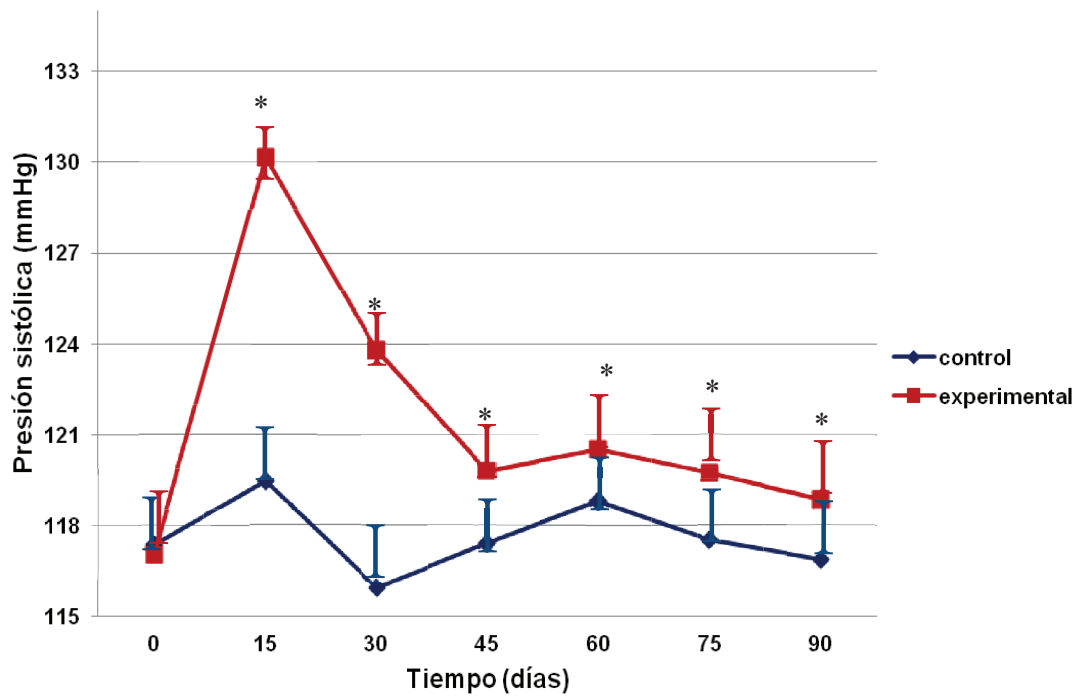


Figura 5. Efecto de la infección por *H. pylori* sobre la presión sistólica. Se muestra Media \pm DS, n=15. *p<0.05. Wilcoxon.

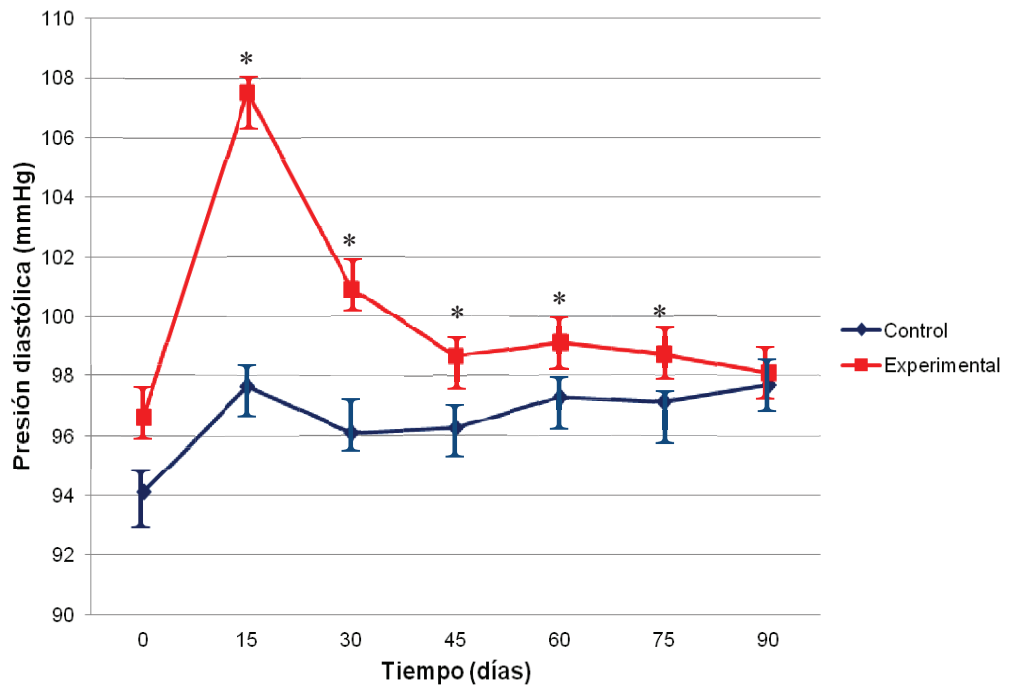
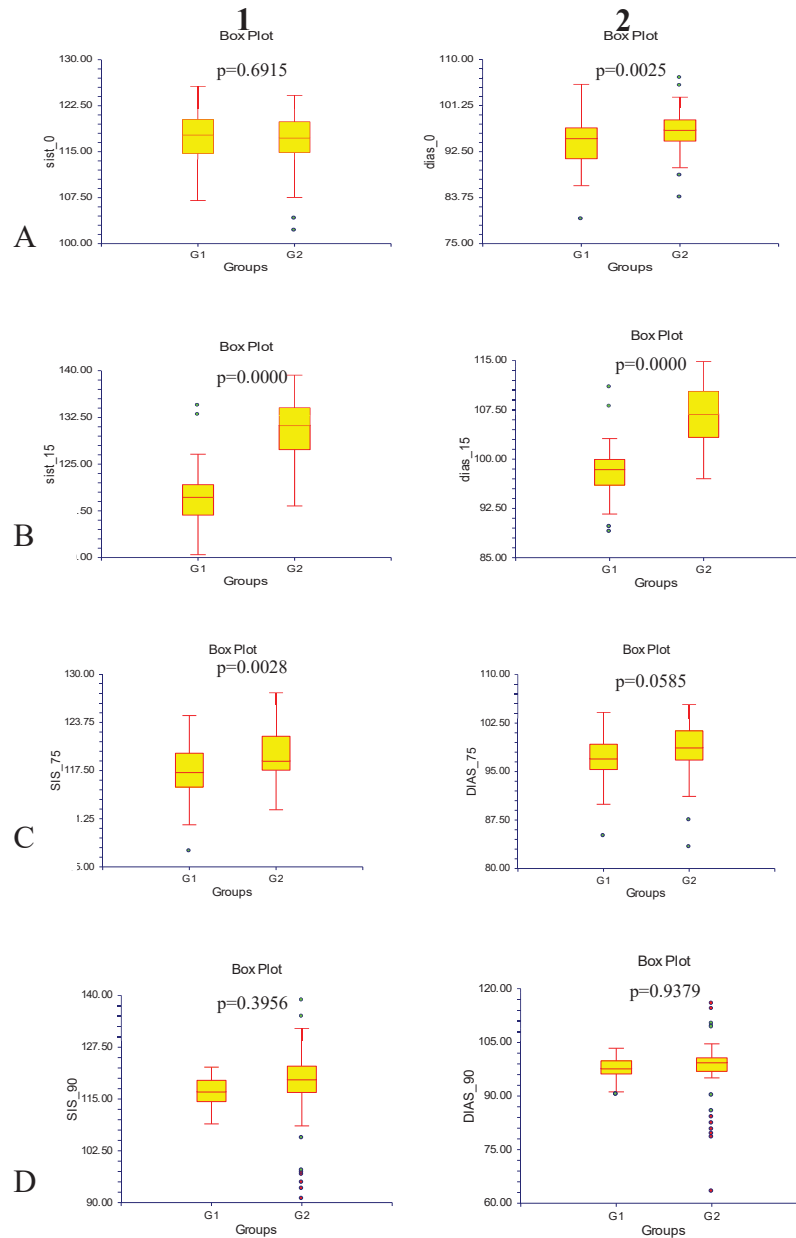


Figura 6. Efecto de la infección por *H pylori*, sobre la presión diastólica. Se muestra Media \pm DS, n=15, *p \leq 0.05. Wilcoxon.

Tabla V. Comparación de presión sistólica y diastólica, entre grupos (G1=grupo control, G2= grupo experimental), en los diferentes tiempos A) T=0 (A1 sistólica, A2 diastólica), B) T=15, C) T=75 y D) T=90. Comparación de medias, mediante prueba Wilcoxon.



incremento significativo en la presión arterial de 119 ± 5 mmHg hasta 129 ± 6 mmHg al administrar el sustrato por 3 días.

La razón por la cual el grupo experimental presentó valores mayores de presión arterial fue la presencia de la bacteria en el epitelio gástrico. Podemos postular que la interacción de la bacteria con las células de la superficie epitelial, puede haber producido liberación de mediadores pro inflamatorias (Bodger y Crabtree, 1998), las cuales fueron liberadas hacia la vasculatura epitelial; este proceso inflamatorio puede haber conducido a la remodelación y engrosamiento de las paredes vasculares y producido así la elevación de la presión arterial en el modelo animal. Las mediciones siguientes para el grupo control se siguieron manteniendo normales hasta los 90 días. Mientras que el grupo experimental mantuvo elevaciones estadísticamente significativas hasta los 75 días en ambas presiones. En cambio a los 90 días, para la presión sistólica aun pudimos obtener diferencias significativas ($p=0.0110$), al contrario de la presión diastólica donde se perdió significancia ($p=0.0596$). Esto nos habla de un comportamiento de adaptación, ya que al finalizar los 90 días, los valores de presión disminuyeron hasta dejar de presentar diferencias con el grupo control (Tabla V).

CONCLUSIONES

Podemos concluir que: 1) El ratón cepa CD1 es susceptible de presentar elevaciones en la presión arterial, 2) al parecer *H. pylori* está relacionado con hipertensión arterial en el modelo animal utilizado, al menos en tiempos cortos y 3) esto puede ser deberse a un efecto de adaptación.

BIBLIOGRAFÍA

- Badyal, D.K., Lata, H., Dadhich, A.P. 2003. Animal models of hypertension and effect of drugs. *Indian J. Pharmacol.* 35:349-62.
- Bivalacqua, T., Dalal, A., Champion, H. Kadowitz, P. 1999. Role of AT1 receptors and autonomic nervous system in mediating acute pressor responses to ANG II in anesthetized mice. *Am. J. Physiol.* 277: E838-E847.
- Blanchard, T.G., Drakes, M.L. Czinn, S.J. 2004. *Helicobacter* infection: Pathogenesis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 20(1): 10-5.
- Bodger, K., Crabtree, J.E. 1998. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. *British Med Bulletin.*54(1):139-150.
- Cava, F. Cobas, G. 2003. Dos décadas de *Helicobacter pylori*. *VacciMonitor.* 12(1); Enero-Marzo 2003: 1-9.
- Cholewa, B.C. Mattson, D.L. 2001. Role of the renin-angiotensin system during alterations of sodium intake in conscious mice. *Am. J. Physiol Regul Interg. Comp Physiol.* 281:r987-R993.
- Encinas, G.D.L. Fonseca, V.G.V. 2008. Criopreservación y viabilidad de cepas de *Helicobacter pylori*. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora.
- Giles, T., Materson, B., Cohn, J., Kostis, J. 2009. Definition and Classification of Hypertension: An update. *The J. of Clinic Hypert.* 11:611-14.
- Goldman, L. Bennett, J.C. 2002. CECIL. Tratado de Medicina Interna. 21ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana. España.
- Goodwin, S. 1997. Detection of *H. pylori* infection by biopsy urease, histology and culture. *Methods Mol Med.* 8:7-18.
- Guo, B. Mekalanus, J. 2002. Rapid genetic analysis of *Helicobacter pylori* gastric mucosal colonization in suckling mice. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 99(12): 8354-359.
- Harrison, D.G., Marvan, P.J., Titze, J.M. 2012. Vascular inflammatory cells in hypertension. *Front in Physiol.* 3:1-8.

- Harvey, R., Donoran, J., Harvey, I., Lane, A., Murray, L. Nair, P. 2001. Effect of *Helicobacter pylori* infection on blood pressure: a community based cross sectional study. *BMJ*. 323:264-65.
- Hernández, G.D.R. 2004. La Vitamina A dietaria y su importancia en la prevención de lesiones gástricas promovidas por la infección con *Helicobacter pylori*. CIAD.
- Hernández, T.M. 2001. *Helicobacter pylori*. La bacteria que más infecta al ser humano. *Rev. Cubana Alim. Nutr.* 15(1): 42-54.
- Kodama, M., Fujioka, T., Murakami, K., Nishizano, A., Okimoto, T. Sato, R. 2005. *Helicobacter pylori*-infected animal models are extremely suitable for the investigation of gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 11(45):7063-71.
- Konturek, P.Ch., Brzozowski, T., Konturek, S.J., Stachura, J., Karczewska, E., Pajdo, R., Ghiara, P., Hahn, E.G. 1999. Mouse model of *Helicobacter pylori* infection: studies of gastric function and ulcer healing. *Aliment Pharmacol Ther.* 13:333-46.
- Kusters, J.G., Kuipers, E.J., Van Vliet, A.H.M. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(3): 449-90.
- Liu, L., Liu, Y., Tong, W., Ye, H., Zhang, X., Cao, W. Zhang, Y. 2007. Pathogen burden in essential hypertension. *Circ J.* 71: 1761-64.
- Lip, G.H., Wise, R., Beevers, G. 1996. Association of *Helicobacter pylori* infection with coronary heart disease. *BMJ.* 312(7025):250-1.
- Lu, H., Cassis, L.A., Daugherty. 2007. Atherosclerosis and arterial blood pressure in mice. *Current Drug Targets.* 8: 1181-89.
- Marais, A., Hazell, S.L., Megraud, F. Mendz, G.L. 1999. Metabolism and Genetics of *Helicobacter pylori*: The Genome Era. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 642-74.
- MacFaddin, J. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana. 3ª edición.

- Marchetti, M., Ario, B., Burroni, D. Figura, N., Rappuoli, R. Ghiara, P. 1995. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science*. 267: 1655-8.
- Migneco, A., Ojetti, V., Specchia, L., Franceschi, F., Candelli, M., Mettimano, M., Montebelli, R., Savi, L. Gasbarrini, G. 2003. Eradication of *Helicobacter pylori* infection improves blood pressure values in patients affected by hypertension. *Helicobacter*. 8(6): 585-9.
- Nozari, Y., Abdollahi, A., Akiash, N. Ebrahimi, D,N. 2009. Association between *Helicobacter pylori* Infection and Atherosclerotic Coronary Artery Disease. *Iranian J. of Path.* 4(1):1-4.
- Pastelín, H.G. Rosas, P.M. 2007. Inflamación e hipertensión arterial. *Archivos de Cardiología de México*. Vol 77(4): 172-74.
- Peek, R. M. Jr. 2008. *Helicobacter pylori* infection and disease: from humans to animal models. *Disease Models & Mechanisms*. 1:50-55.
- Ramírez, R.A. Sánchez. S.R. 2009. *Helicobacter pylori* 25 años después (1983-2008): Epidemiología, Microbiología, Patogenia, Diagnóstico y Tratamiento. *Rev. Gastroenterol. Perú*. 29-2: 158-70.
- Salama, N.R., Falkow, S., Otto, G. Tompkins, L. 2001. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infection and Immunity*. 69: 730-36.
- Sawai, N., Kita, M., Kodama, T., Tanahashi, T., Yamaoka, Y., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Imanishi, J. 1999. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*- induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infect. And Immun.* 67(1):279-85.
- Sesso, H.D., Wang, L., Buring, J.E, Ridker, P.M., Gaziano, J.M. 2007. Comparison of interleukin-6 and C-Reactive Protein for the risk of developing hypertension in women. *Hypertension*. 49:304-10.
- Sugiyama, F., Paigen, B., Yagami, K. 2001. Mouse models of blood pressure regulation and hypertension. *Current Hypert Reports*. 3:41-48.

- Vietinghoff, V.S., Leyk, S. 2010. Interleukin 17 in vascular inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21(6):463-9.
- Whitesall, S.E., Hoff, J.B., Vollmer, A.P., D'Alecy, L.G. 2004. Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods. *Am. J Physiol heart Circ. Physiol.* 286:H2408-H2415.
- Wirth, H.P., Beins, M.H., Blaser, M.J., Tham, K.T., Yang, M. 1998. Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. *Infection and Immunity.* 66(10):4856-66.

ANEXO

Pruebas bioquímicas para la identificación de *H. pylori*.

Ureasa

Para esta prueba se utiliza un caldo con urea, la cual será degradada por la bacteria, ya que es capaz de producir la enzima ureasa. Esta degradación produce amoníaco que hará virar el color del indicador de amarillo a rojo, poniéndose así de manifiesto la actividad de la ureasa. El medio de cultivo para ureasa se preparó según la fórmula descrita por Goodwin (1997), el cual lleva: 60 g/L de urea, 0.012 g/L de rojo de fenol, 2 g/L de KP_2PO_4 , 1 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl y 10 g/L de glucosa. Se esterilizó por filtración en acrodisc de poro 0.2 μm . Se colocaron 3 mL del medio filtrado en un tubo estéril y se refrigeraron hasta su uso. Este caldo puede sembrarse con crecimiento de un medio de cultivo sólido, con asa de aluminio. Se incubó a 37°C durante 5 minutos como mínimo y 120 minutos como máximo; y se observó el desarrollo de la coloración (MacFaddin, 2003).

Catalasa

Se requiere la preparación de una solución de agua oxigenada al 3% v/v y se colocó una gota de la solución con un pipeta Pasteur en un portaobjetos limpio. Posteriormente se tomó una placa de agar *Brucella* con crecimiento de 48 horas y con la ayuda de un aplicador de madera estéril se tomaron una o dos colonias. La porción de cultivo se colocó sobre la gota de agua oxigenada, y se toma como prueba positiva si se observa la producción inmediata de burbujas (liberación de gas) (Encinas y Fonseca, 2008).

Oxidasa

El reactivo de la oxidasa más recomendado es la solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina (Reactivo de Kovacs). Este reactivo le confiere a las

colonias oxidasa positivas un color lavanda, que se oscurece de manera gradual a un púrpura-negruzco, pero también puede impartir color al medio circundante. Para esto se tomó un trozo de papel filtro Whatman no.1 de 6 cm² en una placa de Petri, posteriormente se agregaron 2-3 gotas de reactivo de Kovacs en el centro del papel, y con un aplicador de madera estéril, se colocó una ansada de la colonia de el cultivo de 48 horas de *Helicobacter pylori*. El cultivo se extendió sobre el papel. La reacción positiva ocurre dentro de los 5 a 10 segundos (MacFaddin, 2003).

Tinción Gram

Se realizó una extensión de colonias sobre un portaobjetos con un asa bacteriológica sobre una gota de solución salina, se dejó secar y se fijó sobre la llama de un mechero de Bunsen. Después se procedió a teñir la extensión con el primer colorante, la solución de cristal violeta, durante 1 minuto. Se retiró el exceso de colorante y se aplicó solución de lugol durante 1 minuto. Después se lavó con agua destilada y se decoloró con alcohol acetona de 96° por 30 segundos; se lavó con agua destilada y se aplicó el colorante de contraste safranina durante 1 minuto. Finalmente se lavó con agua, se dejó secar al aire y se observó al microscopio (MacFaddin, 2003).