

Determinación de bombesina en estómago de cerdos con diagnóstico de gastritis provocadas por *Helicobacter spp.*

Lucía Belén Machuca¹, María Agustina De Benedetti¹, María Paula Van Deer Veen¹, María Carolina Grosso¹, Sabrina Giménez¹, Facundo Bonino³, Virginia Mac Loughlin¹.

1- Catedra de Histología, Departamento Anatomía Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

2- Bioestadística, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

Palabras clave

cerdos
gastritis
bombesina
Helicobacter

RESUMEN. El objetivo del estudio fue analizar 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. Fueron coloreadas con Hematoxilina/Eosina para el diagnóstico de gastritis, observándose mayor proporción de lesiones crónicas que agudas. La presencia de *Helicobacter* se realizó mediante tinción Giemsa y Warthin-Starry, determinándose la presencia de al menos dos especies colonizando el estómago del cerdo: una de mayor tamaño, intensamente espiralada (*Helicobacter heilmannii*) y otra de menor tamaño, con forma de "s" itálica (*Helicobacter pylori*). Mediante inmunohistoquímica se localizó *Helicobacter spp* en el epitelio, foseas y glándulas gástricas. La detección de células productoras de bombesina se realizó por técnicas inmunohistoquímicas y se determinó su porcentaje en muestras con gastritis agudas y crónicas, *Helicobacter* (+) / (-). Las células bombesina (+) se localizaron en el epitelio glandular, tejido conectivo subyacente y tejido muscular. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos: Gastritis Crónica *Helicobacter* (+) / Gastritis Aguda *Helicobacter* (+) ($p=0,04$); Gastritis Crónica *Helicobacter* (+) / Mucosa Normal ($p=0,02$) y en Gastritis Crónica *Helicobacter* (-) / Mucosa Normal ($p=0,005$). El grupo con mayor número de células bombesina positivas fue el de Gastritis Aguda *Helicobacter* (+) cuya morfología celular fue de tipo cerrada.

Citar como: Machuca, L., De Benedetti, M.A., Van Deer Ven M.P., Grosso, M.C., Giménez, S., Bonino, F., Mac Loughlin, V. (2019) Determinación de bombesina en estómago de cerdos con diagnóstico de gastritis provocadas por *Helicobacter spp.* Revista Científica FAV-UNRC *Ab Intus* 4 (2): 41-51

Recibido: 07/08/19 Aceptado: 04/12/19

***Autora para correspondencia:** Lucia Machuca, E-mail: lulaa.machuca@gmail.com. Ruta 36 Km 601. Río Cuarto, Córdoba, Argentina, CP 5800, Tel. 0358-4676418

Financiamiento: Este estudio fue financiado por Secretaría de Ciencia y Técnica, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

Bombesin determination in pig's stomach with gastritis diagnose caused by *Helicobacter spp.*

Key words

pigs
gastritis
bombesin
Helicobacter

The objective of this study was to analyze the relationship between *Helicobacter spp* and the functionality of bombesin-producing cells in gastric biopsies of pigs. The presence of *Helicobacter spp* was determined in gastric samples from the antro-pyloric region of mixed-breed pigs. They were colored with Hematoxylin/Eosin for the diagnosis of gastritis, finding a higher proportion of chronic than acute lesions. The presence of *Helicobacter* was carried out by means of Gi-emsas and Warthin-Starry staining, determining the presence of, at least, two species colonizing the stomach of the pig: one of larger size, intensely spiral (*Helicobacter heilmannii*); and another of smaller size, in the form of "s" italic (*Helicobacter pylori*). *Helicobacter spp* was localized in the epithelium, fossa and gastric glands by immunohistochemistry. The detection of bombesin producing cells was performed by immunohistochemical techniques and its percentage was determined in samples with acute and chronic gastritis, *Helicobacter* (+) / (-). These cells were in the glandular epithelium, underlying connective tissue and muscle tissue. Statistically significant difference was observed between the groups: Chronic Gastritis *Helicobacter* (+) / Acute Gastritis *Helicobacter* (+) ($p = 0.04$); Chronic Gastritis *Helicobacter* (+) / Normal Mucosa ($p = 0.02$) and in Chronic Gastritis *Helicobacter* (-) / Normal Mucosa ($p = 0.005$). The group with the highest number of bombesin positive cells was that of Gastritis Acute *Helicobacter* (+), whose cell morphology was closed type.

INTRODUCCIÓN

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 (Atherton y Blaser, 2009).

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 *et al.*, 2008). En 1994, *H. 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 *H. pylori* no desempeñaría necesariamente un papel relevante en la misma. Si bien es sabido que *H. 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* y *H. pylori* en gatos (Gómez *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* (Rodríguez *et al.*, 2009); además, se ha detecta-

do otra bacteria espiralada, ureasa positiva, que se presenta de manera natural en el cerdo, asociada también a la presentación de úlceras gastroesofágicas, razón por la cual se la propuso como un factor posiblemente relacionado con su etiopatogénesis (Queiroz *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2009). Anteriormente, a este microorganismo se lo podía identificar como *H. heilmannii* o *H. suis*, los cuales son considerados como la misma especie (Goodwin *et al.*, 1989; Barbosa *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 2009). En la actualidad, se ha determinado que el *H. heilmannii* puede subclasificarse como *H. heilmannii* tipo I y *H. heilmannii* tipo II. El subtipo I está representado por una sola especie, el *H. 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, una bacteria que desde 2004 ha recibido el nombre provisorio de *Candidatus H. heilmannii*, basado en el análisis de la secuencia genómica de la enzima ureasa y a su dificultad para aislarla *in vitro* (Baele *et al.* 2006; Smet *et al.*, 2012; Bento-Miranda, 2014). Una vez logrado su aislamiento *in vitro*, se reconoció formalmente al *H. heilmannii* como una especie válida (Bento-Miranda, 2014). Más recientemente, se propuso utilizar la terminología *H. heilmannii sensu lato* para denominar a cualquier bacteria del género *Helicobacter* que no haya sido identificada como *H. pylori* y, la denominación *H. heilmannii sensu stricto* cuando el microorganismo haya sido identificado con su respectivos género y especie (Haesebrouck *et al.*, 2011; Bento-Miranda, 2014).

La evaluación histológica en 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, 2014, Mac Loughlin *et al.*, 2015). Algunas investigaciones sugieren que estos microorganismos colonizan el estómago del cerdo o que un mismo género podría asumir patrones morfológicos diferentes por causas inherentes al ambiente gástri-

co del huésped (Makinde *et al.*, 1990; Fox *et al.*, 1997; Rodríguez, 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).

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. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el comportamiento de la hormona gastrointestinal bombesina en estómago de cerdos afectados por gastritis provocadas por *Helicobacter spp.*

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon muestras de estómago de 60 cerdos mestizos de diferentes edades y sexos, provenientes de frigoríficos de la zona de Río Cuarto, Argentina, considerados libres de enfermedad de acuerdo al examen clínico y postmortem realizado. Se procesaron 60 biopsias gástricas de la región antral que fueron lavadas con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco) y fijadas en formol tamponado al 10%. Una vez fijadas fueron sometidas a la técnica histológica convencional; se deshidrataron con baterías de alcoholes de graduación creciente, y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes histológicos de aproximadamente 4 μ m. Parte de los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina para el diagnóstico de gastritis, y con Giemsa y Warthin-Starry para la detección de *Helicobacter spp.* El resto de los cortes se sometieron a estudios inmunohistoquímicos para la identificación de *Helicobacter spp.* y células productoras de

bombesina utilizando anticuerpos comerciales. Para ello se aplicó la técnica indirecta denominada Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) (Paz, 2000; Vissio, 2000; Gimeno *et al.*, 1997). 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).

Una vez realizados los diagnósticos histopatológicos se procedió a dividir 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

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 estas. Para el recuento celular se observó 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. 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).

Este trabajo cuenta con el aval del Comité de Ética de la UNRC. PPI Resolución Rectoral N° 161/16 y 991/17.

RESULTADOS

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*. Se

tomaron como controles negativos muestras con mucosa normal. La tinción de Giemsa nos permitió observar la presencia de estructuras, espiraladas, que se corresponden con lo descrito para *Helicobacter spp.*, las cuales fueron confirmadas mediante las técnicas de Warthin-Starry e inmunohistoquímica.

En la figura 1 a) se puede observar una imagen microscópica de una biopsia gástrica con las características correspondientes a una mucosa normal, en la misma podemos observar un epitelio cilíndrico simple, en la lámina propia encontramos tejido conectivo laxo con glándulas gástricas. La figura 1 b) corresponde a una microfotografía de mucosa gástrica de la región antral con diagnóstico de gastritis aguda, la misma presenta una infiltración leucocitaria preferentemente polimorfonuclear en la lámina propia.

La figura 1 c) corresponde a una muestra gástrica región antral con diagnóstico de gastritis crónica.

En la figura 1 d) observamos a una microfotografía de mucosa gástrica de la región antral coloreada con tinción Giemsa en la cual podemos observar la presencia de bacilos espiralados correspondientes a *Helicobacter spp.*, mientras que en la Figura 1 e) observamos la inmunomarcación de *Helicobacter spp* en una muestra gástrica región antral.

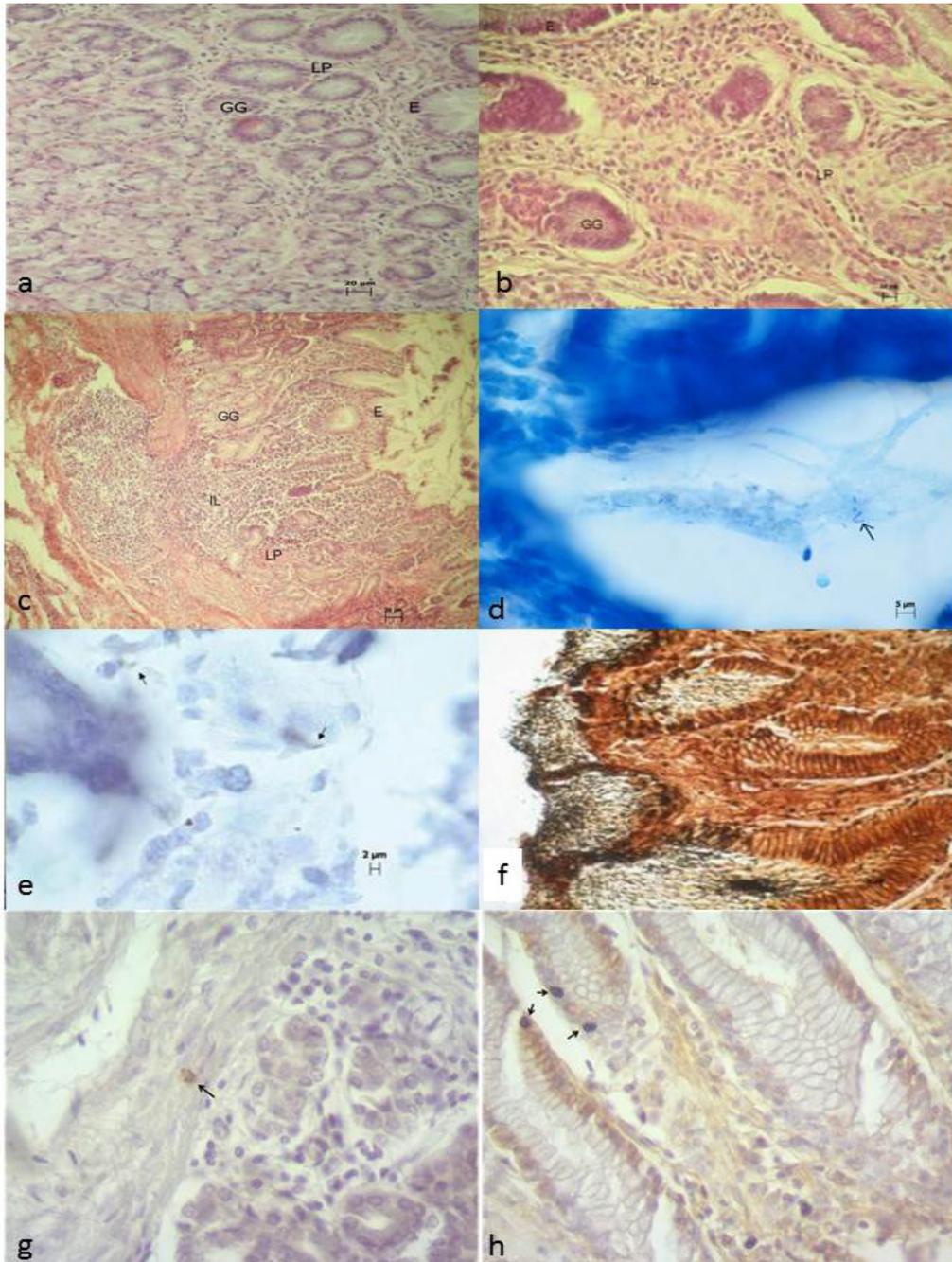
La Figura 1 f) se corresponde a una imagen de microscopía óptica de biopsia gástrica, también de la región antral, coloreada con la tinción de Warthin-Starry en la que se evidencian microorganismos correspondientes a *Helicobacter spp*, tanto en el epitelio superficial como en fosestasgástricas y glándulas gástricas.

La figura 1 g) corresponde a una muestra de mucosa gástrica (región antral) con diagnóstico de gastritis aguda *Helicobacter (+)*, en la que se observa, una célula con inmunomarcación positiva para bombesina. La Fig 1 h) corresponde a una muestra de mucosa gástrica (región antral) con gastritis crónica *Helicobacter (+)*, donde se observa la inmunomarcación positiva para bombesina de células en el epitelio glandular.

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 cier-

ta 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.



Microfotografías de biopsias gástricas de cerdos de la región antral. a) Mucosa normal coloreada con hematoxilina-eosina; b) Gastritis aguda coloreada con hematoxilina-eosina; c) Gastritis crónica coloreada con hematoxilina-eosina; d) Observación de *Helicobacter spp* (flecha) con Giemsa; e) Inmunomarcación de *Helicobacter spp* (flecha); f) Observación de *Helicobacter spp* a través de la tinción de Warthin-Starry; g) Inmunoexpresión de célula bombesina positiva (flecha) en biopsia con diagnóstico de gastritis aguda; h) Inmunoexpresión de célula bombesina positiva (flecha) en biopsia con diagnóstico de gastritis crónica. E: epitelio, GG: glándula gástrica, IL: infiltrado leucocitario, LP: lámina propia. a) 400x; b) y c) 100x; d), e), f), g) y h) 400x.

Al evaluar el porcentaje de células bombesina positivas en los grupos A y B se observó que no existen diferencias significativas ($p= 0,07$). A su vez, en aquellas muestras pertenecientes a los grupos C y D, tampoco se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,87$).

Por otro lado, al comparar biopsias con gastritis agudas y crónicas, *Helicobacter* positivas, correspondientes al grupo A y grupo C respectivamente, los resultados nos confirman que en estos grupos si existen diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,04$). Al evaluar los porcentajes de células bombesina positivas en muestras de gastritis agudas y gastritis crónicas, *Helicobacter* negativas, pertenecientes a los grupos B y D respectivamente, la Prueba T determinó que para este tipo de muestras no existen diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,17$).

Además, al comparar muestras correspondientes al grupo A respecto a las muestras del grupo E, se observó que en el porcentaje de células positivas a bombesina, no existían diferencias estadísticamente significativas ($p=0,11$). Sin embargo, los resultados del análisis de las células productoras de bombesina en muestras del grupo C respecto a las muestras del grupo E, mostraron que sí existen evidencias significativas ($p= 0,02$).

Asimismo, los resultados estadísticos entre muestras pertenecientes al grupo D respecto a las pertenecientes al grupo E demuestran que en el porcentaje de células positivas a bombesina existen diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,005$).

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)	- -	$p=0,005^*$

Tabla 1. Analisis estadísticos: Prueba t % de células productoras de bombesina en muestras gástricas de cerdos.

Por último, en relación a los resultados estadísticos de las muestras correspondientes al grupo B respecto a las muestras del grupo E, se observó que no existen evidencias estadísticamente significativas ($p=0,5$). (Tabla 1).

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 porcentajes más bajos (Fig. 2).

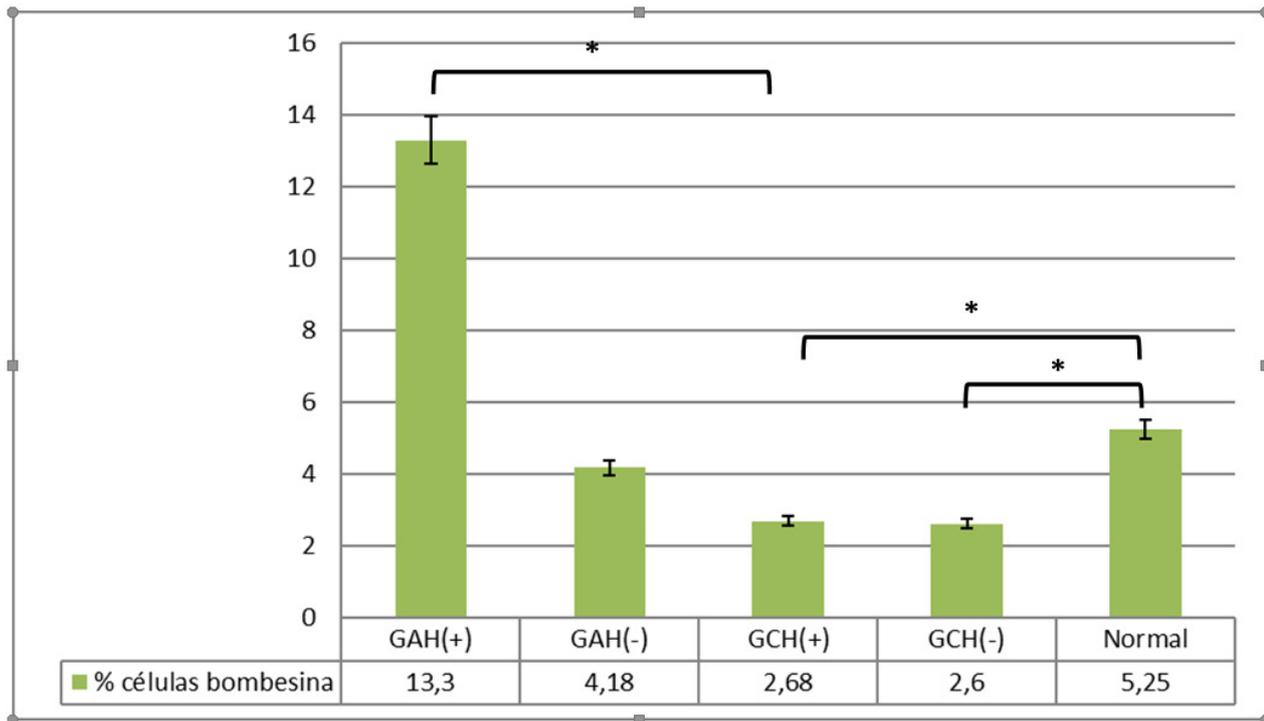


Fig 2. Análisis de los promedios de las células bombesina positivas. Los valores se expresan como el promedio \pm SEM (* $p \leq 0,05$)

DISCUSIÓN

En este estudio pudimos determinar que los resultados histopatológicos son coincidentes con los hallados por otros investigadores dado que se logró determinar la presencia de un infiltrado leucocitario y lesiones compatibles con gastritis aguda y crónica. Dichas lesiones se corroboraron a través de tinciones histológicas convencionales.

Mediante las tinciones histológicas Giemsa y Warthin-Starry se determinó 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). Mediante la segunda técnica 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 corresponden con *H. heilmannii* y *H. pylori* respectivamente, coincidiendo con diversos autores que describen a estas dos especies como patógenos frecuentes del cerdo al igual que *H. felis* (Goodwin *et al.*, 1989; Rodríguez *et al.* 2009; Mac Loughlin *et al.*, 2016).

A través de la técnica de inmunohistoquímica realizamos 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 *Heli-*

cobacter fue en el epitelio, en el interior de las fosetas gástricas y en relación a las glándulas gástricas.

En este estudio se estableció que existen diferencias estadísticamente significativas en relación a la gastritis crónica. Siendo que la región estudiada se corresponde a la región antropilórica, creemos que podría verse afectada en el curso crónico de la enfermedad. Esto se contrapone con la investigación realizada por otros autores en la que encontraron que en la fase crónica de la enfermedad el sitio de colonización más frecuente era la región fúndica (De Witte *et al.*, 2017).

Estudios realizados en diversos modelos animales demostraron que la bombesina a nivel central puede tener un efecto inhibitorio de la secreción ácida, al igual que cuando es suministrada 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). Otros autores 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 (Mac Loughlin *et al.*, 2016). De esta manera, el estímulo de la bombesina sobre las células G productoras de gastrina se haría más evidente ya que estas han perdido 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 crónica 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 la bombesina 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).

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

CONCLUSIONES

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 logramos determinar la presencia de microorganismos altamente espiralados compatibles con *Helicobacter spp.*

Tanto las técnicas de Giemsa, Warthin Starry como la inmunolocalización de *Helicobacter spp.* revelaron 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 crónicas positivas a *Helicobacter spp.*, las mismas se ven afectadas por la acción de este agente causal.

No se observaron evidencias estadísticamente significativas en el número de células productoras de bombesina de las muestras de gastritis aguda con presencia y/o ausencia de *Helicobacter spp.*

En las muestras con gastritis aguda se determinó que la morfología celular predominante fue de tipo cerrada, mientras que, en las muestras con gastritis crónicas, se determinó que la morfología celular más abundante fue de tipo abierta.

REFERENCIAS

- Atherton, J.C; Blaser M.J. (2009). Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest*; 119:2475-2487.
- 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.; Hellems, 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.
- 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.
- De Witte, C.; Devriendt, B.; Flahou, 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>
- Fox, J.; Dangler, C.; Sager, W.; Borkowski, R. y Gliatto, J.(1997). *Helicobacter mustelae* associated gastric adenocarcinoma in ferrets (*Mustelae putorius furo*). *Vet Pathol*; 34:125-129.
- 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, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. La Plata ; p.49-77.
- 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.
- 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.
- 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.
- Liang, J.; Ducatelle, R.; Pasman, 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.

- 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.
- 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.
- Makinde, M. y Obwolo, M.(1990). Abattoir survey of gastric ulcer in pigs in Zimbabwe. *Zimb Vet J*; 21:116-123.
- 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.
- Moreno, R. (2005). La bacteria que destronó al stress. *Diario El país*. España.
- Odrizola, V.(2011). *Helicobacter* gastricos en caninos y felinos. Asociación argentina de medicina Felina.URL: <http://www.aamefe.org/helicobacter.htm>.
- Pacheco Piñol Jiménez, F. y Paniagua Estévez, M. (2006). Neuropéptidos y *Helicobacter pylori* en la gastritis crónica- *Rev cubana med v.45 n.3*.
- Paz, D. (2000). Técnicas Inmunocitoquímicas. En: Guía de Curso de Posgrado. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de Buenos Aires. Buenos Aires , Cap.5:21-23.
- 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. Universidad de Valencia. España, 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.
- Rodriguez, B.; Aranzazu, D. Y Ortiz, L. (2009). Association of gastric ulcer and *Helicobacter spp* in pigs in Antioquia, Colombia. *Rev. Colom Cien. Pecu*a, 22:54-60.
- 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
- Tytgort, G. (1994). Long-term consequences of *Helicobacter pylori* eradication. *Scand J Gastroenterol*, 205: 38-44.

Valdivia Roldán, M. (2011). Gastritis y gastropatías. Rev Gastroenterol. Perú; 31/1: 38-48.

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.

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

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.