

***Helicobacter hepaticus*, un Patógeno Bacteriano Recientemente Reconocido, asociado con Hepatitis Crónica y Neoplasia Hepatocelular en Ratones de Laboratorio**

El carcinoma Gástrico, es uno de los cánceres humanos más frecuentes alrededor del mundo, está entre las neoplasias en que la evidencia epidemiológica de causa ambiental es mayor. La naturaleza exacta de esta causa ambiental era oscura hasta que la evidencia recientemente vinculó a la infección crónica del antrum de la mucosa gástrica por *Helicobacter pylori* (una bacteria microaeróbica, gram-negativa, y espiral) con riesgo elevado de cáncer (1). Se reconoce ahora que el linfoma de B-cell gástricas del tejido linfoide asociado a la mucosa está también estrechamente relacionando a la infección gástrica por *H. pylori*, y la erradicación de la infección con antibióticos puede resultar en la regresión del linfoma (2,3). Este sorprendente hallazgo ha estimulado un intenso interés en el género *Helicobacter* y organismos relacionado; como resultado, especies adicionales de *Helicobacter* son ahora frecuentemente aisladas y caracterizadas desde muchos hospedadores no-humanos. Hasta 1994, sin embargo, sólo era conocido el *H. pylori* como asociado con el desarrollo de tumor, en humanos o en cualquier otra especie animal.

En 1992, en el National Cancer Institute's Frederick Cancer Research and Development Center (FCRDC) en Frederick, Maryland, una prevalencia alta de enfermedad del hígado fue observada entre ciertas cepas de ratones; estos ratones eran controles sin tratar en experimentaciones químicas de carcinogénesis a largo plazo. Las cepas afectadas, notablemente A/JCr, habían sido criadas en el FCRDC bajo condiciones libres de patógenos y estaban libres de virus murinos conocidos serológicamente y parásitos; además, no tuvieron ninguna anomalía hepática histórica demostrable, a excepción de una incidencia muy baja (1% a 2%) de tumores hepatocelulares en ratones de 15 meses de edad o mayores. En un período muy corto, la prevalencia de una histológicamente distintiva forma de hepatitis aumentó a virtualmente 100% en ratones machos de 1 año de edad (Tabla 1). Las lesiones demostrables iniciales fueron pequeños focos hepáticos de necrosis indiferenciadas vistas en ratones jóvenes de edades entre 2 a 6 meses. En ratones más viejos, de edades entre 6 a 10 meses, había una pericolangitis altamente diferenciada, compuesta por abundante infiltrado de células mononucleares alrededor de los conductos biliares dentro de la tríada portal. El epitelio biliar dentro de los conductos afectados estaba focalmente inflamado y la superficie

luminal de células epiteliales dañadas estaban pobremente definidas en secciones teñidas con hematoxilina y eosina (4,5). En hígados con lesiones extensivas, en los conductos biliares (células ovales) era también destacada la hiperplasia. Además, los ratones con hepatitis comúnmente tuvieron tumores hepatocelulares, frecuentemente múltiples, que incluyeron tanto adenomas como carcinomas (4).

Los tumores Hepatocelulares en ratones son uno del más comunes fines en bioensayos para carcinógenos químicos. Entonces, no eran conocidos como asociados con agentes infecciosos. Consiguientemente, los primeros esfuerzos para identificar la causa del síndrome de tumor hepatocelular/hepatitis se dirigieron hacia las posibles fuentes de exposición química. La posibilidad de exposición accidental a sustancias experimentales dentro de las instalaciones animales de investigación se descartó cuando la enfermedad del hígado fue identificada en ratones que nunca habían sido dejados en áreas de cría que se ubican en edificios separados. Los amplios análisis químicos de los alimentos, camas, agua, y otras fuentes posibles de sustancias tóxicas tuvieron resultados negativos.

El examen patológico detallado por microscopía de luz de las secciones de tejido desde hígados enfermos fue continuado, y muchas tinciones especiales fueron usadas. La tinción de Steiner de impregnación de plata para espiroquetas (6), reveló en tejido hepático cuerpos uniformes que eran compatibles en tamaño y forma con bacterias. Homogeneizados de tejido fresco de hígado de ratones enfermos probaron ser efectivos en transmitir la hepatitis a ratones A/J comprado de fuentes comerciales afuera del FCRDC, cuando fueron inoculados por vía intraperitoneal (5). Además, de estos homogenados, una bacteria móvil, espiral podría ser cultivada a partir de la sangre en placas de agar incubadas a 37° C bajo condiciones anaeróbicas o microaeróbicas.

Este organismo fue caracterizado consecutivamente por examen morfológico ultraestructural, características bioquímicas, y secuencia génica 16S rRNA. Determinada como una nueva especie relacionadas al *H. pylori*, se le dio el nombre *H. hepaticus* (7). La bacteria es móvil gram negativa, de 0,2 a 0,3 μm de diámetro, 1,5 a 5,0 μm largo, y en forma curvada espiral, con uno a varios espirales; tiene flagelo bipolar envainado (uno en cada extremo) pero carece las

fibras periplásmicas que envuelven las células bacterianas en otras especies de *Helicobacter* de ratón. *H. hepaticus* tiene una fuerte actividad ureasa, es oxidasa y catalasa positiva, produce H₂S, reduce nitrato a nitrito, y crece microaeróbicamente a 37°C pero no en 25°C o 42°C. es resistente a la cefalotina y al ácido nalidíxico pero es sensible al metronidazole. Las fotografías ilustrando su estructura morfológica por microscopía de luz (4,5) y electrónica (4,5,7) han sido publicadas. Las características definidas de especie del organismo, la secuencia nucleotídica de su gen 16S rRNA, han sido usadas para desarrollar un ensayo diagnóstico con base en la reacción en cadena de la polimerasa (8).

El examen sistemático de roedores de todas las especies y cepas producidas en el FCRDC, especialmente en los reproductores, mostró que la hepatitis característica y asociada a las bacterias estaban presentes en ratones de varias cepas (A/JCr, DBA/2Ncr, C3H/HeNcr) y que dentro de estas cepas, los ratones machos estaban más severamente afectados que las hembras. Los ratones con severas inmunodeficiencias combinadas fueron especialmente vulnerables. La ubicación precisa de los organismos demostrables por la tinción de Steiner dentro del parénquima del hígado infectado mostró por microscopía electrónica de transmisión estar invariablemente extracelularmente y característicamente dentro del canalículo biliar (4,5). Algunas cepas (p. ej., C57BL/6Ncr) no son afectadas por ninguna enfermedad del hígado; tampoco híbridos F1 entre cepas resistentes y sensibles (p. ej., B6C3F1). A excepción de los ratones, otras especies de roedores (p. ej., ratas, Hamster Sirio, y cobayos) no fueron afectados. En ratones infectados con inmunodeficiencias combinadas severas, la inflamación cecal fue histológicamente demostrable (5), y los organismos fueron aislados desde la mucosa del intestino grueso (7), lo que puede significar que el nicho ecológico usual ocupado

por *H. hepaticus* es el de un colonizador comensal del tracto intestinal (8).

Ya que los ratones son coprofágicos, parece altamente probable que la transmisión natural de los organismos es la ruta feco-oral. Por qué y como *H. hepaticus* invade el hígado en ratones de ciertas cepas está por determinarse. La hepatitis es también producida por ciertas otras bacterias patógenas entéricas, tal como *Campylobacter jejuni* (9) que, a diferencia de *H. hepaticus*, no ha sido asociado con el desarrollo de tumor de hígado. El daño de tejido que acompaña la infección persistente por *H. hepaticus*, *H. pylori*, y otras especies de *Helicobacter* pueden ser debida, por lo menos en parte, por una citotoxina soluble tripsina-sensible de peso molecular alto producida por estos organismos (10). No existen precedentes para ningún papel directo de tal toxina en la carcinogénesis. Por otra parte, infecciones crónicas por virus, bacterias, o ciertos parásitos son reconocidos factores de riesgo para cánceres humanos en diversos sitios. Ha sido examinada la hipótesis que sustancias de bajo peso molecular químicamente reactivas, potencialmente genotóxicas (incluyendo óxido nítrico y oxígeno en diferentes formas) generadas por células inflamatorias en el sitio de infección crónica puede iniciar o aumentar la carcinogénesis (11). La hipótesis está bajo investigación activa dentro de un marco de enfermedad del hígado asociada a *H. hepaticus*.

H. hepaticus es susceptible a un número de antibióticos; el tratamiento de cepas de ratones A/JCr susceptibles, naturalmente infectadas de 8-10 semanas de edad con agentes antimicrobianos solos o combinados han sido evaluados para la eficacia en erradicar infecciones establecidas (12). La amoxicilina, metronidazole, y tetraciclinas administradas solas fracasaron en erradicar bacterias del tracto gastrointestinal, pero tanto la combinación de amoxicilina o la tetraciclina, con el metronidazole y bismuto, fueron efectivas en erradicar al *H. hepaticus* del hígado, cie-

Tabla 1. Aumento de la prevalencia de hepatitis y neoplasia hepatocelular en ratones machos control A/JCr en el National Cancer Institute's Frederick Cancer Research and Development Center, 1989-1992(a)

Fecha de muerte	Número de raton	Edad, en semanas	Ratón con hepatitis (%)	Ratón con tumor hepático(%)
Jan-Mar 1989	48	47+or±3	0	0
May-Jul 1989	47	70+or±60	0	1 (2)
Jan-Apr 1992	6	36+or±4	2 (33)	0
Jul 1992	16	54	16 (100)	1 (6)
Aug-Oct 1992	6	64+or±3	5 (83)	3 (50)
Dec 1992	12	77	12 (100)	11 (92)

(a)Adaptado de ref. 4.

go, y colon cuando fue dado por vía oral por un período de 2 semanas (12). El efecto de la terapia antibiótica sobre el proceso carcinogénico, o en animales más viejos, resta por establecerse.

La importancia de *H. hepaticus* en humanos no es aún completamente conocida. El organismo claramente tiene potencialidad de mimetizar bioensayos para carcinógenos químicos, pero esta potencialidad no tiene ningún efecto directo sobre humanos. Si bien la mayoría de las especies de *Helicobacter* identificadas a la fecha están característicamente asociadas con (y nombradas después) especies específicas de hospedadores mamíferos en que ellas generalmente son habitantes del tracto gastrointestinal (causando o no gastritis u otra enfermedad inflamatoria crónica), el rango potencial de hospedadores para algunas especies es bastante amplia. *H. pylori*, originalmente aislada desde humanos, ha sido recientemente aislada también del gato doméstico; esto lleva a la posibilidad que ese *Helicobacter pylori* sea un patógeno zoonótico. Se pueda transmitir de animales de compañía a humanos (13). Explorando la posibilidad de la transmisión zoonótica de *H. pylori*, *H. hepaticus*, o de cualquier otra especie de *Helicobacter* requeriría el aislamiento del organismo en cuestión por métodos de cultivo. Los métodos serológicos no han sido aún refinados al nivel de especificidad de especie. Los humanos infectados con *H. pylori* muestran una respuesta sérica de anticuerpos a las bacterias que son detectadas fácilmente por el enzimo inmuno ensayo y se considera evidencia de enfermedad en proceso (1); los ratones infectados con *H. hepaticus* produjeron en forma similar anticuerpos séricos a aquellas especies que han sido demostradas por Western blotting (5). Los antisueros contra *H. pylori* pueden usarse para visualizar *H. hepaticus* en las tinciones de secciones de tejido de hígado de ratón por procedimiento de inmunohistoquímica con el complejo avidina-biotina (5). La reactividad cruzada entre estas dos especies excluye el uso de métodos serológicos disponibles para establecer si *H. hepaticus* ha infectado a humanos.

Sin considerar si *H. hepaticus* es en sí mismo capaz de infectar humanos, se pudo demostrar que el tejido hepático puede ser persistentemente infectado por lo menos por un miembro del género *Helicobacter*, y el cáncer de

hígado puede ser una consecuencia a largo plazo de tal infección. Este descubrimiento conlleva preguntas acerca de la existencia de una relación comparable entre el cáncer de hígado en humanos e infecciones bacteriológicas no reconocidas. Las revisiones están en marcha a partir de bloques de tejido de los archivos de patología en búsqueda de organismos demostrables por la tinción de Steiner en secciones de hígado de poblaciones humanas en alto riesgo para cáncer hepático.

Jerry M. Rice

Laboratory of Comparative Carcinogenesis,
National Cancer Institute, Frederick, Maryland, USA

Referencias

1. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 1991;325:1127-31.
2. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 1993;342:575-7.
3. Bayerdörffer E, Neubauer A, Rudolph B, Thiede C, Lehn N, Eidt S, et al. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. Lancet 1995;345:1591-4.
4. Ward JM, Fox JG, Anver MR, Haines DC, George CV, Collins MJ Jr, et al. Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. J Natl Cancer Inst 1994;86:1222-7.
5. Ward JM, Anver MR, Haines DC, Benveniste RE. Chronic active hepatitis in mice caused by *Helicobacter hepaticus*. Am J Pathol 1994;145:959-68.
6. Garvey W, Fathi A, Bigelow F. Modified Steiner for the demonstration of spirochetes. J Histotechnology 1985;8:15-7.
7. Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, et al. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. J Clin Microbiol 1994;32:1238-45.
8. Battles JK, Williamson JC, Pike KM, Gorelick PL, Ward JM, Gonda MA. Diagnostic assay for *Helicobacter hepaticus* based on nucleotide sequence of its 16S rRNA gene. 1995;33:1344-7.
9. Kita E, Oku D, Hamuro A, Nishikawa F, Emoto M, Yagyu Y, et al. Hepatotoxic activity of *Campylobacter jejuni*. J Med Microbiol 1990;33:171-82.
10. Taylor NS, Fox JG, Yan L. In-vitro hepatotoxic factor in *Helicobacter hepaticus*, *H. pylori* and other *Helicobacter* species. J Med Microbiol 1995;42:48-52.
11. Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. Mutat Res 1994;305:253-64.
12. Foltz CJ, Fox JG, Yan L, Shames B. Evaluation of antibiotic therapies for eradication of *Helicobacter hepaticus*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1292-4.
13. Handt LK, Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Yan LL, et al. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. Infect Immun 1994;62:2367-74.