

Biomarcadores de **cáncer gástrico**

Alvaro Pazos Moncayo



Editorial
Universidad de Nariño



Editorial
Universidad de Nariño

Biomarcadores de **cáncer gástrico**

Biomarcadores de **cáncer gástrico**

ALVARO PAZOS MONCAYO



Editorial
Universidad de Narino

Pazos Moncayo, Alvaro

Biomarcadores de cáncer gástrico / Alvaro Pazos Moncayo. -1ª. Ed. -- San Juan de Pasto :

Editorial Universidad de Nariño, 2024

164 p : ilustraciones, tablas, fotos

Incluye referencias bibliográficas al final de cada capítulo.

ISBN: 978-628-7679-51-1

1. Cáncer gástrico -- Biomarcadores 2. Helicobacter pylori -- Cáncer gástrico. 3. Helicobacter pylori -- Tratamientos 4. Genotipos--Helicobacter pylori. 5. Helicobacter pylori--aislamiento y pruebas

WI 320 P348b - National Library of medicine
Classification



Sección de Biblioteca
"Alberto Quijano Guerrero"

Biomarcadores de cáncer gástrico

© Editorial Universidad de Nariño

© Alvaro Pazos Moncayo

ISBN: 978-628-7679-51-1

Primera edición

Corrección de estilo: Gonzalo Jiménez Mahecha

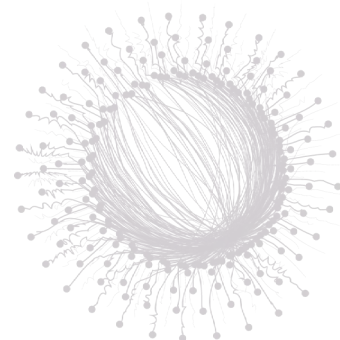
Diseño y diagramación: Nathaly Johana Rivadeneira

Fecha de publicación: abril 8 de 2024

San Juan de Pasto - Nariño - Colombia

Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio o con cualquier propósito, sin la autorización escrita de su Autor o de la Editorial Universidad de Nariño

CONTENIDO



Introducción	12
--------------	----

Capítulo 1. Aislamiento de *Helicobacter pylori* de mucosa gástrica

Introducción	14
1.1 PROCEDIMIENTO DE CAPTACIÓN DE PACIENTES	14
1.2 PROCEDIMIENTO PARA OBTENER CONSENTIMIENTO	15
1.3 PROCEDIMIENTO DE TOMA DE BIOPSIAS POR ENDOSCOPIA	15
1.4 PROTOCOLO PARA LA TOMA DE BIOPSIAS POR ENDOSCOPIA	15
1.5 PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS	16
1.6 SIEMBRA DEL FRAGMENTO DE MUCOSA GÁSTRICA	16
1.7 PURIFICACIÓN DE AISLADOS DE <i>Helicobacter pylori</i>	16
1.8 IDENTIFICACIÓN DE <i>Helicobacter pylori</i>	16
1.8.1 Prueba de oxidasa	16
1.8.2 Prueba de catalasa	17
1.8.3 Prueba de detección de ureasa	17
1.8.4 Tinción de Gram	18
1.8.5 Identificación molecular de <i>Helicobacter pylori</i>	18
1.9 PRESERVACIÓN Y ACTIVACIÓN DE <i>Helicobacter pylori</i>	18
1.10 RESULTADOS CAPÍTULO II. AISLAMIENTO DE <i>Helicobacter pylori</i> DE MUCOSA GÁSTRICA	19
1.10.1 Características sociodemográficas de las poblaciones	19
1.10.2 Aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i>	20
1.10.3 Aislamiento y diagnóstico de <i>Helicobacter pylori</i>	21
1.10.4 Epidemiología de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> y su relación con gastritis crónica	21
1.10.5 Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> . Dos décadas de su estandarización	22
1.11 Conclusiones capítulo 1. Aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i> de mucosa gástrica	23
1.12 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 1	24

Capítulo 2. Biomarcadores de virulencia de *Helicobacter pylori*

Introducción	26
2.1 CITOTOXINA CagA	26
2.2 MOTIVOS DE FOSFORILACIÓN DE TIROSINA: IMPLICACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EPIYA	28
2.3 CITOTOXINA VacA Y SU RELEVANCIA CLÍNICA	29
2.4 DETECCIÓN DE MARCADORES DE VIRULENCIA DE <i>Helicobacter pylori</i>	31
2.4.1 Extracción de ADN de aislados de <i>Helicobacter pylori</i>	31
2.4.2 Genotipificación de marcadores de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i> por PCR	31
2.4.3 Electroforesis para PCR de genes de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i>	32
2.5 RESULTADOS CAPÍTULO 2. BIOMARCADORES DE VIRULENCIA DE <i>Helicobacter pylori</i>	32
2.5.1 Genotipos de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i> según el tipo de gastritis	32
2.5.2 Genotipos de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i> según lugar de procedencia	32
2.5.3 Variabilidad de los factores de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i>	34
2.5.4 Efecto del tratamiento sobre la virulencia de <i>Helicobacter pylori</i>	35
2.5.5 Conclusiones capítulo 2. Biomarcadores de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i>	36
2.6 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 2	37

Capítulo 3. Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*

Introducción	40
3.1 PREVALENCIA DE RESISTENCIA Y MECANISMOS	41
3.2 RELACIÓN DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA	42
3.3 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR <i>Helicobacter pylori</i> Y LESIONES GÁSTRICAS POR HISTOPATOLOGÍA	43
3.4 APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO ANTI <i>Helicobacter pylori</i>	44
3.5 PRUEBA DE ALIENTO CON [¹³ C]-Urea (UBT)	44
3.6 DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIAL DE <i>Helicobacter pylori</i>	44
3.6.1 Validación del inóculo de <i>Helicobacter pylori</i>	44
3.6.2 Determinación de concentración inhibitoria mínima-CIM	45
3.6.3 Criterios de resistencia y sensibilidad de <i>Helicobacter pylori</i>	45
3.7 RESULTADOS CAPÍTULO 3. TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR <i>Helicobacter pylori</i>	45
3.7.1 Validación del inóculo de <i>Helicobacter pylori</i>	45
3.7.2 Eficacia del tratamiento según procedencia y virulencia de <i>Helicobacter pylori</i>	46
3.7.3 Resistencia de <i>Helicobacter pylori</i> a amoxicilina y claritromicina según procedencia, tipo de gastritis y genotipos de virulencia	47
3.7.4 Concordancia de los resultados de susceptibilidad <i>in vitro</i> y la respuesta al tratamiento <i>in vivo</i>	48
3.7.5 Susceptibilidad antimicrobial de <i>Helicobacter pylori</i>	48

3.7.6	Genotipos de virulencia y susceptibilidad antibiótica _____	49
3.7.7	Beneficios y riesgos de la erradicación de <i>Helicobacter pylori</i> _____	50
3.7.8	Conclusiones capítulo 3. Tratamiento de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> _____	51
3.8	BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 3 _____	52

Capítulo 4. Ancestros filogeográficos de *Helicobacter pylori*

	Introducción _____	57
4.1	RELACIONES ANCESTRALES DE <i>Helicobacter pylori</i> _____	57
4.2	TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS MLST DE <i>Helicobacter pylori</i> _____	58
4.3	ORIGEN FILOGEOGRÁFICO DE <i>Helicobacter pylori</i> EN POBLACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO-COLOMBIA _	59
4.3.1	Tipificación por MLST de genes estructurales de <i>Helicobacter pylori</i> _____	60
4.3.2	PCR para genes estructurales de <i>Helicobacter pylori</i> _____	60
4.3.3	Electroforesis para 7 genes estructurales de <i>Helicobacter pylori</i> _____	61
4.3.4	Secuenciación de ADN de genes <i>housekeeping</i> _____	61
4.3.5	Análisis de secuencias multilocus _____	61
4.3.6	Generación del árbol filogeográfico de <i>Helicobacter pylori</i> _____	62
4.4	RESULTADOS CAPÍTULO 4. ANCESTROS FILOGEOGRÁFICOS DE <i>Helicobacter pylori</i> _____	62
4.4.1	Origen ancestral de <i>Helicobacter pylori</i> en poblaciones de Nariño ____	62
4.4.2	Arquitectura del árbol filogeográfico de <i>Helicobacter pylori</i> _____	63
4.4.3	Ancestros filogeográficos de <i>Helicobacter pylori</i> según procedencia, género y tipo de gastritis _____	64
4.4.4	Ancestros filogeográficos según susceptibilidad antibiótica y virulencia de <i>Helicobacter pylori</i> _____	65
4.4.5	Ancestros filogeográficos según gen <i>cagA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> _____	65
4.4.6	Origen ancestral de los aislados de <i>Helicobacter pylori</i> _____	66
4.4.7	Migraciones humanas y la historia evolutiva de <i>Helicobacter pylori</i> _	67
4.4.8	Características de los ancestros filogeográficos _____	68
4.4.9	Conclusiones capítulo 4. Origen filogeográfico de <i>Helicobacter pylori</i> _____	69
4.5	BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 4 _____	71

Capítulo 5. Biomarcadores de susceptibilidad humana a cáncer gástrico

	Introducción _____	74
5.1	RESPUESTA INMUNE A LA INFECCIÓN POR <i>Helicobacter pylori</i> _	75
5.2	POLIMORFISMOS DE CITOCINAS BIOMARCADORES DE RIESGO DE CÁNCER GÁSTRICO EN NARIÑO _____	76
5.3	SINOPSIS METODOLÓGICA PARA LA DETECCIÓN DE BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD HUMANA A CÁNCER GÁSTRICO EN NARIÑO _____	77
5.3.1	Sujetos y muestras _____	78
5.3.2	PROCEDIMIENTOS DE HISTOPATOLOGÍA _____	78
5.3.3	PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR _____	78

5.3.3.1	Determinación de los polimorfismos <i>IL-1B-511</i> , <i>IL-1-RN</i> , <i>IL-10 1082</i> y <i>FNT-A</i> _____	79
5.3.3.2	Detección del polimorfismo <i>-511 C/T</i> del gen <i>IL-1B</i> _____	79
5.3.3.3	Detección del polimorfismo <i>-308 G/A</i> del gen <i>FNT-A</i> _____	79
5.3.3.4	Detección del polimorfismo <i>-1082 G/A</i> del gen <i>IL-10</i> _____	80
5.3.4	PROCEDIMIENTOS GENÓMICOS _____	80
5.3.4.1	Acestros filogeográficos de <i>Helicobacter pylori</i> por MLST-STRUCTURE _____	80
5.3.4.2	Determinación del origen evolutivo humano _____	80
5.3.4.3	Criterios de coevolución y disrupción de la coevolución _____	81
5.4	RESULTADOS CAPÍTULO 5. BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD HUMANA A CÁNCER GÁSTRICO _____	81
5.4.1	Sinopsis de resultados de biomarcadores de susceptibilidad humana a cancer gástrico en Nariño _____	81
5.4.2	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y SOCIOECONÓMICAS _____	82
5.4.3	Detección de los polimorfismos <i>IL-1B-511C/T</i> , <i>IL1-RN*A2</i> , <i>IL-10-1082A/G</i> y <i>FNT-A-308G/A</i> _____	82
5.4.3.1	Genotipiificación del polimorfismo <i>IL1-RN*A2</i> _____	82
5.4.3.2	Detección del polimorfismo <i>IL-1B-511C/T</i> _____	82
5.4.3.3	Detección del polimorfismo <i>IL-10-1082A/G</i> _____	83
5.4.5.4	Detección del polimorfismo <i>FNT- α -308 G/A</i> _____	84
5.4.3.5	Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de citocinas en pacientes de Túquerres _____	84
5.4.3.6	Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de citocinas en pacientes de Tumaco _____	85
5.4.3.7	Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos de citocinas según lugar de procedencia _____	86
5.4.3.8	Equilibrio Hardy-Weinberg (EH-W) _____	86
5.4.3.9	Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de citoquinas según población en riesgo de cáncer gástrico _____	87
5.4.3.10	Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de citoquinas según tipo de lesión gástrica _____	87
5.4.3.11	Ancestría humana y ancestría de <i>Helicobacter pylori</i> en las dos poblaciones de estudio _____	88
5.4.3.12	Asociación de biomarcadores de susceptibilidad a cáncer gástrico y el origen ancestral humano _____	89
5.4.3.13	Asociación de biomarcadores de susceptibilidad humana al cáncer gástrico y el origen filogeográfico de <i>Helicobacter pylori</i> _____	92
5.4.3.14	Coevolución Humano- <i>Helicobacter pylori</i> y biomarcadores de susceptibilidad al cáncer gástrico _____	95
5.4.4	Sinopsis de la discusión de resultados de biomarcadores de susceptibilidad humana a cáncer gástrico _____	96
5.4.5	Conclusiones capítulo 5. Biomarcadores de susceptibilidad humana a cáncer gástrico _____	99
5.5	BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 5 _____	101

Capítulo 6. Biomarcadores evolutivos de cáncer gástrico

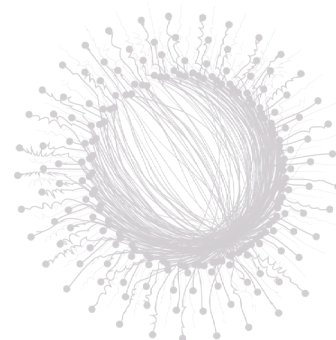
Introducción	106
6.1 EVOLUCIÓN DE <i>Helicobacter pylori</i> Y SU ASOCIACIÓN CON EL CÁNCER GÁSTRICO	107
6.2 COEVOLUCIÓN DEL GENOMA HUMANO Y DE <i>Helicobacter pylori</i> MODULA EL RIESGO DE CÁNCER GÁSTRICO	107
6.3 RELEVANCIA DE LA COEVOLUCIÓN HUMANA Y DE <i>Helicobacter pylori</i>	108
6.4 DETECCIÓN DE BIOMARCADORES EVOLUTIVOS DE CÁNCER GÁSTRICO EN NARIÑO	109
6.4.1 Evaluación de alteraciones histológicas de mucosa gástrica	109
6.4.2 Cultivo, genotipado y tipificación por secuencias multilocus-MLST de <i>Helicobacter pylori</i>	110
6.4.3 Caracterización de la ancestría de <i>Helicobacter pylori</i>	110
6.4.4 Caracterización de la ancestría humana	111
6.4.5 Análisis coevolutivo del genoma humano y de <i>Helicobacter pylori</i>	111
6.5 RESULTADOS CAPÍTULO 6. BIOMARCADORES EVOLUTIVOS DE CÁNCER GÁSTRICO	112
6.5.1 Ancestros humanos y de <i>Helicobacter pylori</i> en la costa y las montañas andinas de Nariño	112
6.5.2 Correlaciones entre ancestría humana y de <i>Helicobacter pylori</i>	113
6.5.3 Ancestría humana asociada a lesiones histopatológicas gástricas	115
6.5.4 Efecto de la coevolución humano- <i>Helicobacter pylori</i> en la severidad de las lesiones gástricas	115
6.5.5 Mezcla de genomas humanos y de <i>Helicobacter pylori</i> postcolonización de las Américas	116
6.5.6 Disrupción de la coevolución humano- <i>Helicobacter pylori</i>	117
6.5.7 Conclusiones capítulo 6. Biomarcadores evolutivos de cáncer gástrico	118
6.6 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 6	119

Capítulo 7. Disbiosis de la microbiota gástrica

Introducción	125
7.1 PERSPECTIVA ECOLÓGICA SOBRE LA CARCINOGENÉISIS GÁSTRICA	127
7.2 DISBIOSIS DE LA MICROBIOTA GÁSTRICA: UN MODELO DE CARCINOGENÉISIS GÁSTRICA	129
7.3 RESULTADOS CAPITULO 7. DISBIOSIS DE LA MICROBIOTA GÁSTRICA	131
7.3.1 Interpretación del modelo de disbiosis en la carcinogénesis gástrica	131
7.3.2 Modelo de disbiosis contrastado con estudios de referencia	133
7.3.3 BIOMARCADORES MICROBIANOS EN EL MODELO DE DISBIOSIS DE LA CARCINOGENÉISIS GÁSTRICA	134
7.3.4 Aplicación del modelo de disbiosis en la carcinogénesis gástrica	135
7.3.5 Conclusiones capítulo 7. disbiosis de la microbiota gástrica	137

7.4	MICROBIOTA SEGÚN TOPOGRAFÍA GÁSTRICA _____	137
7.4.1	Sipnosis técnica para caracterización de las microbiotas según topografía gástrica _____	138
7.4.1.1	Extracción de ADN _____	139
7.4.1.2	Secuenciación del gen <i>16S rRNA</i> y procesamiento de datos _____	139
7.4.1.3	Análisis de la diversidad metagenómica _____	140
7.4.1.4	Accesibilidad de datos _____	140
7.4.2	Resultados de la investigación microbiota según topografía gástrica _	140
7.4.2.1	Análisis de secuencias de la microbiota gástrica _____	140
7.4.2.2	Diversidad metagenómica de la microbiota gástrica según población en riesgo de cáncer gástrico _____	142
7.4.2.3	Diversidad metagenómica según diagnóstico histopatológico y sitio anatómico _____	142
7.4.2.4	Diversidad metagenómica de la microbiota según infección por <i>Helicobacter pylori</i> y sitio anatómico _____	143
7.4.2.5	Análisis comparativo de biopsias de la mucosa gástrica según la composición microbiana _____	143
7.4.3	Sinopsis de la discusión de microbiota según topografía gástrica _____	144
7.4.4	Conclusiones capítulo 7. Microbiota según topografía gástrica _____	149
7.5	BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 7 _____	150
Sobre el autor. Alvaro Pazos-Moncayo, PhD _____		157
Lista de tablas _____		158
Lista de fotos y figuras _____		160

INTRODUCCIÓN



La amplia gama de biomarcadores de cáncer gástrico que se ilustran en el libro recopilan una historia académica de trabajo de investigación de más de 25 años y posibilitan resolver la ausencia de buenos textos sobre la temática en los idiomas castellano e inglés, y que, a la vez, se constituye en material de consulta bibliográfica en los procesos de investigación científica básica y poblacional en las áreas del conocimiento.

Nuestro problema de investigación: Dilucidar las causas del cáncer gástrico en el Departamento de Nariño y la justificación de su estudio para el abordaje de programas de prevención de la enfermedad, se ilustran a continuación.

La presencia de *H. pylori* en el estómago humano se describió por primera vez por los Premios Nobel Robin Warren y Barry Marshall en 1980 y, a partir de 1985, se vinculó etiológicamente la infección con el desarrollo de cáncer gástrico. A pesar de que su papel se asoció inicialmente como el principal agente en la carcinogénesis gástrica, nuevos estudios encontraron que *H. pylori* estaba presente en la mitad de la población mundial, pero tan solo del 1-10% adquirían úlcera duodenal y del 0,1-3% carcinoma gástrico. Por esta razón, la relación de *H. pylori* como un patógeno no es clara y aún existe debate en la comunidad científica sobre el rol del microorganismo en el desarrollo de la enfermedad.

H. pylori es una de las bacterias más ancestrales del ser humano y la evidencia más antigua de la presencia del microbio se encontró en la Momia Ötzi en los Alpes del Este de Italia, cuya antigüedad data de hace 5300 años. Se estima que la colonización por este microorganismo ocurrió desde la especiación y origen del *Homo sapiens* hace 130000 años aproximadamente y lo ha acompañado en sus diferentes rutas migratorias desde el Este de África desde hace 60000 años, lo que ha originado diferentes poblaciones y subpoblaciones de *H. pylori* acordes a las características geográficas y genéticas del hospedero.

Las tasas de incidencia y mortalidad de cáncer gástrico varían alrededor del mundo, al depender de la ubicación geográfica, genética del huésped, y el linaje evolutivo de la bacteria. Para el año 2018, se reportaron 1 millón de casos y 783.000 muertes a causa de esta enfermedad en todo el mundo. Las más altas tasas de incidencia se observaron en las poblaciones del Este de Asia, con alrededor de 40 a 60 casos por cada 100000 habitantes

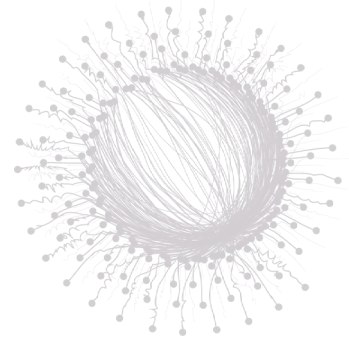
(*H. pylori*: hspEAsia); en el Este de Europa, la incidencia se estima en alrededor de 35 por cada 100000 habitantes (*H. pylori*: hpEurope), y en América Latina, la incidencia varía entre 20 y 30 casos por cada 100000 personas (*H. pylori*: hpEurope). Solamente, en algunos países del África (0,6/100000 habitantes) (*H. pylori*: hspWAfrica y hpAfrica) y Norte América (5 a 6 casos por cada 100000 habitantes) (*H. pylori*: hpEurope), la incidencia es baja.

En Colombia, donde la prevalencia de *H. pylori* es de aproximadamente 90%, la incidencia del cáncer gástrico puede variar geográficamente. Nuestros estudios documentaron que las poblaciones ubicadas en la Región Andina presentan mayor incidencia respecto a los pobladores de las zonas costeras de Colombia. Por ejemplo, en el Departamento de Nariño, la incidencia de cáncer gástrico es alta en la Región Andina (Túquerres y Juanambú con 150/100000, y Pasto con 46/100000 habitantes), mientras que, en la Costa Pacífica y Atlántica de Colombia, la incidencia es relativamente baja (Tumaco: 6/100000 habitantes y Cartagena: 2/100000 habitantes respectivamente), por lo cual queda planteada una pregunta, que el lector del libro se va a formular y, al avanzar en la lectura de los capítulos, cómo se puede resolver : Si *H. pylori* es el principal factor de desarrollo de cáncer gástrico, ¿por qué existen estas diferencias en las tasas de incidencia en Colombia?

Por tanto, nuestras hipótesis de trabajo postulan que es importante divulgar los avances de investigación básica y epidemiológica que nos permitieron determinar biomarcadores de virulencia y de patogenicidad de *H. pylori* y los de susceptibilidad humana a cáncer gástrico y que igual, bajo el uso de las ciencias ómicas o genómicas, los biomarcadores ancestrales y evolutivos *H. pylori*-humanos se pueden aplicar en el perfilamiento de pacientes de Nariño con alto riesgo de cáncer gástrico y su adecuado tratamiento de prevención de la enfermedad.

CAPÍTULO 1.

Aislamiento de *Helicobacter pylori* de mucosa gástrica



INTRODUCCIÓN

La documentación del aislamiento e identificación del oncopatógeno *H. pylori* de mucosa gástrica humana le permiten al lector tener un referente respecto a cómo superar las dificultades del cultivo *in vitro* del microorganismo que, en mi experiencia, es el más “fastidioso” en cuanto a su manejo-conservación y activación en el laboratorio. Otro aspecto relevante de los contenidos del Capítulo posibilita formar escuela o semillero de investigadores de alto nivel, para que, en un futuro, la información no quedase como literatura gris, entre otros los manuales de procedimientos, en particular los del trabajo de campo y el aislamiento de *H. pylori* que se han construido y se han estandarizado durante más de 15 años.

1.1 PROCEDIMIENTO DE CAPTACIÓN DE PACIENTES

Para captar los pacientes con síntomas de dispepsia y posterior toma de biopsias de mucosa gástrica, se diseñaron dos manuales de procedimientos disponibles en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Grupo de Investigación Salud Pública de la Universidad de Nariño. El objetivo de esta actividad fue incluir 203 pacientes de Tumaco y 206 de Túquerres, de ambos géneros, de 18 a 65 años de edad, entre junio de 2008 y diciembre de 2009. Las instituciones destinadas para este fin fueron: el Hospital San Andrés de Tumaco y Hospital San José de Túquerres. Se apoyó esta actividad con dos enfermeras entrenadas para la captación y el diligenciamiento de la encuesta y del consentimiento informado y con recursos físicos, como textos de divulgación radial, televisión y carteleras, materiales de presentación del estudio, encuesta y el calendario del trabajo de campo. Antes de captar a los adultos, anuncios sobre el estudio se situaron en las áreas estratégicas de los hospitales, para explicar el propósito del estudio, los requisitos para ser elegible, y lo solicitado a los pacientes que se incluyeron en el estudio. Para lograr una mayor captación, se realizó divulgación por cadena radial y televisión; visitas a los gerentes y directores de las EPS y Centros de Salud locales; carteleras, que invitaban a difundir, remitir y participar en el estudio y asistir a una reunión general, con indicación de fecha, hora, y lugar, con el fin de dar a conocer el estudio y resolver dudas al respecto.

1.2 PROCEDIMIENTO PARA OBTENER CONSENTIMIENTO

El objetivo de esta actividad fue la obtención del consentimiento. Al inicio del estudio, a los participantes se les explicó en qué consiste el formato de consentimiento. Una enfermera entrenada y el coordinador del trabajo de campo aplicaron los procedimientos para obtener consentimiento.

1.3 PROCEDIMIENTO DE TOMA DE BIOPSIAS POR ENDOSCOPIA

Las endoscopias las realizó un médico gastroenterólogo del Grupo de Investigación. Sin embargo, la coordinación y la presencia física en el desarrollo en todas las fases del trabajo de campo estuvieron a cargo del investigador principal del proyecto: AJPM.

Para una adecuada toma y manejo de muestras, se diseñaron protocolos, que se encuentran disponibles en los manuales de procedimientos del Laboratorio de Microbiología Molecular del Grupo de Investigación Salud Pública de la Universidad de Nariño.

1.4 PROTOCOLO PARA LA TOMA DE BIOPSIAS POR ENDOSCOPIA

De cada paciente, se tomaron diez (10) biopsias de mucosa gástrica, de acuerdo con el siguiente protocolo: Dos muestras de curvatura menor y mayor de antro y dos de curvatura menor y mayor de cuerpo se recolectaron en tioglicolato con glicerol al 20% y se utilizaron para el aislamiento primario de *H. pylori*, PCR de marcadores de virulencia, CIM y MLST de *H. pylori*. Cuatro muestras, dos de antro y dos de cuerpo, se recolectaron en formol al 10% y se emplearon en los análisis histopatológicos; una muestra de pared anterior media de cuerpo y otra de curvatura menor de antro se recolectaron en tioglicolato con glicerol al 20% para preservación a -70°C . Figura 1

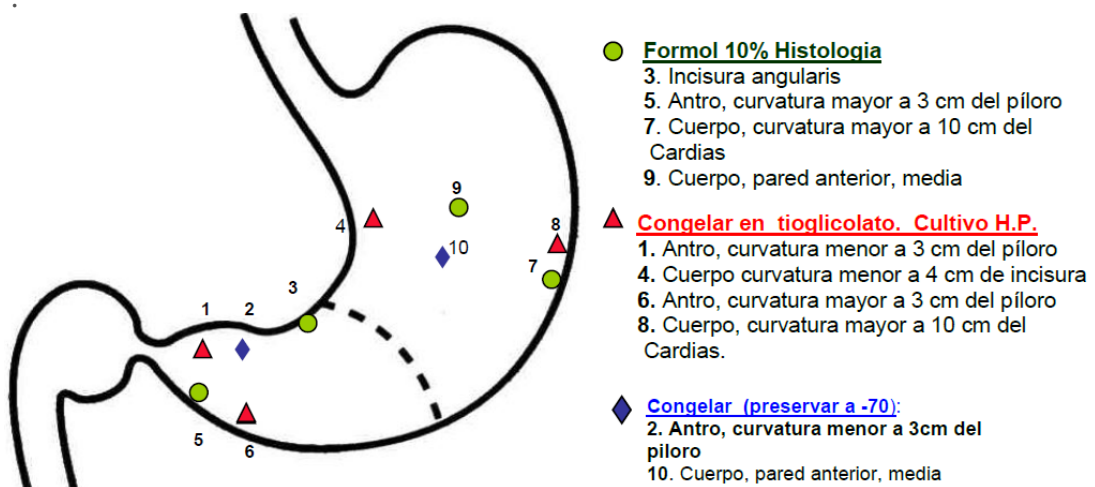


Figura 1. Topografía de los sitios anatómicos de toma de biopsias gástricas

Las biopsias Nos. 3, 5, 7 y 9, destinadas para el estudio histopatológico, se marcaron con ●. Las biopsias Nos. 1, 4, 6, y 8, destinadas para el aislamiento de *H. pylori*, PCR de marcadores de virulencia, CIM y MLST se marcaron con ▲. Las biopsias Nos. 2 y 10, preservadas a -70°C se marcaron con ◆

1.5 PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS

Se utilizaron cuatro fragmentos de mucosa gástrica para el aislamiento primario de *H. pylori*, determinación de la CIM y extracción de ADN. Inicialmente, se trabajó con la biopsia No. 1, de la curvatura menor de antro; en los casos en que no hubo crecimiento o fue muy escaso, se utilizó la biopsia No. 6 de la curvatura mayor de antro para un nuevo intento de aislamiento de *H. pylori*. Si la situación persistía, se intentó el aislamiento con la biopsia No. 8 de cuerpo gástrico.

1.6 SIEMBRA DEL FRAGMENTO DE MUCOSA GÁSTRICA

La biopsia No. 1 se colocó en un ependorff de 1.5 ml estéril; con una pipeta automática (Brand®) se agregaron 200 µl de solución salina estéril al 0,89% de NaCl y con un microbollo estéril y un rotor (Pellet Pestle-Kontes®) se maceró hasta homogenizar completamente el tejido.

El macerado se sembró con asa de argolla (Fisherbrand®) calibrada a 10µl/gota, por estría, en agar Columbia (oxoid®) con sangre desfibrinada de cordero al 10%, más suplemento Dent (oxoid®), que contiene vancomicina, cefsulodin, lactato de trimetoprim y anfotericina B. Luego de la siembra, se preservó el macerado en una solución de tioglicolato (Merk®) con glicerol (Promega®) al 20% y se congeló en un freezer a -70 °C (1).

La incubación de las cajas de Petri se realizó en una incubadora de CO₂ (Shel Lab®) a 37 °C, con atmósfera de CO₂ al 10% y 90% de humedad. El crecimiento se verificó a las 72 horas y luego evaluaciones periódicas de 7 a 10 días (1, 2), en busca de colonias translúcidas, pequeñas y en forma de gotas de rocío, compatibles con *H. pylori*. Se evaluó la calidad del crecimiento y la contaminación por hongos o bacterias, tanto en el aislamiento primario como en el antibiograma.

1.7 PURIFICACIÓN DE AISLADOS DE *Helicobacter pylori*

Colonias compatibles con *H. pylori* se transfirieron a un agar columbia con sangre de cordero al 10%, sin suplemento Dent, por agotamiento, para lograr cultivos axénicos antes del proceso de identificación y antibiograma. Se incubó y se verificó el crecimiento en condiciones iguales a las descritas anteriormente (1).

1.8 IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter pylori*

A nivel macroscópico, se identificaron colonias pequeñas, translúcidas, a modo de gotas de rocío (1), a las que se les realizaron las siguientes pruebas de identificación:

1.8.1 Prueba de oxidasa

Se extendió con asa de argolla un inóculo de *H. pylori* sobre una tira de oxidasa (Oxoid®). Se consideró la prueba positiva cuando la tira se tornó de color violeta al cabo de 5 a 10 s. Foto 1.

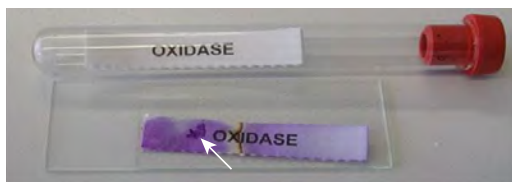


Foto 1. Prueba de oxidasa para *Helicobacter pylori*

La flecha indica la formación de un complejo púrpura como resultado positivo para actividad oxidasa. Las bacterias que contienen la enzima catalizan la oxidación de la N, N, dimetil-p-fenilendiamina a azul de indofenol en presencia de oxígeno (3). Fuente: Esta investigación.

1.8.2 Prueba de catalasa

Se emulsionaron colonias del cultivo en un portaobjetos con dos gotas de peróxido de hidrógeno al 10% (Carlo Erba®). La presencia de burbujas indicó una reacción positiva para catalasa. Foto 2.

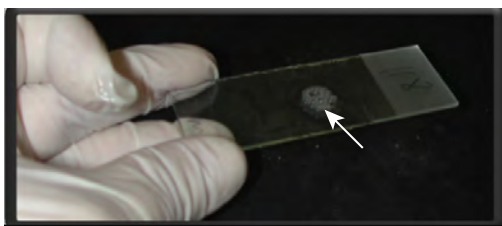


Foto 2. Prueba de catalasa para *Helicobacter pylori*

Se observa la formación de burbujas (Flecha), por acción de la enzima catalasa sobre el peróxido de hidrógeno. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (3). Fuente: Esta investigación.

1.8.3 Prueba de detección de ureasa

De un cultivo de *H. pylori*, se tomó una colonia con asa de transferencia y se inoculó a un tubo Nunc con 1 ml de solución de urea (Promega®) al 10% con rojo de fenol (Carlo Erba®), como indicador de pH. La prueba es positiva si hay un cambio de color amarillo a fucsia y es negativa si el color no varía. Los resultados se pueden observar en la Foto 3.



Foto 3. Prueba de detección de ureasa de *Helicobacter pylori*

Se observa el cambio de coloración de amarillo a fucsia del rojo fenol, generado por la alcalinización del medio, como resultado de la hidrólisis de la urea por la enzima ureasa para convertirla en amonio y dióxido de carbono. (3, 4). Fuente: Esta investigación.

1.8.4 Tinción de Gram

En un portaobjetos, se realizó un frotis de colonias de *H. pylori* en agua destilada con posterior fijación al calor. Se utilizó un protocolo estándar de coloración de Gram. Los frotis se observaron en un microscopio (Olympus®) con objetivo 100X. Foto 4. Las fotos evidencian los resultados de identificación de cada aislado, que se almacenaron en el formato de cultivo.

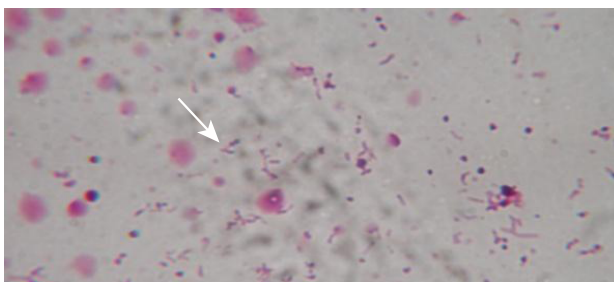


Foto 4. Gram de un aislado de *Helicobacter pylori*

Se observan bacilos Gram negativos, pleomórficos (Flecha), en forma de ese o de bastón curvado, compatibles con la morfología de *H. pylori* (5, 6). Fuente: Esta investigación.

1.8.5 Identificación molecular de *Helicobacter pylori*

La presencia del gen estructural *ureA* de *H. pylori* se detectó por PCR. Las condiciones de amplificación de la PCR y la detección de un amplificado de 167 pb, se explican en el Capítulo III. Foto 5.



Foto 5. Patrón electroforético de productos de amplificación por PCR del gen estructural *ureA* de *Helicobacter pylori*

Se observa la presencia de bandas de 167 pb para los amplicones correspondientes a las muestras marcadas en la parte superior de cada carril. Los carriles 090 y C- corresponden al control positivo (ATCC 51932) y negativo (agua destilada), respectivamente. Fuente: Esta investigación.

1.9 PRESERVACIÓN Y ACTIVACIÓN DE *Helicobacter pylori*

Con el propósito de preservar los aislados de *H. pylori*, se tomaron colonias con asa de argolla de las cajas de Petri con agar sangre sin suplemento, para transferirse a un tubo con 800 μ l de caldo de tioglicolato (BBL®) más 200 μ l de glicerol (Promega®); se homogenizó y se almacenó a -70°C (3, 7).

La activación se efectuó desde un preservado criogénico con una lanceta estéril; se tomó una fracción del contenido del tubo en el menor tiempo posible para evitar el choque térmico. La fracción se depositó en agar columbia con sangre desfibrinada de cordero al 10% sin suplemento. Se sembró en masa y se incubó en la forma descrita previamente. El contenido restante se almacenó a -70°C (5, 6, 7).

1.10 RESULTADOS CAPÍTULO II. AISLAMIENTO DE *Helicobacter pylori* DE MUCOSA GÁSTRICA

1.10.1 Características sociodemográficas de las poblaciones

Tabla 1. Características demográficas según procedencia

Característica	Tumaco		Túquerres	
	n (203)	%	n (206)	%
Género				
Masculino	59	29,1	91	44,2
Femenino	144	70,9	115	55,8
Edad				
19-35	69	34,0	75	36,4
36-47	62	30,5	70	34,0
48-68	72	35,5	61	29,6
Hacinamiento				
≤ 3 persona/cuarto	154	75,9	162	78,6
> 3 persona/cuarto	47	23,2	44	21,4
Sin dato	2	1,0	0	0,0

Tabla 2. Exposición y antecedentes según procedencia

Característica	Tumaco		Túquerres	
	n (203)	%	n (206)	%
Fumó anteriormente				
Sí	134	66,0	162	78,6
No	68	33,5	44	21,4
Sin dato	1	0,5	0	0,0
Fuma ahora				
Sí	179	88,2	185	89,8
No	23	11,3	19	9,2
Sin dato	1	0,5	2	1,0
Adiciona sal				
Siempre	2	1,0	21	10,2
Casi siempre	3	1,5	2	1,0
Algunas veces	29	14,3	84	40,8
Nunca	167	82,3	97	47,1
Sin dato	2	1,0	2	1,0
Algún pariente sufre CG				
Sí	19	9,4	51	24,8
No	178	87,7	149	72,3
No sabe	6	3,0	6	2,9

Se incluyeron 203 pacientes de Tumaco, de los cuales 70,9% era mujeres con edades comprendidas entre 19 y 68 años; 23,2% de la población vivía en situación de hacinamiento. El 88,2% manifestó fumar tabaco y el 82,3% que no adiciona sal a los alimentos. Se encontró que 9,4% de los pacientes tiene un pariente con cáncer gástrico o tuvo cáncer gástrico. Tablas 1 y 2. Participaron 206 pacientes de Túquerres, de los cuales 55,8% era mujeres, con edades comprendidas entre 19 y 68 años. El 21,4% de la población se encontraba en situación de hacinamiento. El 89,8% manifiesta fumar tabaco. Se encontró que 47,1% no adiciona sal a los alimentos. El 24,8% refiere tener un pariente que tuvo o tiene cáncer gástrico. Otros parámetros, como el tipo de vivienda y origen del agua, no mostraron diferencias según población de estudio. Tablas 1 y 2.

1.10.2 Aislamiento de *Helicobacter pylori*

Tabla 3. Frecuencia de detección de *Helicobacter pylori* según método diagnóstico y sitio anatómico de obtención de la biopsia de mucosa gástrica

Característica	Cultivo				Histología			
	n	Frecuencia %	Acumulado %	P	n	Frecuencia %	Acumulado %	P
Procedencia								
Tumaco	203							
Biopsia de antro								
Curvatura menor	98	48,3	48,3	0,002	177	87,2	87,2	0,52
Curvatura mayor	36	17,7	66,0		172	84,7	87,7	
Biopsia de cuerpo								
Biopsia de cuerpo	38	18,7	84,7		179	88,1	88,7	
Total	172		84,7		180		88,7	
Túquerres	206							
Biopsia de antro								
Curvatura menor	94	45,6	45,6	0,001	175	85,0	85,0	0,56
Curvatura mayor	21	10,2	55,8		171	83,0	85,0	
Biopsia de cuerpo								
Biopsia de cuerpo	34	16,5	72,3		174	84,5	85,4	
Total	149		72,3		176		85,4	

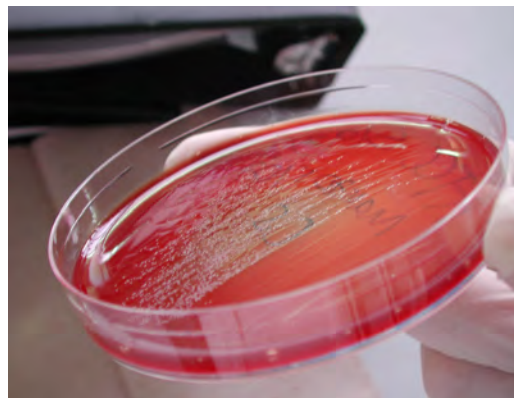


Foto 6. Cultivo de *Helicobacter pylori* en agar sangre de cordero

Cultivo a partir de biopsia de curvatura menor de antro gástrico de un paciente de Tumaco. Se observan colonias translúcidas, pequeñas y en forma de gotas de rocío, compatibles con *H. pylori*. Fuente: Esta investigación.

Se obtuvieron en total 321 aislados de *H. pylori* de 172 pacientes de Tumaco y 149 de Túquerres. Foto 6. Las pruebas de identificación fueron positivas para oxidasa, catalasa y ureasa. Fotos 1, 2 y 3. La tinción de Gram confirmó para cada uno de los aislados su morfología y la detección por PCR de un fragmento de 167 pb del gen estructural *ureA* su identificación molecular. Fotos 4 y 5.

1.10.3 Aislamiento y diagnóstico de *Helicobacter pylori*

De 203 pacientes de Tumaco, en 172 (84,7%) se obtuvo cultivo positivo para *H. pylori*, y de 206 de Túquerres, en 149 (72,3%) fueron positivos para el bacilo; sin embargo, la prevalencia de la infección por histopatología fue mayor en Tumaco (88,7%) que en Túquerres (85,4%), sin considerarse estas diferencias estadísticamente significativas, $P > 0,05$. Tabla 3.

La frecuencia de cultivos positivos para *H. pylori* de Tumaco y Túquerres fue mayor de curvatura menor del antro (48,3 y 45,6%) que de curvatura mayor del antro (17,7 y 10,2%) y que de cuerpo gástrico (18,7 y 16,5%) respectivamente, concordante con otros estudios (8, 9, 10). Tabla 3.

Es importante destacar que hubo independencia en el diagnóstico histológico de *H. pylori* con respecto al número de biopsias y sitio anatómico de la biopsia gástrica, $P > 0,05$, situación que no se observó al detectar *H. pylori* mediante cultivo, pues se precisó que el método diagnóstico de la infección por cultivo mejoró significativamente al cultivar más de una biopsia gástrica de diferentes porciones anatómicas, con incremento de su frecuencia de aislamiento de 48,3 a 84,7% ($P = 0,002$) en Tumaco y de 45,6 a 72,3% ($P = 0,001$) en Túquerres, al sembrar una y tres biopsias, respectivamente. Tabla 3. Estos hallazgos referentes a mayor colonización de *H. pylori* en curvatura menor de antro que en cualquier sitio topográfico de la mucosa gástrica son coincidentes con resultados de otras investigaciones (8, 9).

1.10.4 Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori* y su relación con gastritis crónica

Este estudio encontró que la prevalencia de la infección por *H. pylori* fue alta y similar en Tumaco y Túquerres $P = 0,33$, más alta en hombres que en mujeres (88,7 y 86,1%), sin ser esta diferencia estadísticamente significativa $P = 0,46$. Se observó asociación entre la infección y la edad de los pacientes, que fue más prevalente en pacientes entre los 19 a 35 años (92,4%), que en los rangos de edades 36-47 años, 88,6% y de 48-68 años, 79,7% $P = 0,006$. Tabla 4.

La infección por *H. pylori* en Tumaco fue más común en pacientes con gastritis atrófica multifocal y metaplasia intestinal (95,2 y 93,1%) que en pacientes con gastritis no atrófica (86,8%). Sin embargo, se observó que la infección por *H. pylori* en Túquerres fue más frecuente en pacientes con gastritis atrófica multifocal y metaplasia intestinal (100 y 86,8%) que en pacientes con gastritis no atrófica (84,8%), sin ser estas diferencias estadísticamente significativas. Tabla 5. No se observaron diferencias entre el tipo de gastritis y la prevalencia de infección por *H. pylori* en los pacientes de las dos

poblaciones. Se observó que la infección es independiente del género, origen del agua, tipo de drenaje y tabaquismo.

Tabla 4. Características sociodemográficas según infección por *Helicobacter pylori*

Característica	Estrato	n	<i>H. pylori</i> (+)		<i>H. pylori</i> (-)		O.R.	I.C. 95%		P
			n	%	n	%				
Género										
	Masculino	150	133	88,7	17	11,3	.	.	.	0,46
	Femenino	259	223	86,1	36	13,9	0,79	0,42	1,46	
Edad										
	19-35	144	133	92,4	11	7,6	.	.	.	0,006
	36-47	132	117	88,6	15	11,3	0,64	0,28	1,46	
	48-68	133	106	79,7	27	20,3	0,32	0,15	0,68	
Procedencia										
	Tumaco	203	180	88,7	23	11,3	.	.	.	0,33
	Túquerres	206	176	85,4	30	14,6	0,75	0,41	1,34	

Tabla 5. Tumaco-Túquerres. Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* según tipo de gastritis

Tipo de gastritis	Prevalencia <i>H. pylori</i>						Prevalencia <i>H. pylori</i>		P
	n		Tumaco		n		Túquerres		
			n	%			n	%	
No atrófica	152	74,9	132	86,8	164	79,6	139	84,8	0,63
Atrófica multifocal	21	10,3	20	95,2	4	1,9	4	100,0	0,64
Metaplasia intestinal	29	14,3	27	93,1	38	18,5	33	86,8	0,42
Total	203*		180	88,7	206	176	85,4	0,35	

* Un caso fue no evaluable para tipo de gastritis.

La Tabla 5 muestra que la gastritis no atrófica fue más frecuente para las dos poblaciones, con una prevalencia de 74,9 y 79,6% para Tumaco y Túquerres, respectivamente. La prevalencia de la gastritis atrófica multifocal fue más alta en Tumaco (10,3%) que en Túquerres (1,9%); en contraste, la prevalencia de metaplasia intestinal fue más alta en Túquerres (18,5%) que en Tumaco (14,3%).

1.10.5 Cultivo de *Helicobacter pylori*. Dos décadas de su estandarización

Sin duda, el aislamiento mediante cultivo de *H. pylori* es el método más específico en el diagnóstico del microorganismo; sin embargo, requiere de particulares condiciones y de largo tiempo de experimentación para el logro de su aislamiento exitoso. La sensibilidad del cultivo varía notablemente en relación con diferentes variables, como la toma de muestra, el transporte y almacenamiento de la biopsia, los medios de cultivo utilizados y las condiciones de incubación. *H. pylori* es una bacteria difícil de cultivar y el método para su aislamiento es tedioso e incluso complejo de realizar, pero aporta ventajas en el estudio de la bacteria (11). Entre ellas, se destaca el conocimiento de la susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos, la caracterización de factores de virulencia y la posibilidad del filogenotipificado de cepas con fines epidemiológicos. Al tomar en cuenta que la sensibilidad del método diagnóstico

de la infección por cultivo es baja, 50% aproximadamente (12), en este estudio se obtuvo alta frecuencia de cultivo positivo para las dos poblaciones estudiadas; sin embargo, la prevalencia de la infección se evaluó por el método histológico (tinción de Giemsa modificada) ya que la sensibilidad y especificidad del método histológico es alta, de aproximadamente 90% (12).

1.11 Conclusiones capítulo 1. Aislamiento de *Helicobacter pylori* de mucosa gástrica

La detección de *H. pylori* con el método histológico fue independiente del sitio anatómico donde se obtuvo la biopsia de mucosa gástrica y del número de fragmentos estudiados. En contraste, el diagnóstico de *H. pylori* mediante cultivo fue dependiente del número de biopsias y sitio anatómico evaluado. La proporción de aislamiento de *H. pylori* con un fragmento de mucosa procesado fue 48,3 y 45,6% y con tres 84,7 y 72,3% de pacientes de Tumaco y Túquerres respectivamente. Al coincidir con estudios previos, se observó mayor frecuencia de aislamiento en los fragmentos de mucosa gástrica obtenidos en la curvatura menor de antro (8, 10). Se concluyó que la prevalencia de la infección diagnosticada por cultivo e histopatología es alta en las dos poblaciones y que la bacteria coloniza diferentes sitios anatómicos de la mucosa gástrica, como lo reportan estudios anteriores (8, 9, 10).

En esta investigación, la prevalencia de la infección fue alta y similar en las dos poblaciones: 88,7% en Tumaco y 85,4% en Túquerres (Tabla 3), enmarcada en el rango (70-90%) publicado por la Organización Mundial de Gastroenterología (WGO 2011) (13), como México 90%, Brasil 82%, Chile 72%, Japón 70%, Egipto 90%, Libia 94%, y superior a las prevalencias observadas en países desarrollados, USA 30%, Canadá 7%, Australia 20%, Holanda 1,2% y Suiza 11,9%.

García y col. (1989), y Correa y col. (1989) encontraron una prevalencia de *H. pylori* de 85,5% y 93% en pacientes adultos de la ciudad de Pasto (9); sin embargo, luego de varios años, Bravo y col. (2003) encontraron una prevalencia de 79,5% y 73,9% para Tumaco y Pasto respectivamente (14, 15, 16). Al comparar las prevalencias encontradas en este trabajo con las reportadas en los dos estudios anteriores, se observa que se mantienen altas; es probable que el incremento de uso de antibióticos para tratar otras infecciones induce resistencia, dificulta su erradicación y se refleja en el incremento de la prevalencia de *H. pylori* en las zonas de estudio.

La prevalencia de la infección por *H. pylori* fue más alta en hombres que en mujeres (89 y 86%), sin ser esta diferencia significativa ($P = 0,46$). Se observó asociación entre la infección y la edad de los pacientes, más prevalente en pacientes entre los 19-35 años (92%), que en los rangos de edades 36-47 (89%) y 48-68 (80%) (Tabla 4), contrario a lo observado en otras investigaciones (17), que refieren que la infección se incrementa en el género femenino y en la edad adulta (13); en la actual investigación, la infección disminuye con la edad. Es posible que los programas de intervención marquen esta diferencia en los adultos. La infección por *H. pylori* fue más común en pacientes con gastritis atrófica con y sin metaplasia (93 y 95%) que en pacientes con gastritis no atrófica (87%) de Tumaco. También se observó que la infección por *H. pylori* fue más frecuente en pacientes con gastritis atrófica con y sin metaplasia (87 y 100%) que en pacientes con gastritis no atrófica (85%) de Túquerres. Estas diferencias no fueron significativas.

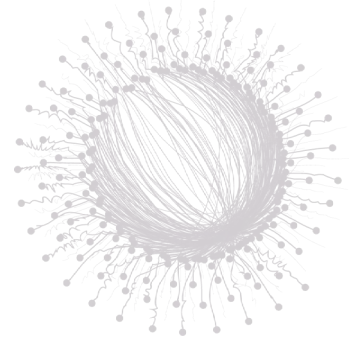
1.12 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 1

1. Pruszkowski J, Ziolkowski G, Gonciarz Z, Besser P. Isolation of *Helicobacter pylori* from gastric mucosa depending on the growth medium used. *Med Dosw Mikrobiol.* 1994;46(4):305-11. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7603132/>
2. Azevedo NF, Pacheco AP, Keevil CW, Vieira MJ. Nutrient shock and incubation atmosphere influence recovery of culturable *Helicobacter pylori* from water. *Applied and Environmental Microbiology.* 2004 Jan;70(1):490-3. doi: 10.1128/AEM.70.1.490-493.2004
3. Gottschalk G. *Bacterial Metabolism.* 2nd ed. New York: Springer – Verlag; 1986. p 359. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1072-6>
4. Dunn B, Campbell G, Perez-Perez G, Blaser M. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 1990 Jun;265(16):9464-9. Disponible en: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)38872-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)38872-6/pdf)
5. Sneath P, Holt J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 8th ed. Vol. 2. Baltimore (USA): Williams and Wilkins Co; 1993. Disponible en: <https://www.worldcat.org/es/title/718899412>
6. Blaser JM. *Helicobacter pylori.* *Princ and Pract. Inf Dis.* 1991;9:3-9. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00028-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00028-6)
7. Pazos A, Montes A, Santacruz A, Sañudo J. Efecto in vitro de *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*. *Universidad y Salud.* 2003 Ago 29;1(4):5-12. Disponible en: <https://revistas.udenar.edu.co/index.php/usalud/article/view/302/pdf>
8. Castro M, Vargas J. Infection with *Helicobacter pylori*. Prevalence, research and impact of antibiotic resistance. *Rev Esp Enferm Dig.* 2009 Nov;101(11):743-56. doi:10.4321/s1130-01082009001100001
9. Bravo LE, Cortés A, Carrascal E, Jaramillo R, García LS, Bravo PE, et al. *Helicobacter pylori: Patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia.* *Colomb Med.* 2003;34(3):124-31. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=28334303>
10. Glupczynski Y. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. En *Helicobacter pylori: retos para el siglo XXI.* Microbiología, clínica y tratamiento. Manuel López-Brea (editor). Prous Science, Barcelona 1999, pp. 41-54. doi: 10.1128/jcm.33.10.2752-2756.1995.
11. Ndip RN, MacKay WG, Farthing MJ, Weaver LT. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003 May;36(5):616-22. doi: 10.1097/00005176-200305000-00005
12. Makristathis A, Hirschl AM, Lehours P, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2004 Aug;9(1):7-14. doi: 10.1111/j.1083-4389.2004.00254.x
13. Hunt R.H, Xiao SD, Megraud F, Leon-Barua R, Bazzoli F, van der Merwe S, et al. *Helicobacter Pylori in developing countries.* World Gastroenterology Organisation Global Guideline. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2011 Sep;20(3):299-304. doi: 10.1097/MCG.0b013e31820fb8f6
14. Goodman KJ, Correa P. The transmisión of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. *Int J Epidemiol.* 1995 Oct;24(5):875-87. doi: 10.1093/ije/24.5.875

15. Goodman KJ, Correa P, Tengana HJ, Delany JP, Collazos T. Nutritional factors and *Helicobacter pylori* infection in Colombian children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997 Nov;25(5):507-15. doi: 10.1097/00005176-199711000-00004
16. Bravo LE, Doorn LJ, Realpe JL, Correa P. Virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori*: Do they explain the african enigma? *Am J Gastroenterol.* 2002 Nov;97(11):2839-42. doi: 10.1111/j.1572-0241.2002.07031.x
17. Graham DY, Rimbara E. Understanding and appreciating sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Gastroenterol.* 2011 Apr;45(4):309-13. doi: 10.1097/MCG.0b013e31820ac05e

CAPÍTULO 2.

Biomarcadores de virulencia de *Helicobacter pylori*



INTRODUCCIÓN

La infección por cepas virulentas de *H. pylori* es uno de los factores de riesgo más importante para el desarrollo de lesiones precursoras de cáncer gástrico y carcinoma gástrico. Factores de virulencia de *H. pylori* (1, 2) y la presencia del gen *cagA* y del alelo s1/m1 del gen *vacA*, se relacionan con procesos patológicos graves, como la úlcera péptica, y con alta incidencia de cáncer gástrico (3, 4). Se documenta que cepas de *H. pylori* que poseen el islote de patogenicidad PAI-*cag*, un segmento de 40kb dentro del cromosoma que codifica proteínas de patogenicidad y para un sistema de secreción tipo IV involucrados en la translocación de la citotoxina CagA en las células epiteliales (5, 6), se consideran virulentas y están asociadas con úlcera péptica y cáncer gástrico (7, 8). Se observan marcadas diferencias en la virulencia de las cepas prevalentes en diferentes regiones del mundo (9) y se asocia su presencia con variabilidad en el riesgo de cáncer gástrico. Resulta de interés científico caracterizar los posibles factores involucrados y su interacción, en particular para aquellos que puedan ser objeto de intervención.

Este estudio tuvo como objetivo determinar la variabilidad genética de los aislados de *H. pylori* de acuerdo a los factores de virulencia *cagA* y *vacA*, según: tipo de gastritis, lugar de procedencia y respuesta al tratamiento antimicrobial. El estudio incluyó 409 pacientes, de ambos géneros, con síntomas de dispepsia, entre los 18 y 65 años de edad. Se obtuvieron por endoscopia fragmentos de mucosa gástrica, para el aislamiento primario de *H. pylori* en un medio selectivo con identificación de los genes de virulencia *cagA* y *vacA* alelos s y m, según protocolos estandarizados en trabajos previos (2, 10-12). Las alteraciones histopatológicas se graduaron de acuerdo a la escala visual análoga descrita por Dixon (13).

2.1 CITOTOXINA CagA

H. pylori se conoce por su diversidad genética inter e intrapoblacional; adicionalmente, los genes *cagA* y *vacA* son polimórficos y representan implicación clínica dependiente de las cepas que infectan una población en particular (6, 8).

Un factor importante de virulencia es la presencia del gen *cagA*, que codifica la proteína asociada a citotoxicidad CagA (5). El locus del gen *cagA* es un marcador importante de la

isla de patogenicidad PAI-*cag*, un segmento de 40kb dentro del cromosoma del *H. pylori* que codifica proteínas que aumentan la virulencia de las cepas y para un sistema de secreción tipo IV involucrados en la translocación de la proteína CagA a las células epiteliales (5, 6).

El gen *cagA* se encuentra solo en el 50 y 60% de las cepas de *H. pylori* aisladas de países occidentales y en más del 90% de los aislados de los países de Asia Oriental, y es el resultado de la adquisición de ADN de otras bacterias (6). La infección con *H. pylori cagA (+)* se asocia con eventos clínicos severos, daño inflamatorio, aumento en el riesgo de cáncer gástrico y úlcera duodenal (5, 6, 14). El gen *cagA* se localiza en el extremo 3' de PAI-*cag* y tiene un tamaño molecular entre 120 y 140 pb. Las cepas de *H. pylori* que poseen la PAI-*cag* se consideran virulentas y se asocian a úlcera péptica y cáncer gástrico respecto a cepas que no poseen este genotipo (7).

La capacidad inmunogénica de CagA se demostró en estudios en los que se detectaron niveles elevados de anticuerpos IgG contra CagA en suero de pacientes con úlcera duodenal, úlcera gástrica y dispepsia no ulcerosa (15), por lo que se propone el gen *cagA* como un marcador de virulencia (1). En un estudio efectuado en pacientes colombianos y portugueses, se observó asociación entre genotipos *cagA (+)* y atrofia, metaplasia intestinal y daño epitelial (16). Las infecciones con cepas que carecen de la expresión de esta proteína se asocian con patologías menos graves. En contraste, estudios adelantados en poblaciones de Japón, Corea y China reportan que más del 90% de las cepas son *cagA (+)*, independientemente del estadio clínico de los pacientes (17).

El locus del gen *cagA* es un marcador importante del PAI-*cag*. La organización de PAI-*cag* se muestra en la Figura 1.

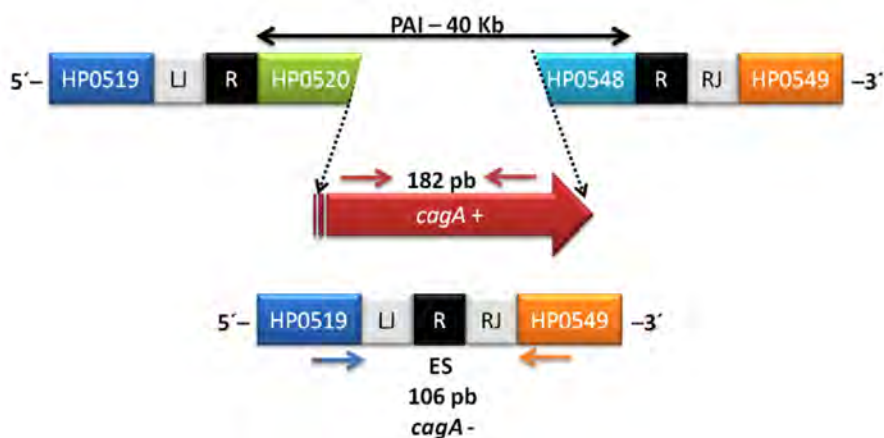


Figura 1. Organización del PAI-*cag* en cepas *cagA (+)* de *Helicobacter pylori*

En la parte superior de la Figura, al PAI-*cag* lo flanquean dos secuencias repetidas R, solo una de las cuales está presente en cepas *cagA (-)*. HP0519 codifica para proteínas de función desconocida; en la región HP0549 está el gen de la glutamato racemasa (*glr*); entre las regiones HP0520 y HP0548 están los genes de la isla de patogenicidad. En la parte inferior de la Figura, la organización del segmento vacío (*Empty site*) ES de cepas *cagA (-)*. Fuente: Adaptado de Tesis de Doctorado Alvaro Pazos M, et al. Universidad del Valle, Vanderbilt University

La ausencia o pérdida del islote PAI-*cag* se demuestra por la detección positiva del marcador *cagA* (-). Al marcador *cagA* (-) es posible detectarlo por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El amplicón de 106 pb, producto de la PCR para *cagA* (-), se describió como el segmento vacío (*Empty site*) y utiliza como cebadores de la PCR las secuencias homólogas complementarias a los sitios de inserción (LJ y RJ). La amplificación de este segmento explica la ausencia de amplificación de la totalidad de la isla de patogenicidad PAI-*cag* en cepas *cagA* (-) (11). Otro gen que se encuentra en el PAI-*cag* es *cagE*, que forma parte de un sistema de secreción tipo IV, una jeringa molecular que sirve para inyectar la proteína CagA dentro de las células epiteliales. Este gen es necesario para la inducción de IL-8 y muestra correlación positiva entre la presencia de cepas de *H. pylori cagE* (+) y úlcera duodenal (18).

2.2 MOTIVOS DE FOSFORILACIÓN DE TIROSINA: IMPLICACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EPIYA

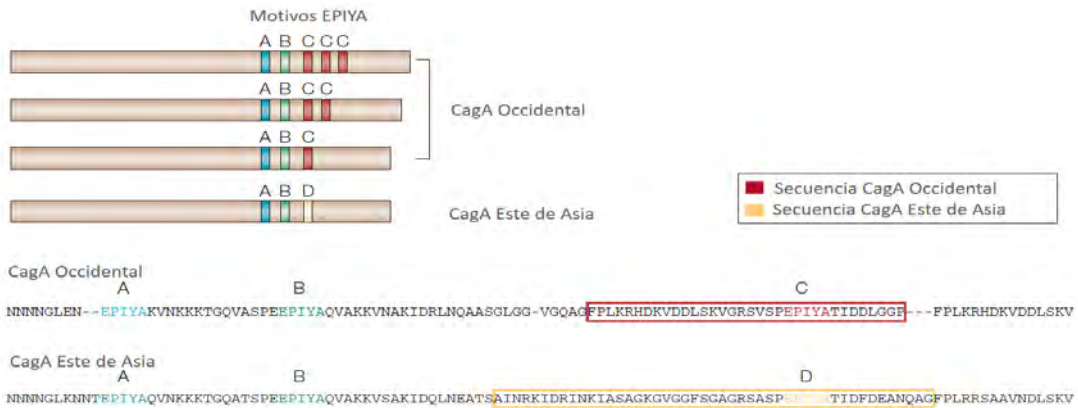


Figura 2. Tipos y número de motivos EPIYA de CagA de *Helicobacter pylori*

La fosforilación de la tirosina de CagA mediada por la oncoproteína Src quinasa se produce en el motivo EPIYA. Hay cuatro tipos de motivos: EPIYA-A, -B, -C y -D, que se diferencian en la secuencia de aminoácidos que flanquean el motivo EPIYA. Los motivos presentes en CagA de cepas, aisladas en países occidentales, poseen EPIYA-A, EPIYA-B, y una o más copias de una secuencia de 34 aminoácidos en el motivo EPIYA-C, (cuadros rojos). *H. pylori* aislado de los países de Asia oriental expresa una forma de CagA en la que se sustituye el motivo EPIYA-C por el motivo EPIYA-D (cuadros amarillos). Fuente: Adaptado de Tesis de Doctorado, Alvaro Pazos M, Universidad del Valle.

La citotoxina CagA es altamente polimórfica; su variabilidad se observa en la secuencia de aminoácidos de la región carboxilo terminal. Estas secuencias contienen cuatro tipos de motivos de fosforilación de tirosina: EPIYA-A, -B, -C o -D, determinados según las diferencias en las secuencias que flanquean los cinco aminoácidos del EPIYA: Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (19). Los motivos son monoméricos o multiméricos; esto es, presencia de una o más copias de un mismo motivo en CagA (20). El número de motivos EPIYA-C se asocia con lesiones precancerosas y cáncer gástrico (19, 20). Experimentos efectuados por Higashi y col. (2005) demostraron que CagA se transloca a la membrana de la células del epitelio gástrico, donde, bajo una serie de eventos mediados por fosfoquinasas y tirosinquinatas, se fosforila el residuo de tirosina que forma parte de los

cinco aminoácidos (EPIYA), activa factores que alteran la señalización celular, induce la formación de “células colibrí” o causa disrupción de las células del epitelio gástrico (21). Las regiones repetidas de los motivos EPIYA de CagA son divergentes entre poblaciones de *H. pylori*. Los tipos y número de motivos EPIYA se ilustran en la Figura 2.

Atherton JC y col. (2009) reportó que los motivos EPIYA-C se fosforilan en mayor medida dentro de la célula epitelial, causan efectos celulares severos y se asocian a daño epitelial y a cáncer gástrico (8). Las cepas de *H. pylori* aisladas de los países del oriente de Asia poseen un EPIYA-D y, al parecer, la actividad enzimática asociada a la fosfotirosina 2 (SHP-2) produce efectos celulares marcados, atrofia gástrica, inflamación severa y cáncer gástrico, lo que explica en parte la prevalencia de *H. pylori* asociado a la enfermedad gástrica observada en Japón y China (6, 8).

Un estudio, en Colombia, encontró que el 64% de las citotoxinas CagA tenían una copia de los motivos C, 34,3% dos y 1,5% tres motivos EPIYA-C, todos con CagA característico de países occidentales. Las cepas con un solo motivo EPIYA-C se asociaron a lesiones gástricas menos severas (gastritis no atrófica y gastritis atrófica multifocal), en comparación con las cepas con múltiples motivos C, que se asociaron a lesiones más avanzadas, como metaplasia intestinal y displasia (20).

2.3 CITOTOXINA VacA Y SU RELEVANCIA CLÍNICA

Todas las cepas de *H. pylori* poseen el gen *vacA*, que codifica una citotoxina de 87 kDa, que induce la vacuolización de las células epiteliales y se asocia con virulencia (23). Entre el 50 a 65% de las cepas produce la proteína citotóxica (24). Esta exotoxina se adapta perfectamente al ambiente ácido del estómago y es resistente a la degradación por pepsinas (8).

El gen constitutivo *vacA* es de copia única en el cromosoma de *H. pylori* y su locus está fuera de la isla de patogenicidad (25). La citotoxina VacA es polimórfica; se compone de una secuencia señal “S” y una región media “M”, que presentan variantes alélicas (26).

Con base en las secuencias y la identidad de nucleótidos de la región media del gen *vacA*, se clasifican las cepas en dos familias de alelos: alelo tipo m1 (cepas con actividad citotóxica) y alelo tipo m2 (cepas sin actividad citotóxica). Se estableció que, dentro de una secuencia de un fragmento de 0,5 kb, que corresponde a la región de la secuencia “S”, existen diferencias que permitieron clasificar a las bacterias en cuatro familias de alelos: s1a, s1b, s1c y s2 (2).

Un alelo polimórfico tipo “i” identifica a la región intermedia, ubicada entre la secuencia “S” y la región media “M” del gen. Dos tipos de región “i” se identificaron: I1 e I2; es curioso que solo las cepas con los alelos s1/m1 o s2/m2 son de modo exclusivo I1 e I2, respectivamente. Las cepas tipo I1 se asocian con adenocarcinoma gástrico. Este estudio evidenció que la región “i” es un determinante importante de la toxicidad de *H. pylori* y posiblemente el mejor marcador independiente de *vacA* asociado a patogenicidad (27).

Atherton y col. (1995) caracterizó al gen *vacA* de varias cepas de *H. pylori*, aisladas de pacientes asintomáticos, con úlcera péptica y gastritis. La amplificación por PCR de la secuencia señal y la región media presentó cepas en mosaicos alélicos o genotipos s1a/m1, s1a/m2, s1b/m1, s1b/m2 y s2/m2; además, no se encontraron cepas con el genotipo s2/m1 (2). Estudios *in vitro* sobre la actividad citotóxica clasificaron a *H. pylori* en cepas con actividad citotóxica alta, media y nula y la asociaron con el genotipo de *vacA*, con reporte referido a que las cepas con genotipo s1a/m1 presentaban mayor actividad citotóxica, en comparación a las cepas con genotipo s1b/m1, s1a/m2 y s1b/m2, que presentaron una actividad media, mientras las cepas s2/m2 no presentaban actividad citotóxica. Los mismos autores observaron que las cepas s1a/m1 se aislaban con mayor frecuencia de pacientes con úlcera péptica y que las cepas s1b/m1 se encontraban principalmente en muestras de pacientes con gastritis, mientras que las cepas s2/m2 se aislaban con mayor frecuencia en pacientes asintomáticos (28). Se encontró que cepas tipo s1 se aíslan con mayor frecuencia en pacientes con úlcera duodenal; pacientes con cepas s1a presentaron mayor probabilidad de desarrollar úlcera péptica que pacientes con cepas tipo s1b y mucho menos que cepas s2.

Estudios de análisis de nucleótidos de la región media del gen *vacA*, en pacientes alemanes con gastritis crónica activa, úlcera péptica y cáncer gástrico, revelaron una nueva región media, que se denominó tipo “m3” (29). Un estudio, en Bélgica (30), encontró una región media diferente para el gen *vacA*, designada como “m1a”, y otra región media tipo “m1-m2” en cepas aisladas de pacientes chinos (31). La infección múltiple por cepas de *H. pylori* con diferentes alelos de *vacA* es común en países en desarrollo (7, 9). Estudios sobre la distribución geográfica de los alelos del gen *vacA* y *cagA* encontraron que, en el nordeste y este de Europa, predomina el subtipo s1a, que se asocia con úlcera duodenal, en Italia y Francia, igualmente prevalentes s1a y s1b; sin embargo, el subtipo s1b es predominante en África, España, Portugal, Colombia, Centro y Sur América. Los subtipos s1a y s1b son prevalentes en América del Norte (9). El subtipo s1c se observó en el oriente de Asia. El subtipo m1 es más común que el m2 en la Península Ibérica, Centro y Sur América. En todas partes del mundo, el genotipo *vacAs1/cagA* (+) se asocia con enfermedad úlcero-péptica.

En Colombia, el genotipo predominante es s1b, igual que en Costa Rica y Perú (9); en estos países hay una baja frecuencia de cepas con el genotipo s1a (30). En Colombia, es común la infección mixta. Gutiérrez y col. (2003) detectó por PCR, de forma simultánea, genotipos *vacA* s1a y *vacA* s1b en muestra de biopsia de mucosa gástrica; sin embargo, se observó una baja frecuencia, cuando la muestra fue aislamientos de cepas en cultivo (7). El perfil de virulencia de un aislado debe contemplar el genotipo tanto de los alelos *vacA*, como de genotipo *cagA*.

En estudios previos, en Colombia, en zonas de contraste en el riesgo de cáncer gástrico, se encontró que los genotipos virulentos de *H. pylori* *cagA* y *vacA* tienen una prevalencia de 90,4% y 83,3% en Pasto y 81% y 70,2% en Tumaco, respectivamente (32).

Una posible explicación sobre la distribución de genotipos de *vacA* en poblaciones y áreas geográficas diferentes es la hipótesis referida a que, en el transcurso del tiempo,

las cepas de un solo genotipo originaron variantes genotípicas, como resultado de adaptaciones a un hospedero, la alta tasa de recombinación, las migraciones humanas o la colonización de las Américas (4, 41).

2.4 DETECCIÓN DE MARCADORES DE VIRULENCIA DE *Helicobacter pylori*

La detección de los marcadores de virulencia de *H. pylori*; genes *cagA* y *vacA* y sus alelos, se puede realizar por PCR. Se utilizan cepas de referencia como controles positivo y negativo en los ensayos de genotipificación:

1. *H. pylori* ATCC 26695 genotipo virulento: *cagA*+, *vacA* s1a/m1
2. *H. pylori* ATCC 51932 genotipo no virulento: *cagA*-, *vacA* s2/m2.

2.4.1 Extracción de ADN de aislados de *Helicobacter pylori*

De un cultivo puro, se tomó un inóculo con asa de argolla y se resuspendió en 1,0 ml de NaCl 0,9% o PBS 1X, pH=7,2. Se centrifugó a 13000 RPM x 2 min y se descartó el sobrenadante. El botón se resuspendió en 300 µl de buffer de lisis (Proteinasa K 100 µg/ml, dodecil sulfato sódico (SDS) 0,5%, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM y Tris-HCl 10 mM, pH=8.0). Se mezcló el botón en vórtex y se colocó el tubo en baño maría a 56 °C por 18 h, con el fin de lisar las bacterias. La proteinasa K se inactivó a 95 °C por 20 min. Se agitó en vórtex por 10 s y se adicionó NaCl 5M en las siguientes proporciones: 120 µl de NaCl 5M a 300 µl del lisado. Se agitó en vórtex por 15 s y se centrifugó 5 min a 13000 RPM. El sobrenadante se trasvasó en un tubo de 2 ml y se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13000 RPM por 20 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de etanol absoluto al 70%. Se centrifugó por 5 min a 13000 RPM y se descartó el sobrenadante. Se dejó reposar por 10 min para secar el ADN. Por último, se reconstituyó el botón en 100 µl de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) y se almacenó a -20 °C (42).

2.4.2 Genotipificación de marcadores de virulencia de *Helicobacter pylori* por PCR

La genotipificación de los factores de virulencia en *H. pylori* se realizó por PCR de los genes *vacA* alelos m1/m2, s1/s2, s1a y s1b, *cagA* (+) y el marcador *cagA* (-).

Las PCR's se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl de una solución que contenía buffer de PCR 1X; 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen™); 25 pmol/µl de cada cebador; 1 U de *taq* ADN polimerasa (Invitrogen™) y 25 ng de ADN genómico. Se adicionó a la solución dimetil sulfóxido (DMSO) al 10% para amplificar el gen *vacA* alelos s1/s2, s1a y s1b. La concentración de los cebadores para los genes *ureA* y *cagA* (+) fue de 50 pmol/µl y para el marcador *cagA* (-) fue de 30 pmol/µl. Las unidades de *taq* ADN polimerasa para los genes *ureA* y *cagA* (+) fueron de 0,25 U y para el marcador *cagA* (-) fueron de 0,5 U (2, 10-12, 43). La concentración de los cebadores y de la *taq* ADN polimerasa para el gen *vacA* y sus alelos se describe en la parte superior de este párrafo.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (MJ Research PTC-100®) bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 52 °C por 1 min y extensión a

72 °C por 1 min. El ciclo final de extensión fue a 72 °C por 5 min. Las condiciones de alineamiento para el gen *ureA* y *cagA* (-) fueron 54 °C por 1,5 min y 60 °C por 1 min respectivamente. El número de ciclos para el marcador *cagA* (-) y el gen *vacA* alelos m1/m2 fueron 45 y 40 ciclos respectivamente (2, 10-12, 43).

2.4.3 Electroforesis para PCR de genes de virulencia de *Helicobacter pylori*

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio, en una cámara de electroforesis (Fotodyne®), a 75 V por 1 h. Luego el ADN se visualizó en un transiluminador (Spectroline Bio-O-Vision®) con luz ultravioleta de 260/280 nm. Para determinar el tamaño de los amplificados se utilizó un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Fermentas®).

2.5 RESULTADOS CAPÍTULO 2. BIOMARCADORES DE VIRULENCIA DE *Helicobacter pylori*

2.5.1 Genotipos de virulencia de *Helicobacter pylori* según el tipo de gastritis

La prevalencia de los genotipos virulentos de *H. pylori* en pacientes con gastritis atrófica fue significativamente mayor (96,3%) que la prevalencia de este mismo genotipo en pacientes con gastritis no atrófica (84,5%). En contraste, la prevalencia de genotipos no virulentos en pacientes con gastritis no atrófica fue mayor (15,5%) que la prevalencia de este mismo genotipo en pacientes con gastritis atrófica (3,7%), $P = 0,021$. Tabla 1.

Tabla 1. Prevalencia de genotipos de virulencia de *Helicobacter pylori* según el tipo de gastritis para Tumaco y Túquerres

Tipo de gastritis	Genotipo				P
	Virulento		No virulento		
	n	%	n	%	
Gastritis atrófica	52	96,3	2	3,7	
Gastritis no atrófica	163	84,5	30	15,5	
Total	215	90,4	32	9,6	0,021

2.5.2 Genotipos de virulencia de *Helicobacter pylori* según lugar de procedencia

El 85,9% de las cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes de Túquerres fue de genotipo virulento significativamente mayor que 75,9% de genotipos virulentos aislados de Tumaco, $P = 0,04$. Tabla 2. En contraste, la prevalencia de genotipos no virulentos de *H. pylori* fue mayor en cepas de pacientes de Tumaco (16,5%) que de Túquerres (7,4%), $P = 0,04$, consistente con estudios previos (32). La prevalencia del marcador de virulencia *cagA* (+) para cepas de Túquerres fue 92,6%, significativamente mayor que 83,5% de cepas de Tumaco, $P = 0,018$. Tabla 2. Foto 1. Se encontró que la prevalencia del marcador de ausencia de la isla de patogenicidad *cagA* (-) fue significativamente mayor en cepas de Tumaco (16,5%) que en Túquerres (7,4%), $P = 0,018$. Foto 2.

El alelo m2 de *vacA*, asociado con baja virulencia, fue más prevalente en Tumaco (24,1%) que en Túquerres (14,1%), $P = 0,038$. Igualmente, el alelo m1 del gen *vacA*, relacionado con alta citotoxicidad, fue más prevalente en Túquerres que en Tumaco, $P = 0,038$. Foto 3. La prevalencia del alelo *vacA* s1b para Tumaco no se encontró en el rango de 97-100%

de cepas de *H. pylori* aisladas de adultos en Sur América reportadas anteriormente (9, 32); 90,8% y 51,8% son las prevalencias de *vacA* s1b encontradas en cepas de Túquerres y Tumaco, respectivamente. Tabla 2. Foto 4.

Tabla 2. Prevalencia de genotipos *cagA* y *vacA* de *Helicobacter pylori* según procedencia

Genotipo	Tumaco		Túquerres		P
	n (133)	%	n (149)	%	
<i>cagA</i>					
<i>cagA</i> (+)	111	83,5	138	92,6	0,018
<i>cagA</i> (-)	22	16,5	11	7,4	
<i>vacA</i> m					
m1	101	75,9	128	85,9	0,038
m2	32	24,1	21	14,1	
<i>vacA</i> s					
s1	110	82,7	131	87,9	0,290
s2	23	17,3	18	12,1	
<i>vacA</i> s1					
s1a	53	48,2	12	9,2	0,000
s1b	57	51,8	119	90,8	
Genotipo					
Virulento	101	75,9	128	85,9	
No virulento	22	16,5	11	7,4	0,04
No determinado	10	7,6	10	6,7	

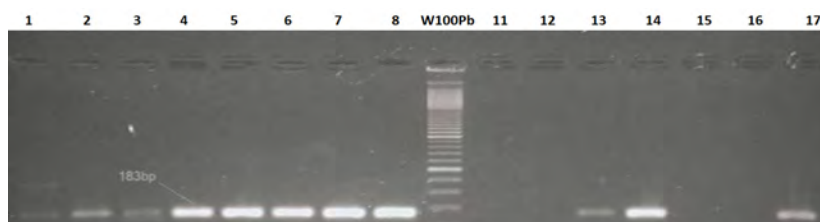


Foto 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen *cagA*

Se observan bandas de 183 pb correspondientes a los aislados *cagA* (+) marcados en la parte superior de los carriles. Los carriles 16 y 17 corresponden al control negativo (ATCC51932) y positivo (ATCC26695), respectivamente. En el carril W, el marcador de tamaño molecular ADN de 100 pb. Fuente: esta investigación.

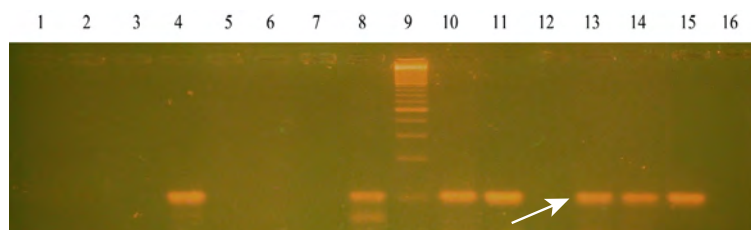


Foto 2. Detección por PCR del marcador *cagA* (-) (*Empty site*)

Se observan bandas de 106 pb (flecha) correspondientes a los aislados *cagA* (-) marcados en la parte superior de los carriles. El carril 9 corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los carriles 15 y 16 corresponden al control positivo (ATCC51932) y negativo (ATCC26695), respectivamente. Fuente: esta investigación.



Foto 3. Patrón electroforético de productos de amplificación por PCR de los alelos m1/m2 del gen *vacA*

Se observa la presencia de bandas (flechas) de 406 y 476 pb correspondientes a *vacA* m1/m2 de los aislados marcados en la parte superior de cada carril. Los carriles marcados 16 y 17 corresponden a los controles positivos m2 (ATCC51932) y m1 (ATCC26695), respectivamente. En el carril W, el marcador de tamaño molecular de 100 pb. Fuente: esta investigación.

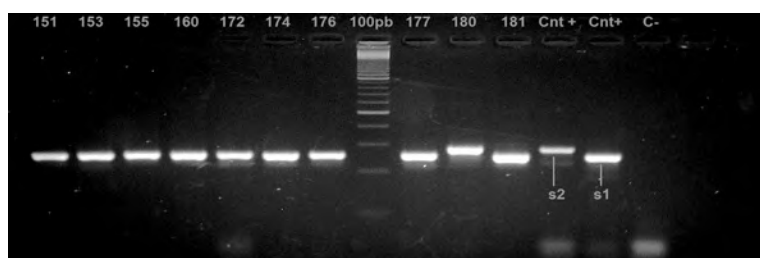


Foto 4. Patrón electroforético de productos de amplificación por PCR de los alelos s1/s2 del gen *vacA*

Se observa la presencia de bandas (flechas) de 259 pb (alelo s1) y 286 pb (alelo s2) de los aislados marcados en la parte superior de cada carril. Los carriles marcados con Cnt + corresponden a los controles positivos s2 (ATCC51932) y s1 (ATCC26695), respectivamente, y el carril C- corresponde al control negativo (agua destilada). En el pozo del medio, el marcador de tamaño molecular de 100 pb. Foto resultado de esta investigación.

2.5.3 Variabilidad de los factores de virulencia de *H. pylori*

En Túquerres, el genotipo *vacA* s1b representa el 90,8% de todas las cepas s1; sin embargo, la frecuencia de este alelo en aislados de Tumaco fue 51,8% y el alelo s1a, característico de países europeos, fue 48,2%. La prevalencia de cepas *cagA* (+), con exclusión de las cepas de los pacientes con infección múltiple, fue mayor en los pacientes de Túquerres 92,6%, en comparación con los de Tumaco 83,5%, ($P = 0,018$). De forma similar, la prevalencia de las cepas *vacA* m1 fue mayor en los pacientes de la región de Túquerres 85,9%, en comparación con los de la región de Tumaco 75,9%, ($P = 0,038$). Los dos marcadores de virulencia, es decir, *cagA* (+), *vacA* m1, y la frecuencia de las cepas virulentas son mayores en la región de alto riesgo de cáncer gástrico que en Tumaco.

Van Doorn y col. (1999) observó que la mayoría de las cepas *vacA* s1 de Suramérica tienen el alelo s1b, mientras que el s1a es raro (30). En esta investigación, la frecuencia del alelo s1a es alta para Tumaco. Debido a que s1a es predominante en países con bajo riesgo de cáncer gástrico, no sorprende que también predominase en la zona de bajo riesgo de cáncer gástrico de este estudio. La prevalencia de los genotipos virulentos de *H. pylori* en pacientes con gastritis atrófica fue mayor, 96,3%, que la prevalencia de los no virulentos,

3,7%, al considerar, además, que la prevalencia de genotipos virulentos en gastritis no atrófica fue mayor a los no virulentos, 84,5% y 15,5%, respectivamente, ($P = 0,02$); su relación con la patología gástrica y el resultado de la enfermedad aún se desconoce.

Se encontró que el genotipo *vacA* m1 es más prevalentes en Túquerres, mientras que que *cagA* (-) y los genotipos *vacA* m2 son relativamente más frecuentes en Tumaco. Los genotipos *cagA* (+), *vacA* s1 y m1 se asocian a alta virulencia; por tanto, es difícil evaluar la importancia relativa de cada marcador. Los resultados de esta investigación indican que los genotipos con determinantes de virulencia son más frecuentes en la población con alto riesgo de cáncer gástrico, en comparación con la frecuencia de estos mismos genotipos en la población con bajo riesgo. Esta observación ofrece una explicación parcial para el enigma africano: alta prevalencia de infección por *H. pylori*, pero baja incidencia de cáncer gástrico (33). Sin embargo, las diferencias en la incidencia de cáncer gástrico no se explican completamente por las diferencias en la prevalencia de cepas virulentas, lo que indica que factores etiológicos, como los polimorfismos humanos y la dieta, también juegan un papel importante.

Los efectos cancerígenos de la infección por *H. pylori* se relacionan con sus factores de virulencia, sobre todo la isla de patogenicidad, PAI-*cag* (34). Se han identificado genes de virulencia en PAI-*cag* que se asocian a coevolución y adaptación con el hospedero, como el gen *babA* de adhesina BabA y el gen *alpA* en cepas colombianas de baja virulencia (38, 39). Efectos cancerígenos se documentan por parte de la citotoxina vacuolizante A, y su marcador de capacidad vacuolizante el gen *vacA*; sin embargo, investigaciones efectuadas sobre el genoma completo de cepas colombianas de *H. pylori* sugieren que el gen *vacA* ha evolucionado a la par con el humano desde sus orígenes evolutivos y la mezcla entre cepas amerindias con europeas y africanas en Colombia ejerció una presión selectiva que indujo su rápida evolución a cepas con alta capacidad patogénica y oncogénica (40).

La hipótesis consiste en que la isla de patogenicidad la adquirió la bacteria por transmisión horizontal y se integró en un sitio contiguo al gen de la glutamato racemasa (*glr*). Las cepas de *H. pylori* pueden tener o no PAI-*cag*. El gen asociado a la citotoxina A, *cagA* es el gen más investigado de la PAI-*cag* y es el principal factor de virulencia de *H. pylori*. A la CagA se la considera una oncoproteína, ya que afecta el citoesqueleto de las células del epitelio gástrico y la proliferación celular. En países de Asia oriental, prácticamente todas las cepas de *H. pylori* son *cagA* (+), mientras que en los países occidentales, aproximadamente del 60% al 70% de las cepas son *cagA* (+). En nuestro estudio, la prevalencia del marcador de virulencia *cagA* (+) de las cepas de Túquerres fue mayor que en las cepas de Tumaco, ($P = 0,018$). Este hallazgo indica que el factor de alta citotoxicidad *cagA* (+) se encuentra asociado a la población de alto riesgo de cáncer gástrico; sin embargo, el marcador de ausencia de la isla *cagA* (-) se asocia con la población de bajo riesgo de cáncer gástrico (11, 34).

2.5.4 Efecto del tratamiento sobre la virulencia de *Helicobacter pylori*

La eficacia del tratamiento diagnosticada por prueba de aliento UBT 45 días postratamiento fue similar: 76,9% de los pacientes se curaron de la infección en Tumaco

y 74,6% resolvieron la infección en Túquerres; sin embargo, los pacientes infectados con cepas no virulentas se asociaron significativamente con fracaso terapéutico en relación a los infectados con cepas virulentas: 39% vs. 16%, respectivamente ($P = 0,026$). Es posible que las cepas no virulentas, por su condición de baja patogenicidad, se adapten más al ambiente gástrico que las cepas virulentas y, a consecuencia de su exposición persistente a los medicamentos, la bacteria indujo mecanismos de resistencia a los antibióticos utilizados para su erradicación. Se puede afirmar que la detección de cepas no virulentas predice, en alguna medida, el fracaso terapéutico, aunque factores como la adherencia al tratamiento y la resistencia deben tomarse en cuenta.

En pacientes con fracaso terapéutico, se encontró un aumento de la prevalencia del marcador *cagA* (-) de *H. pylori* después del tratamiento de 21,2 a 46,3% ($P = 0,001$). De acuerdo con este hallazgo, la prevalencia de los marcadores de baja citotoxicidad alelos s2 y m2 del gen *vacA* aumentaron después del tratamiento, s2 de 16,2 a 26,6% ($P = 0,03$) y m2 de 20 a 24% ($P = 0,05$).

2.5.5 Conclusiones capítulo 2. Biomarcadores de virulencia de *Helicobacter pylori*

El tratamiento anti *Helicobacter pylori* induce un aumento significativo en la prevalencia de genotipos no virulentos *cagA* (-); *vacA* (s2) y *vacA* (m2), lo que sugiere que existe una presión ambiental de los antibióticos que selecciona genotipos no virulentos después del tratamiento.

El tratamiento de la infección induce la regresión de lesiones precursoras de cáncer gástrico (35). Otro estudio observó que suplementos dietéticos, como micronutrientes antioxidantes (ácido ascórbico y beta-carotenos), inducen un efecto protector (53); en este estudio, aquellos que recibieron tratamiento anti-*H. pylori* y que se mantuvieron infectados mostraron una disminución del puntaje histológico por debajo del promedio al inicio del estudio. Una explicación de este resultado está en la supervivencia de cepas de *H. pylori* menos virulenta. Cada vez es claro que la mayoría de pacientes infectados lo está con varios genotipos de la bacteria. En este estudio, las bacterias que sobrevivieron al tratamiento antibiótico son las cepas menos virulentas, como se indica en una mayor prevalencia encontrada de los genotipos menos virulentos, como *cagA* (-) y *vacA* s2 m2 después del tratamiento (37). Entonces, se posibilita pensar que las bacterias de baja virulencia son más resistentes a la acción de los antibióticos utilizados en el esquema omeprazol, claritromicina y amoxicilina (OCA). Este hallazgo explica, en parte, que los pacientes infectados con cepas no virulentas se asocian a fracaso terapéutico en relación a los infectados con cepas virulentas: 39% vs. 16%, respectivamente ($P = 0,026$).

2.6 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 2

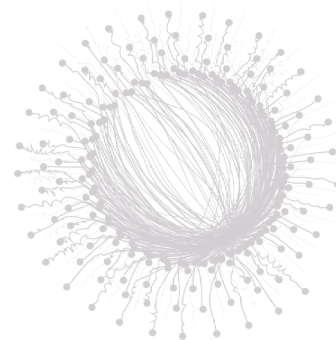
1. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burrani D, Macchia G, et al. Molecular characterization of the 128 kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jun 15;90(12):5791-5. doi: 10.1073/pnas.90.12.5791
2. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blazer MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995 Jun 28;270(30):17771-7. doi: 10.1074/jbc.270.30.17771
3. Figueroa G, Troncoso M, Toledo MS, Faundez G, Acuna R. Prevalence of serum antibodies to *Helicobacter pylori* VacA and CagA gastric disease in Chile. *J Med Microbiol*. 2002 Apr;51(4):300-4. doi: 10.1099/0022-1317-51-4-300
4. Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Inter Med*. 2008 Jun 16;47(12):1077-83. doi: 10.2169/internalmedicine.47.0975
5. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *BMJ*. 1998 May 16;316(7143):1507-10. doi: 10.1136/bmj.316.7143.1507
6. Correa P, Piazuelo MB. Natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Liver Dis*. 2008 Jul;40(7):490-6. doi: 10.1016/j.dld.2008.02.035
7. Young C, Kwak M, Gutierrez O, Graham DY, Yamaoka Y. Comparison of genotyping *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens and genotyping from bacterial cultures. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul;41(7):3336-8. doi: 10.1128/JCM.41.7.3336-3338.2003.
8. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009 Sep;119(9):2475-87. doi: 10.1172/JCI38605
9. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Mégraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz DM, et al. Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol*. 1999 Apr;116(4):823-30. doi: 10.1016/s0016-5085(99)70065-x.
10. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, Van Asbroeck M, Sousa JC, et al. Typing of *Helicobacter pylori* vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol*. 1998 May;36(5):1271-6. doi: 10.1128/jcm.36.5.1271-1276.1998
11. Sicinschi LA, Correa P, Bravo LE, Schneider BG. A positive assay for identification of cagA negative strains of *Helicobacter pylori*. *J Microbiol Methods*. 2003 Dec 2;55:625-33. doi: 10.1016/s0167-7012(03)00206-9
12. Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chong SK, et al. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. *J Clin Microbiol*. 1999 Mar;37(3):772-4. doi: 10.1128/JCM.37.3.772-774.1999
13. Dixon Mf, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated sydney system. *Am J Surg Pathol*. 1996 Oct;20(10):1161-81. doi: 10.1097/00000478-199610000-00001
14. Blaser M, Perez-Perez G, Kleanthous H, Cover T, Peek R, Chyou P, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*. 1995 May 15;55(10):2111-5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7743510/>

15. Cover T, Glupczynski Y, Lage A, Burette A, Tummuru Mr, Perez-Perez G, et al. Serologic Detection of Infection with *cagA* + *Helicobacter pylori* Strains. *J Clin Microbiol.* 1995 Jun;33(6):1496-500. doi: 10.1128/jcm.33.6.1496-1500.1995
16. Nogueira C, Figueiredo F, Carneiro A, Gomes AT, Barreira R, Figueira P, et al. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol.* 2001 Feb;158(2):647-54. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64006-0
17. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Funai F, Ikenoue T, Kato N, et al. Major virulence factors, *VacA* and *CagA*, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut.* 1998 Mar;42(3):338-43. doi: 10.1136/gut.42.3.338.
18. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. *Cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 10;93(25):14648-53. doi: 10.1073/pnas.93.25.14648
19. Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakis K, Kalliaropoulos A, Papatheodoridis G, Mentis AF, et al. Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of *CagA* protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2007 Feb;45(2):488-95. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1829008/>
20. Sicinski LA, Correa P, Peek RM, Camargo MC, Piazuelo MB, Romero-Gallo J, et al. *CagA* C-terminal variations in *Helicobacter pylori* strains from Colombian patients with gastric precancerous lesions. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Apr;16(4):369-78. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02811.x
21. Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, et al. EPIYA Motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor *CagA* in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2005 Jun 17;280(24):23130-7. doi: 10.1074/jbc.M503583200
22. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* *CagA* protein. *Nat Rev Cancer.* 2004 Sep;4(9):688-94. doi: 10.1038/nrc1433
23. Schmitt W, Haas R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol.* 1994 Apr;12(2):307-19. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01019.x
24. Hou P, Tu ZX, Xu GM, Gong YF, Ji XH, Li ZS. *Helicobacter pylori vacA* genotypes and *cagA* status and their relationship to associated diseases. *World J Gastroenterol.* 2000 Aug;6(4):605-7. doi: 10.3748/wjg.v6.i4.605.
25. Ge Z, Taylor D. Contributions of genome sequencing to understanding the biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Microbiol.* 1999 Oct;53:355-87. doi: 10.1146/annurev.micro.53.1.353.
26. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1997 Jan;112(1):92-9. doi: 10.1016/s0016-5085(97)70223-3
27. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology.* 2007 Sep;133(3):926-36. doi: 10.1053/j.gastro.2007.06.056
28. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, et al. The clinical relevance of *Helicobacter pylori cagA*, *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology.* 2008 Jul;135(1):91-9. doi: 10.1053/j.gastro.2008.03.041

29. Strobel S, Bereswill S, Balig P, Allgaier P, Sonntag HG, Kist M. Identification and analysis of a new *vacA* genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient groups in Germany. *J Clin Microbiol.* 1998 May;36(5):1285-9. doi: 10.1128/JCM.36.5.1285-1289.1998
30. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Cannar W, Pena S, Midolo P, Ng EK, et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol.* 1998 Sep;36(9):2597-603. doi: 10.1128/JCM.36.9.2597-2603.1998
31. Mukhopadhyay AK, Kersulyte D, Jeong JY, Datta S, Ito Y, Chowdhury A, et al. Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. *J Bacteriol.* 2000 Jun;182(11):3219-27. doi: 10.1128/JB.182.11.3219-3227.2000
32. Bravo LE, Doorn LJ, Realpe JL, Correa P. Virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori*: Do they explain the African enigma? *Am J Gastroenterol.* 2002 Nov;97(11):2839-42. doi: 10.1111/j.1572-0241.2002.07031.x
33. Holcombe C. *Helicobacter pylori*: The African enigma. *Gut.* 1992 Apr;33(4):429-31. doi: 10.1136/gut.33.4.429
34. Rodriguez AM, Urrea DA, Prada CF. *Helicobacter pylori* virulence factors: relationship between genetic variability and phylogeographic origin. *PeerJ.* 2021 Nov; 26;9:e12272. doi: 10.7717/peerj.12272
35. Fontham ET, Correa P, Mera R, Bravo LE, Bravo JC, Piazuelo MB, et al. Duration of exposure, a neglected factor in chemoprevention trials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Nov;14(11):2465-6. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0518.
36. Correa P, Fontham ET, Bravo JC, Bravo LE, Ruiz B, Zarama G, et al. Chemoprevention of gastric dysplasia: Randomized trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Dec 6;92(23):1881-8. doi: 10.1093/jnci/92.23.1881
37. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med.* 2002 Oct; 10;347(15):1175-86. doi: 10.1056/NEJMra020542
38. Guzman K, Montenegro L, Pazos A. *Helicobacter pylori babA* gene evolution and adaptation in Colombian populations. *Annals of Oncology.* 2021 Jul;32(3):171-2. doi: 10.1016/j.annonc.2021.05.267
39. Guzman K, Pazos A. Microevolution *Helicobacter pylori alpA* gene in Colombian population. *Gastroenterology.* 2021 May;160(6):464-5. doi: [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(21\)01817-5](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(21)01817-5)
40. Guzman K, Pazos A. Rapid evolution of *Helicobacter pylori vacA* gene from Colombian populations with opposite gastric cancer risk. *Gastroenterology.* 2022 May; 162 (7):712-3. doi: [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(22\)61676-7](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(22)61676-7)
41. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, et al. Traces of human migration in *Helicobacter pylori* populations. *Science.* 2003 Mar 7;299(7):1582-5. doi: 10.1126/science.1080857
42. Ho SA, Hoyle JA, Lewis FA, Secker AD, Cross D, Mapstone NP, et al. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol.* 1991 Nov;29(11):2543-9. doi: 10.1128/jcm.29.11.2543-2549.1991
43. Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992 Jan;30(1):192-200. doi: 10.1128/jcm.30.1.192-200.1992

CAPÍTULO 3.

Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*



INTRODUCCIÓN

La terapia antibiótica contra *H. pylori* que logra erradicar la bacteria y su combinación con suplementos antioxidantes se usa exitosamente en quimioprevención de lesiones precursoras de cáncer gástrico (1). De acuerdo a las recomendaciones del VI Consenso de Maastricht (2022) (2), el tratamiento de primera línea consta de una terapia triple con base en un inhibidor de la bomba de protones (PPI) y los antibióticos claritromicina y metronidazol. Si la prevalencia de resistencia a metronidazol es mayor del 40%, se debe sustituir metronidazol por amoxicilina, siempre que la prevalencia de la resistencia a claritromicina no supere el rango del 15 al 20%. Las dos posibilidades de intervención logran tasas de erradicación hasta de un 97% y 88% respectivamente; sin embargo, los niveles de resistencia al metronidazol (20-95%, según el país de origen) (3) obligan a implementar otras opciones, como amoxicilina o tetraciclina (2).

El esquema de tratamiento de segunda línea incluye una terapia cuádruple con base en los medicamentos de primera línea más bismuto, si está disponible; en caso contrario, recomienda PPI más metronidazol y amoxicilina o tetraciclina. Otras alternativas de tercera línea se usan en casos de documentar resistencia *in vitro* a estas dos últimas opciones, que incluyen levofloxacina o rifabutina. Gutiérrez O y col. (2003), en un estudio realizado en Colombia, utilizó como tratamiento de rescate PPI+tetraciclina+amoxicilina+furazolidona con tasa de erradicación de 81% (4).

La mezcla entre cepas de *H. pylori* y transferencia de genes de resistencia permite una adaptación de la bacteria al hospedero, con la consecuente variabilidad e incremento en la resistencia a los antibióticos (5, 6). Este fenómeno incide en el fracaso terapéutico, lo que se sugiere previo conocimiento de la susceptibilidad de la bacteria antes de usar un tratamiento alternativo. Sin embargo, no se cuenta con un tratamiento estandarizado adecuado para la infección, porque las tasas de resistencia son variables y dependientes de la zona geográfica donde se pretendiera su erradicación (2, 4). Algunos parámetros que favorecen el fracaso terapéutico son: la poca penetración del antibiótico y su inactivación por el pH bajo, razón por la cual se incluye en la terapia clínica el PPI. No obstante, un factor importante, que determina la resistencia de *H. pylori*, se refiere a las mutaciones asociadas a genes de resistencia y la infección mixta, que inciden en el fracaso terapéutico (3).

Los fracasos respecto a los tratamientos se relacionan directamente con la resistencia antimicrobiana *in vitro*. Pajares y col. (2007) reportó que con cepas resistentes a claritromicina en 18%, la erradicación se predice en un 60%. Con cepas resistentes a metronidazol disminuye la eficacia de erradicación en un 25%. Con cepas resistentes a claritromicina y metronidazol, asociadas con PPI, se estima un fracaso en la erradicación hasta del 100%. Si se cambia el PPI en este esquema de tratamiento por ranitidina, citrato y bismuto (RCB), la tasa de erradicación no se modifica (7).

3.1 PREVALENCIA DE RESISTENCIA Y MECANISMOS

El concepto de resistencia bacteriana a los antibióticos se liga al de susceptibilidad *in vitro*, que se define por la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antibiótico con capacidad de impedir el crecimiento del cultivo de un inóculo estándar de bacterias. La resistencia del *H. pylori* a los antibióticos puede ser: primero, natural o primaria, que es la imposibilidad intrínseca del antibacteriano para erradicar la infección, la mayoría de las veces por un efecto barrera que impide la penetración del compuesto; segundo, la resistencia adquirida, que aparece frente a antibióticos a los que la bacteria era inicialmente susceptible, debido a mutaciones genéticas o a la infección por plásmidos; y la resistencia farmacológica se presenta cuando cepas de *H. pylori* son susceptibles a un antibiótico *in vitro* y, sin embargo, son resistentes *in vivo*; la causa principal es la dificultad del antibiótico para llegar al foco infeccioso en concentraciones suficientes para alcanzar un efecto antibacteriano o la infección mixta por cepas susceptibles y resistentes (7).

La prevalencia de resistencia de *H. pylori* a metronidazol llega hasta el 90% en Asia y en India, mayor de 50% en USA y Europa Occidental, de 70 a 100% en África, y de 42 a 97% en Sur América (8). En Colombia, la resistencia a metronidazol es alta y comparable a la publicada en 10 años: 84% (1998) y 72% (2009) (9, 10). Rodríguez y col. (2008) y Alvarez A y col. (2009) encontraron resistencias a metronidazol similares: 92% y 82%, respectivamente (11, 12). Según el VI Consenso de Maastricht de 2002, no se recomienda utilizar este antimicrobiano en los esquemas de erradicación en Colombia.

Este antibiótico se activa por la reducción de un grupo nitro, que genera una hidroxilamina altamente mutagénica. El principal mecanismo de resistencia de *H. pylori* a metronidazol se relaciona con la presencia de mutaciones puntuales en los genes *rdxA* y *frxA*, cuyos productos tienen actividad de nitrorreductasa para el metronidazol (3, 46).

La resistencia a claritromicina, aunque de menor prevalencia, es cada vez más frecuente: Corea 5,9%, Croacia 21%, Portugal 22%, México 24%, Brasil 7%, Argentina 24%, Perú 50% y en Bangladesh se observó mayor frecuencia en niños, 42,9%, que en adultos, 11,1% (13). Estudios recientes, en Colombia, documentan resistencia a claritromicina de 3,8% y 15% (11, 14, 46). Una prevalencia de resistencia a claritromicina de 60%, se reportó en Colombia por Yepes y col. (2008) (12). La resistencia a este antibiótico se debe a mutaciones puntuales en el dominio V del gen rARN 23S de *H. pylori*, que inhibe la actividad peptidil transferasa y afecta la polimerización de proteínas (3).

La resistencia a amoxicilina oscila entre 0-30%, según el país de origen (3). En la mayoría de los estudios reportados a nivel mundial, la resistencia es nula o inferior al 1%, lo que

indica que todavía no es un problema, por lo menos en los países donde se confirmase la baja prevalencia de resistencia a este antibiótico. Se reportan tasas de resistencia altas a amoxicilina: 38% en Brasil y 71,9% en Shangai (15, 16); sin embargo, estos resultados se deben interpretar con cautela, hasta que se confirme su reproducibilidad (17). En Colombia, dos trabajos reportan resistencia a amoxicilina de 1,9% y 7% (11, 12), respectivamente. La resistencia a este antibiótico se debe a reducida permeabilidad de la membrana bacteriana, causada por mutaciones específicas del gen *pbp1A*. El efecto es la alteración del producto génico, la proteína de unión a la membrana (PBP1A), que inhibe la unión del antibiótico (3, 46). Varios estudios no encontraron el plásmido portador de la betalactamasa, lo que sugiere que este no es un mecanismo de resistencia a amoxicilina (17). Resultan inquietantes los registros de resistencia primaria doble a metronidazol y claritromicina: en Europa 0.8-9%, Asia 2-3% y en países en desarrollo 18-50%. Esta resistencia se relaciona con una disminución de la eficacia terapéutica (7).

3.2 RELACIÓN DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA

La resistencia de *H. pylori* a los antibióticos empleados en los esquemas para su tratamiento, junto con su falta de adherencia, incrementan el fracaso en la resolución de la infección, con distintas proporciones de fracaso terapéutico (2, 18, 19, 20). Se reportó que la infección por cepas resistentes a claritromicina y amoxicilina y aislados no virulentos, *cagA* (-) y *vacA* s2, se relacionan con tasas bajas de erradicación (21), consistente con hallazgos previos, en los que se encontró que las bacterias aisladas de pacientes con fracaso terapéutico, son de baja virulencia, lo que explica el incremento significativo de la prevalencia de genotipos de baja virulencia, como *cagA* (-) y *vacA* s2/m2, después del tratamiento (11). No obstante, estos resultados pueden reflejar infección con múltiples cepas de *H. pylori* en un mismo hospedero o un cambio de genotipo de *H. pylori* de virulento: *cagA* (+), a no virulento: *cagA* (-) inducido por la presión de los antimicrobianos (2).

En varios países latinoamericanos, se describe alta prevalencia de resistencia de *H. pylori* a metronidazol (11, 12, 15, 22). En uno de estos estudios, se asocia la resistencia a metronidazol con cepas no virulentas *cagA* (-). En otro estudio, se relacionan mutaciones puntuales en los segmentos A2142G, A2143G y T2182C de la subunidad 23S rRNA con la virulencia de cepas claritromicina resistentes (22).

Algunos estudios no encontraron relación entre las variables genotípicas de virulencia y susceptibilidad antibiótica de *H. pylori* (23-25, 15, 26); sin embargo, otros estudios las describen (27, 22, 28, 29, 30). Posiblemente, estas divergencias se debieran a colonización por múltiples cepas con diferentes perfiles de virulencia y respuesta antimicrobial (31). A estos fenómenos de colonización en diferentes sitios anatómicos de la mucosa gástrica, conocidos como policolonización (32) o infección mixta por múltiples cepas (33), los analizaron Cellini L y col. (2006); ellos, mediante un análisis de variabilidad genética, encontraron que la infección mixta se relaciona con cepas resistentes y con genotipos virulentos: alelos s1m1/s1m2 de *vacA*, *cagA* (+) e *iceA1* (+), en vez de las cepas responsables de la infección única (28).

3.3 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori* Y LESIONES GÁSTRICAS POR HISTOPATOLOGÍA

Las muestras de mucosa gástrica se transportaron en formol al 10% y luego se procesaron según un protocolo estándar de deshidratación con alcohol etílico, propílico y xilol a diferente concentración, con inclusión final en parafina. Secciones histológicas cortadas en micrótomos (Accu-Cut® SRM) de 6µ se tiñeron con hematoxilina-eosina (H & E). Foto 1. Para determinar la presencia de *H. pylori*, se utilizó la tinción de Giemsa modificada en busca de bacilos curvos y espiralados. Foto 2. Cada uno de los fragmentos se evaluó por separado y las alteraciones histopatológicas encontradas en la mucosa gástrica se graduaron de acuerdo a la escala visual análoga descrita por Dixon, 1996 (34). Con la evaluación general de las muestras, se obtuvo un diagnóstico para cada paciente.

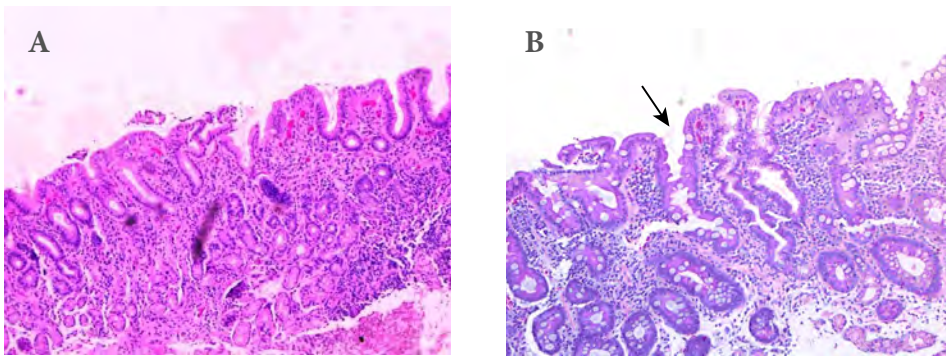


Foto 1. Alteraciones histopatológicas de la mucosa gástrica

A. Microfotografía de mucosa gástrica con gastritis no atrófica. Se observa un moderado infiltrado de mononucleares y, en la parte superior, tejido glandular bien conservado. **B.** Microfotografía de un corte de mucosa con gastritis atrófica multifocal. Se observa marcado infiltrado inflamatorio, atrofia de las estructuras glandulares y colonización por *H. pylori* (Flecha). Tinción: H & E realizada por el histotecnólogo PR. Fuente: esta investigación.

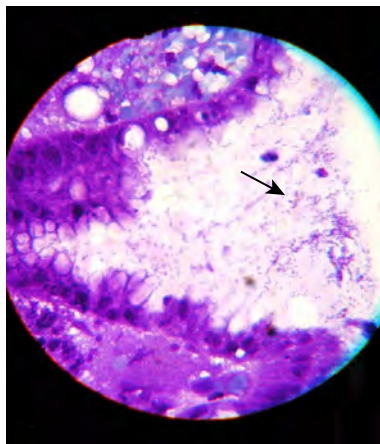


Foto 2. Diagnóstico histopatológico de *Helicobacter pylori*

Demstración de los bacilos en la mucosa gástrica por el método de Giemsa modificado. La flecha señala las bacterias teñidas de azul. Tinción realizada por el histotecnólogo PR. Fuente: esta investigación.

3.4 APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO ANTI *Helicobacter pylori*

Los pacientes positivos para la infección con *H. pylori* por diagnóstico histológico se intervinieron con tratamiento de primera línea, consistente en terapia triple con base en un inhibidor de bomba de protones: omeprazol (Genfar®) 20 mg, durante 14 días, antes del desayuno y cena, complementado con claritromicina (Genfar®) 500 mg 2 v/d y amoxicilina (Genfar®) 1000 mg 2 v/d durante 14 días, según las recomendaciones del VI Consenso de Maastricht 2022 (2). La resolución de la infección se evaluó con la prueba del aliento de [¹³C]-Urea (UBT), después de 45 días de finalizada la intervención. Se consideró fracaso terapéutico en aquellos pacientes con prueba de aliento [¹³C]-Urea positiva. A los pacientes con fracaso terapéutico se les practicó una segunda endoscopia, con aplicación del mismo protocolo de toma de biopsias.

3.5 PRUEBA DE ALIENTO CON [¹³C]-Urea (UBT)

Se recolectó una muestra basal de aire espirado en un tubo (Exateiner®) de 10 ml. Inmediatamente, se suministraron, para su ingestión, 100 ml de una solución de glucosa, que contenía 100 mg de [¹³C]-Urea (Cambridge Isotope Laboratories®). Otra muestra de aliento se recolectó 30 minutos después de la ingestión de la solución (35). Se determinó la concentración de [¹³C]-Urea gas radio isótopo estable en estado basal y 30 minutos post-ingestión, en un analizador de Isótopos Infra Rojo (Iris® Doc-Wagner) (36).

3.6 DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIAL DE *Helicobacter pylori*

3.6.1 Validación del inóculo de *Helicobacter pylori*

Para validar el método de ajuste del inóculo de *H. pylori* por turbidimetría y garantizar la reproducibilidad de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*, se diseñó el siguiente procedimiento.

La selección del filtro que permitió la máxima absorción de luz por las muestras se realizó mediante una curva de transmitancia espectral para solución salina fisiológica (SSF) en un espectrofotómetro ELx800 (Bio-Tek Instrument®, Inc). La fracción de la luz transmitida (T) se midió con filtros de longitudes de onda de: 450 nm, 490 nm, 630 nm y dual 450-630 nm. Se estableció como criterio de selección del filtro: 100% de T para blancos y > de 0,01 de absorbancia para SSF. Para evaluar la linealidad del método, se elaboraron 26 estándares de McFarland, desde 0,5 hasta 3,0, con incrementos sucesivos de 0,1. Para evaluar la reproducibilidad de los resultados de absorbancia, a cada estándar se le realizaron 12 repeticiones individuales de lectura de densidad óptica (DO) bajo dos condiciones experimentales: 1- Determinando la DO de 250 µl de cada estándar servido en cada pozo de una microplaca de 96 pozos, con pipeta individual y 2- Determinando la DO de los estándares descritos en el experimento anterior servidos con pipeta múltiple de 12 canales en la microplaca. Se utilizó el estándar de McFarland de 2,0 para ajustar la densidad celular del inóculo de *H. pylori* en la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, según las guías del CLSI (37, 38).

3.6.2 Determinación de concentración inhibitoria mínima-CIM

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de claritromicina (CLA) y amoxicilina (AMX) se determinó por el método de dilución en agar, según las guías desarrolladas por el Committee for Laboratory Standards Institute (CLSI) (37).

Se suspendieron moléculas puras de los antibióticos en agar Mueller-Hinton suplementado con 10% de sangre desfibrinada de cordero. Se elaboraron cinco diluciones de los antibióticos, desde 0,25 mg/l hasta 4,0 mg/l, con incrementos sucesivos dobles en la concentración. Se utilizó metanol como disolvente para la claritromicina y buffer fosfato pH=6,0 estéril para amoxicilina (37). Se inocularon 3 µl por gota de una suspensión de bacterias en solución salina, equivalente en turbidez a un estándar de McFarland de 2.0, en cada caja de agar con la respectiva dilución del antibiótico. La incubación se llevó a cabo en condiciones microaerófilas. El criterio para determinar la CIM fue la menor concentración del antibiótico que inhibía el crecimiento del aislado en estudio. El crecimiento se evaluó máximo hasta los tres días después del inóculo, en busca de la caja que contuviera la mínima dilución del antibiótico que inhibió el crecimiento del aislado. Como control positivo se utilizó la cepa ATCC4 3504, considerando puntos de corte de CIM de 0,015 mg/l a 0,12 mg/l como resistente a claritromicina y amoxicilina. Como control de sensibilidad, se observó la ausencia de crecimiento de la cepa ATCC 43504 en cajas que contenían concentraciones de los antibióticos de 0,12 mg/l (37). Como control de viabilidad del crecimiento, se transfirió el inóculo de cada experimento a cajas sin antibiótico para descartar falsos positivos de sensibilidad.

3.6.3 Criterios de resistencia y sensibilidad de *Helicobacter pylori*

Los siguientes criterios de resistencia y sensibilidad de aislados y puntos de corte se tomaron en cuenta: los aislados de *H. pylori* se consideraron resistentes a claritromicina y amoxicilina cuando la CIM fue mayor o igual a 1 mg/l. Los aislados clínicos se denominaron sensibles cuando la CIM estuvo entre 0,25 y < 1 mg/l. Cuando la bacteria no creció en ninguna de las cajas de Petri que contenían antibiótico, se consideró la CIM como < 0,25 mg/l y se reportó como sensible al mismo (37). En todos los aislados, se verificó el crecimiento, al tener como control positivo el mismo aislado sin exposición a los antibióticos.

La concordancia entre la resistencia *in-vitro* y el fracaso terapéutico (prueba de aliento UBT *in vivo*) se estimó con el coeficiente *kappa*. Los valores *kappa* sugeridos inferiores a 0,5 se interpretaron como baja concordancia; aquellos entre 0,5-0,75, se consideraron buenos, y los superiores a 0,75 excelentes (39).

3.7 RESULTADOS CAPÍTULO 3. TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori*

3.7.1 Validación del inóculo de *Helicobacter pylori*

En el proceso de validación del método turbidimétrico con estándares de McFarland como fiable para ajustar el inóculo utilizado en la evaluación de la susceptibilidad de los aislados, se obtuvieron 768 mediciones de densidad óptica (DO) con los 4 filtros evaluados. Se seleccionó el filtro de 450-630 nm con 99,9% de transmitancia (T) para blanco y 0,042 de DO para solución salina fisiológica (SSF). El error atribuible al método de ajuste del inóculo

mediante estándares de McFarland fue mínimo: 0,01% y 0,03% cuando se utilizaron una pipeta multicanal y unicanal, respectivamente.

La DO del inóculo fue de 0,24, equivalente a un estándar de McFarland 2,0, con una densidad celular de $4,6 \times 10^7$ bacterias/ml, según recomendaciones de las guías del CLSI (37, 38).

3.7.2 Eficacia del tratamiento según procedencia y virulencia de *Helicobacter pylori*

La eficacia del tratamiento diagnosticada por la prueba de aliento UBT 45 días postratamiento fue similar: 130 de 169 pacientes tratados se curaron de la infección en Tumaco (76,9%) y 123 de 165 infectados resolvieron la infección en Túquerres (74,6%). Tabla 1; sin embargo, los pacientes infectados con cepas no virulentas se asociaron significativamente a fracaso terapéutico en relación a los infectados con cepas virulentas (39% vs. 16%), respectivamente, $P = 0,026$. Tabla 2.

Tabla 1. Eficacia terapéutica de la infección por *Helicobacter pylori* según procedencia

Respuesta al tratamiento UBT*	Tumaco		Túquerres	
	n (169)	%	n (165)	%
Eficacia	130	76,9	123	74,6
Fracaso	33	19,5	31	18,8
No concluyente	6	3,6	11	6,7

*UBT: Prueba de aliento para el diagnóstico de *H. pylori*.

Tabla 2. Respuesta al tratamiento de *Helicobacter pylori* según virulencia

Genotipo	n	Fracaso		Eficacia		O.R.	I.C. 95%	P
		n	%	n	%			
No virulento	31	12	39	19	61	.	.	0,026
Virulento	189	31	16	158	84	0,31	0,13-0,71	

En pacientes con fracaso terapéutico, se encontró un aumento significativo de la prevalencia del marcador *cagA* (-) de *H. pylori* después del tratamiento (21,2% a 46,3%), $P = 0,002$. En concordancia con este hallazgo, la prevalencia de los marcadores de citotoxicidad nula, alelos s2 y m2 del gen *vacA*, aumentaron después del tratamiento, así: para s2, (16,6 a 26,6%) $P = 0,03$ y para m2, (20% a 24%) $P = 0,04$. Tabla 3.

Tabla 3. Efecto del tratamiento en los genotipos *cagA* y *vacA* de *Helicobacter pylori* de pacientes de Tumaco y Túquerres

Genotipo	Prevalencia (%)		P
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento*	
<i>cagA</i>	Positivo	78,8	53,7
	Negativo	21,2	46,3
<i>vacA</i>	s1	83,4	73,4
	s2	16,6	26,6
	m1	80,0	76,0
	m2	20,0	24,0

* Casos de fracaso terapéutico. En negrilla genotipos no virulentos

En pacientes con fracaso terapéutico, se encontró un aumento significativo de la prevalencia del marcador *cagA* (-) de *H. pylori* después del tratamiento (21,2% a 46,3%), $P = 0,002$. En concordancia con este hallazgo, la prevalencia de los marcadores de citotoxicidad nula, alelos s2 y m2 del gen *vacA*, aumentó después del tratamiento, así: para s2, (16,6 a 26,6%) $P = 0,03$ y para m2, (20% a 24%) $P = 0,04$. Tabla 3. Se concluyó que el tratamiento induce un aumento significativo de la prevalencia de genotipos no virulentos *cagA*(-); *vacA* s2/m2, lo que sugiere que existe una presión ambiental de los antibióticos que selecciona posiblemente genotipos no virulentos después del tratamiento. Tabla 3.

Se concluyó que el tratamiento induce un aumento significativo de la prevalencia de genotipos no virulentos *cagA*(-); *vacA* s2/m2, lo que sugiere que existe una presión ambiental de los antibióticos que selecciona posiblemente genotipos no virulentos después del tratamiento. Tabla 3.

3.7.3 Resistencia de *Helicobacter pylori* a amoxicilina y claritromicina según procedencia, tipo de gastritis y genotipos de virulencia

Tabla 4. Prevalencia de resistencia antibiótica según procedencia, tipo de gastritis y genotipo de *H. pylori*

Característica	n	AMX		P	CLA		P	AMX+CLA		P
		Susceptible	Resistente		Susceptible	Resistente		Susceptible	Resistente	
		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
Procedencia										
Tumaco	127	98(77,2)	29(22,8)	0,0002	101(79,5)	26(20,5)	0,0001	111(87,4)	16(12,6)	0,0006
Túquerres	147	139(94,6)	8(5,4)		142(96,6)	5(3,4)		145(98,6)	2(1,36)	
Tipo gastritis										
No atrófica	212	190(89,6)	22(10,4)	0,0043	189(89,2)	23(10,8)	0,0492	201(94,8)	11(5,2)	0,0159
Atrófica	61	46(75,4)	15(24,6)		53(86,9)	8(13,1)		54(88,5)	7(11,5)	
Genotipo										
Virulento	213	187(87,8)	26(12,2)	0,0472	195(91,5)	18(8,5)	0,0326	203(95,3)	10(4,7)	0,0631
No virulento	32	27(84,4)	5(15,6)		26(81,3)	6(18,7)		28(87,5)	4(12,5)	

La prevalencia de resistencia de *H. pylori* a AMX, CLA y ambos antibióticos fue significativamente mayor en Tumaco que en Túquerres: (22,8%, 20,5% y 12,6%) vs. (5,4%, 3,4% y 1,4%), $P < 0,05$. Tabla 11. Se encontró asociación entre la resistencia a AMX, CLA y ambos antibióticos con el tipo de gastritis; la prevalencia de resistencia a AMX, CLA y AMX+CLA fue más alta en pacientes con gastritis atrófica que en pacientes con gastritis no atrófica (24,6%, 13,1% y 11,5) vs. (10,4%, 10,9% y 5,2%), $P < 0,05$. Esta misma tendencia se observó en el análisis de susceptibilidad y virulencia de las bacterias. Se detectó mayor frecuencia de resistencia a AMX, CLA, y ambos antibióticos en aislados no virulentos en comparación con los virulentos: (15,6%, 18,8%, 12,5%) vs. (12,2%, 8,5%, 4,7%), $P < 0,05$. Se concluye que las cepas virulentas son más sensibles a la acción de los antibióticos del esquema de tratamiento, en contraste con las cepas de baja virulencia, que son más resistentes. Tabla 4.

3.7.4 Concordancia de los resultados de susceptibilidad *in vitro* y la respuesta al tratamiento *in vivo*

Este estudio encontró que la eficacia del tratamiento es independiente de la susceptibilidad *in vitro* de *H. pylori* a los antibióticos AMX y CLA, $P = 0,38$ y $P = 0,71$, respectivamente. La Tabla 5 indica que el fracaso terapéutico no es dependiente de la resistencia. Este hallazgo lo corrobora la concordancia de los resultados de susceptibilidad *in vitro* y la respuesta al tratamiento *in vivo* evaluada por la prueba de aliento. En este trabajo, no se encontró la concordancia descrita en otros estudios (41, 42, 56, 57). La concordancia encontrada fue baja ($Kappa = -0,037$, $EE = 0,086$) para ambos antibióticos, lo que sugiere que el diagnóstico *in vitro* de la resistencia antimicrobiana no predice el fracaso terapéutico del tratamiento de erradicación de *H. pylori*.

Tabla 5. Respuesta al tratamiento de *Helicobacter pylori* según susceptibilidad

Susceptibilidad <i>in vitro</i>	n	Fracaso		Eficacia		O.R.	I.C. 95%	P
		n	%	n	%			
AMX								
Susceptible	204	41	20	163	79	.	.	0,38
Resistente	36	5	14	31	86	0,64	0,24 2	
CLA								
Susceptible	210	41	20	169	80	.	.	0,71
Resistente	30	5	17	25	83	0,82	0,30 2	

3.7.5 Susceptibilidad antimicrobial de *Helicobacter pylori*

Las pruebas *in vitro* para evaluar la susceptibilidad de *H. pylori* a AMX y CLA no se asociaron con la eficacia terapéutica. La concordancia entre susceptibilidad *in vitro* y eficacia fue baja ($Kappa = -0,037$, $EE = 0,086$). La prevalencia *in vitro* de resistencia de *H. pylori* a AMX, CLA y ambos antibióticos fue significativamente mayor en Tumaco; sin embargo, la eficacia terapéutica fue similar y satisfactoria, tanto en Tumaco (76,9%) como en Túquerres (74,6%) (Tabla 1). Los valores de eficacia para el esquema de terapia triple obtenidos en esta investigación coinciden con las guías del VI Consenso de Maastricht y estudios similares internacionales, que describen una eficacia cercana al 80% (40). Los factores asociados a fracaso terapéutico son múltiples y no dependen exclusivamente de la resistencia *in vitro*. Este trabajo no encontró la concordancia descrita en otros estudios (41, 42).

Las cepas susceptibles a la acción de los dos antibióticos *in vitro* mostraron capacidad de colonizar con mayor frecuencia pacientes con gastritis atrófica y no atrófica que las cepas resistentes. Esta observación es válida para las dos poblaciones de estudio y es posible que se relacione con la respuesta al tratamiento de este tipo de pacientes. Se encontró asociación entre la resistencia a AMX, CLA y ambos antibióticos con el tipo de gastritis; la prevalencia de resistencia a AMX, CLA y AMX+CLA fue más alta en pacientes con gastritis atrófica que en pacientes con gastritis no atrófica; sin embargo, se esperaba que la prevalencia de resistencia fuese mayor en pacientes con gastritis no atrófica, ya que esta investigación encontró, en este tipo de pacientes, infección con

cepas no virulentas, y la hipótesis consiste en que las cepas no virulentas de *H. pylori* son más resistentes a los antibióticos que las cepas virulentas.

Conclusión: la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos empleados en los esquemas de tratamiento, la resistencia por mutaciones puntuales de *H. pylori* detectada en terapias antibióticas múltiples en Colombia (46), junto con la falta de adherencia al tratamiento, incrementa el fracaso en la resolución de la infección con distintas proporciones de fracaso terapéutico (2, 18-20). Se documenta que la infección por cepas resistentes a CLA y AMX y por aislamientos no virulentos *cagA* – y *vacA s2* se relacionaron con bajas tasas de erradicación de *H. pylori* (21), consistente con hallazgos encontrados en esta investigación, donde las bacterias aisladas de pacientes con fracaso terapéutico, en una mayor proporción, son de baja virulencia, lo que explica el incremento significativo de la prevalencia de genotipos de baja virulencia, como *cagA* (-) y *vacA s2/m2*, después del tratamiento (22, 55).

3.7.6 Genotipos de virulencia y susceptibilidad antibiótica

Algunos trabajos no encontraron relación entre las variables genotípicas de virulencia y susceptibilidad antibiótica de *H. pylori* (23-26, 15); otros estudios, al igual que este, las describen (43, 22, 28-30). Este hallazgo de detección de mayor frecuencia de resistencia a AMX, CLA y a ambos antibióticos en aislados no virulentos (15,6%, 18,8%, 12,5%), en comparación con los virulentos (12,2%, 8,5%, 4,7%), diverge de otras investigaciones y posiblemente las diferencias se debiesen a colonización por múltiples cepas con diferente perfil de virulencia y respuesta antimicrobial (31). Estos fenómenos de policolonización en diferentes sitios anatómicos de la mucosa gástrica (32) o infección mixta por genotipos diferentes (33), los estudió Cellini L y col. (2006): mediante un análisis de variabilidad genética, encontró que la infección mixta en un paciente se relaciona con cepas más resistentes a los antibióticos y con genotipos más virulentos: alelos *s1m1/s1m2* de *vacA*, *cagA* (+) e *iceA1* (+), respecto a las cepas responsables de la infección única (28).

H. pylori ha desarrollado múltiples mecanismos de resistencia para sobrevivir en el ambiente hostil de la mucosa gástrica. La presión ambiental ejercida después de la exposición a los antibióticos, principalmente en tratamientos usados para intervenir procesos infecciosos diferentes a los ocasionados por *H. pylori*, permite seleccionar bacterias con resistencia adquirida o con mutaciones puntuales asociadas a resistencia. Es claro que esta presión por selección se disminuye al asociar el antibiótico con un inhibidor de la bomba de protones (PPI). Este comportamiento de la bacteria no se observa en *H. pylori* con respecto a la exposición prolongada a betalactámicos, por causas aún no claras, debido a que no se observa incremento en la prevalencia de resistencia, a pesar de la presencia de diferentes mutaciones puntuales en el gen *pbp1-A* reportadas por muchos autores (43-45).

En general, la resistencia a AMX es menor a la resistencia observada a los macrólidos, probablemente atribuible a las razones ya descritas, como se observó en la resistencia a AMX en la población de Túquerres. En la población de Tumaco, se encontró mayor

resistencia a AMX y CLA, posiblemente relacionada con un uso mayor y no controlado de los betalactámicos o por presión de selección inducida por los antibióticos (41, 43, 46).

Conocer la susceptibilidad a los antimicrobianos más usados en una población, constituye una herramienta para disminuir las cepas resistentes de *H. pylori*, debido a que el principal inconveniente en el manejo de la infección es el incremento de los fracasos terapéuticos de los esquemas de primera línea (AMX-CLA-OME) y de resistencia a antibióticos usados en terapias múltiples (46). Es pertinente aclarar que en una población, antes de definir un esquema de tratamiento óptimo, es importante conocer el costo, los efectos colaterales, su fácil administración y, en particular, la eficacia terapéutica, para que la dosis del antimicrobiano sea suficiente para neutralizar la concentración bacteriana presente en la mucosa gástrica. La prevalencia de resistencia *in vitro* a CLA y AMX hallada en esta investigación fue reproducible con nuestros estudios genómicos efectuados en 2023 en Colombia (46, 47). La prevalencia de resistencia a CLA en las dos poblaciones estudiadas es consistente con los resultados registrados en otros países latinoamericanos y aun en países del sur de Europa, donde existen registros de 18%, 20% de prevalencia de resistencia a CLA, y del Japón 20,6% y 22,7%. La resistencia a CLA observada en la población de Tumaco fue 20,5% mayor que 3,4% de Túquerres; probablemente estas diferencias se relacionan con factores no solo intrínsecos de *H. pylori* (virulencia, mutaciones), sino también por factores extrínsecos (poca adherencia del tratamiento, prescripción previa), como la bibliografía lo refiere.

Estudios de resistencia a CLA en países latinoamericanos, como Uruguay, Chile, Brasil y México, reportan prevalencias de 19,4%, 20%, 25%, 25%, respectivamente; en Italia 24,3% y Turquía 16,4% y 27,5%, similares a la encontrada en Tumaco 20,5%; al contrario, en la población de Túquerres se encontró una prevalencia de resistencia menor 3,4%, como lo señalan los registros encontrados en el Brasil y Ecuador, 9,5%, 8,0% respectivamente. Estas observaciones confirman que la prevalencia de resistencia a este macrólido es relativa y dependiente del área geográfica, como lo afirman varios autores (43, 47, 58, 59).

Al comparar estos hallazgos con los estudios previos realizados en Colombia, la resistencia a CLA de 20,5% encontrada en Tumaco y 3,4% en Túquerres, no se alejan de los reportes en el centro del país, 15% y 17,7% en la zona cafetera, y andina 2,2%. En nuestros recientes estudios genómicos de detección de SNPs en genes de resistencia a CLA en Colombia, encontramos una prevalencia de resistencia a CLA de 3,62% (46). Otro estudio realizado en Bogotá reporta una prevalencia mayor a CLA, 63,1%. Estos datos de resistencia a CLA sugieren que la prevalencia de resistencia antimicrobiana de *H. pylori* depende de factores relacionados no solo con la bacteria, sino, también, tanto de la población en estudio (43) como de la poca vigilancia en el uso de antibióticos o por el mayor o menor cubrimiento de estos antibióticos por los Planes subsidiados de salud.

3.7.7 Beneficios y riesgos de la erradicación de *Helicobacter pylori*

La infección por *H. pylori* en Colombia es casi ubicua del 90%, en la que diferentes factores se ha descrito que son mediadores del desarrollo de cáncer gástrico. Sin embargo, la incidencia entre las poblaciones de la Zona Andina y la Costa Pacífica en Colombia se contraponen. La

erradicación de *H. pylori* en diversas poblaciones del mundo ha demostrado que disminuye la incidencia entre un 40% y 76% (48-51); por ende, realizar la erradicación temprana de *H. pylori* tiene consecuencias benéficas en las poblaciones e individuos que presentan un alto riesgo de cáncer gástrico, como ocurre en la Zona Andina de Colombia (51). Sin embargo, en las zonas donde la incidencia de cáncer gástrico es relativamente baja, como en la Costa Pacífica, erradicar *H. pylori* en individuos que han coevolucionado durante miles de años con la bacteria, probablemente traería a futuro consecuencias opuestas a la intención clínica de eliminar síntomas de dispepsia no relacionados con la infección, o inducir enfermedades contemporáneas asociadas a la erradicación de *H. pylori*, como asma, enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD) y el adenocarcinoma de esófago (52-54), que ha aumentado en poblaciones donde la prevalencia de *H. pylori* ha disminuido (54).

3.7.8 Conclusiones capítulo 3. Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*

La prevalencia de resistencia de *H. pylori* a AMX, CLA y ambos antibióticos fue significativamente mayor en Tumaco que en Túquerres.

Se encontró asociación entre la resistencia a AMX, CLA y ambos antibióticos con el tipo de gastritis; la prevalencia de resistencia a AMX, CLA y AMX+CLA fue más alta en pacientes con gastritis atrófica que en pacientes con gastritis no atrófica.

Se detectó mayor frecuencia de resistencia a AMX, CLA, y ambos antibióticos en aislados no virulentos, en comparación con los virulentos. Se concluye que las cepas virulentas son más sensibles a la acción de los antibióticos del esquema de tratamiento, en contraste con las cepas de baja virulencia, que son más resistentes.

Este estudio encontró que la eficacia del tratamiento es independiente de la susceptibilidad *in vitro* de *H. pylori* a los antibióticos AMX y CLA.

El fracaso terapéutico no depende de la resistencia *in vitro*. Este hallazgo lo corrobora la concordancia de los resultados de susceptibilidad *in vitro* y la respuesta al tratamiento *in vivo* evaluada por la prueba de aliento. El diagnóstico *in vitro* de la resistencia antimicrobiana no predice el fracaso terapéutico del tratamiento de erradicación de *H. pylori*.

3.8 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 3

1. Correa P, Fontham ET, Bravo JC, Bravo LE, Ruiz B, Zarama G, et al. Chemoprevention of gastric dysplasia: Randomized trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Dec 6;92(23):1881-8. doi: 10.1093/jnci/92.23.1881
2. Malfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, Gisbert J, Lion M, Schulz C, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut.* 2022; 71:1724-1762. doi: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327745>
3. Gerrits MM, Van Vliet A, Kuipers E, Kusters J. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis.* 2006 Nov;6(11):699-709. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70627-2.
4. Gutiérrez O, Otero W, Cardona H, Quintero F, Orozco C, Sánchez L. Terapia cuádruple con furazolidona como tratamiento de rescate para la infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Colomb Gastroenterol.* 2003 Oct;18(4):222-7. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572003000400005
5. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest.* 2009 Sep;119(9):2475-87. doi: 10.1172/JCI38605
6. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, et al. Traces of human migration in *Helicobacter pylori* populations. *Science.* 2003 Mar 7;299(7):1582-5. doi: 10.1126/science.1080857
7. Pajares J, Pajares R, Gisbert J. *Helicobacter pylori*: resistencia a los antibióticos *Rev Esp Enferm Dig.* 2007 Feb;99(2):63-70. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082007000200001
8. Branca G, Spanua T, Cammarota G, Schitoc A, Gasbarrinid A, Gasbarrinib G, et al. High levels of dual resistance to clarithromycin and metronidazole and in vitro activity of levofloxacin against *Helicobacter pylori* isolates from patients after failure of therapy. *Int J Antimicrob Agents.* 2004 Nov;24(5):433-8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.02.032
9. Henao S, Otero W, Angel L, Martínez J. Resistencia primaria a metronidazol en aislamientos de *Helicobacter pylori* en pacientes adultos de Bogotá, Colombia. *Rev Col Gastroenterol.* 2009 Ene;29;24(1):10-15. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=337731591005>
10. Gutiérrez O, Otero W. Resistencia de *Helicobacter pylori* al metronidazol en Colombia. *Rev Col Gastroenterol.* 1998;12(1):31-5.
11. Alvarez A, Moncayo JI, Santacruz J, Santacoloma M, Corredor LF, Reinoso E. Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the western central region of Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Sep;53(9):4022-4. doi: 10.1128/AAC.00145-09.
12. Yepes C, Rodríguez A, Ruiz A, Ariza B. Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. *Acta Med Colomb.* 2008;33:11-14. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=163113349003>
13. Khan R, Nahar S, Sultana J, Ahmad MM, Rahman M. T2182C mutation in 23S rRNA is associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates

- obtained in Bangladesh. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2004 Sep;48(9):3567-9. doi: 10.1128/AAC.48.9.3567-3569
14. Henao S, Quiroga A, Martínez J, Otero W. Resistencia primaria a claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol.* 2009 Mar 26;24(2):110-14. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=337731592004>
 15. Godoy A, Ribeiro M, Benvenuto Y, Vitiello L, Miranda MC, Mendonça S, et al. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterol.* 2003 Aug 11;3(20):1-6. doi: 10.1186/1471-230X-3-20
 16. Wu H, Shi XD, Wang HT, Liu JX. Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and amoxicillin. *J Antimicrob Chemother.* 2000 Jul;46(1):121-3. doi: 10.1093/jac/46.1.121
 17. Mégraud F. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut.* 2004 Sep;53(9):1374-84. doi: 10.1136/gut.2003.022111
 18. Gisbert JP, Gonzales L, Calver X, Roque M, Gabriel R, Pajares JM. *Helicobacter pylori* eradication: proton pump inhibitor versus raditidine bismuth citrate plus two antibiotics for 1 week: a meta-analysis of efficacy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000 Sep;14(9):1141-50. doi: 10.1046/j.1365-2036.2000.00809.x
 19. O'Morain C, Borody T, Farley A, De Boer WA, Dallaire C, Schuman R, et al. Efficacy and safety of single-triple capsules of bismuth biscaltrate, metronidazole and tetracycline, given with omeprazole, for the eradication of *Helicobacter pylori*: an international multicentre study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003 Feb;17(3):415-20. doi: 10.1046/j.1365-2036.2003.01434.x
 20. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med.* 2002 Oct 10;347(15):1175-86. doi: 10.1056/NEJMra020542
 21. Domingo D, Alarcon T, Vega AE, Garcia JA, Martinez MJ, Lopez M. Microbiological factors that influence the eradications of *Helicobacter pylori* in adults and children. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002 Nov;20(9):431-4. doi: 10.1016/s0213-005x(02)72838-3
 22. Chihu L, Ayala G, Mohar A, Hernandez A, Herrera GR, Fierros G, et al. Antimicrobial resistance and characterization of *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican adults with clinical outcome. *J Chemother.* 2005 Jun;17(3):270-76. doi: 10.1179/joc.2005.17.3.270
 23. De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Valle ND, Burattini O, et al. Claritromycin resistance and *Helicobacter pylori* genotypes in Italy. *J Microbiol.* 2006 Dec;44(6):660-4. Disponible en: <https://www.msk.or.kr/html/?pmode=archives&smode=view&TVIDX=382&THEIDX=2460>
 24. Elviss NC, Owen RJ, Xerry J, Walker AM, Davies K. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance patterns and genotypes in adult dyspeptic patients from a regional population in North Wales. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Aug;54(2):435-40. doi: 10.1093/jac/dkh343
 25. Zschausch HC, Han SR, Meyer HG, Maeurer MJ. No association between *Helicobacter pylori* genotypes and antibiotic resistance phenotypes within families. *Helicobacter.* 2002 Dec;7(6):364-6. doi: 10.1046/j.1523-5378.2002.00111.x
 26. Baglan PH, Bozdayi G, Ozkan M, Ahmed K, Mithat A, Ozden A. Clarithromycin resistance prevalence and *iceA* gene status in *Helicobacter pylori* clinical isolates in

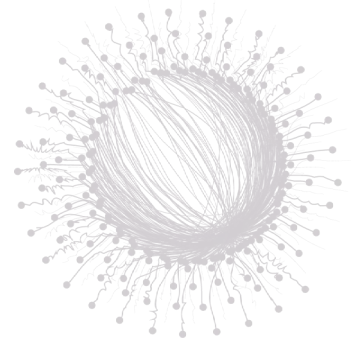
- Turkish patients with duodenal ulcer and functional dyspepsia. *J Microbiol.* 2006 Aug;44(4):409-16. Disponible en: <https://www.msk.or.kr/html/?pmode=archives&smode=view&TVIDX=378&THEIDX=2412>
27. Damaso D, Alarcon T, Prieto N, Lopez M. Relationship between antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Rev Esp Quimioter.* 1999 Dec;12(4):340-45. PMID: 10855013
 28. Cellini L, Grande R, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Capodicasa S, Marzio L. Analysis of genetic variability, antimicrobial susceptibility and virulence markers in *Helicobacter pylori* identified in Central Italy. *Scand J Gastroenterol.* 2006 Mar;41(3):280-7. doi: 10.1080/00365520510024223
 29. Alfaresi MS, Abdulsalam AI, Elkoush AA. Analysis of *Helicobacter pylori* antimicrobial susceptibility and virulence genes in gastric mucosal biopsies in the United Arab Emirates. *Indian J Gastroenterol.* 2007 Sep;26(5):221-4. PMID: 18227572
 30. Toro C, García-Samaniego J, Alarcón T, Baquero M. Association among anti-CagA antibody detection, antibiotic susceptibility, and peptic ulcer in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003 Mar;21(3):137-41. doi: 10.1016/s0213-005x(03)72902-4
 31. Van der Ende A, Van Doorn LJ, Rooijackers S, Feller M, Tytgat G, Dankert J. Clarithromycin susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolates with identical randomly amplified polymorphic DNA-PCR genotypes cultured from single gastric biopsy specimens prior to antibiotic therapy. *J Clin Microbiol.* 2001 Jul;39(7):2648-51. doi: 10.1128/JCM.39.7.2648-2651.2001
 32. Yakoob J, Fan X, Hu G, Yang H, Liu L, Liu H, et al. Polyclonalization of *Helicobacter pylori* among Chinese subjects. *Clin Microbiol Infect.* 2001 Apr;7(4):187-92. doi: 10.1046/j.1198-743x.2001.00226.x
 33. Wang WH, Wong BC, Mukhopadhyay AK, Berg DE, Cho CH, Lai KC, et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection with dual resistance to metronidazole and clarithromycin in Hong Kong. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000 Jul;14(7):901-10. doi: 10.1046/j.1365-2036.2000.00795.x
 34. Wong BC, Wang W, Berg D, Fung F, Wong K. High prevalence of mixed infections by *Helicobacter pylori* in Hong Kong: metronidazole sensitivity and overall genotype. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001 Apr;15(4):493-503. doi: 10.1046/j.1365-2036.2001.00949.x
 35. Malaty HM, el-Zimaity HM, Genta RM, Klein PD, Graham DY. Twenty-minute fasting version of the US 13C-urea breath test for the diagnosis of *H. pylori* infection. *Helicobacter.* 1996 Sep;1(3):165-7. doi: 10.1111/j.1523-5378.1996.tb00032.x
 36. Dunn B, Campbell G, Perez-Perez G, Blaser M. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 1990 Jun;265(16):9464-9. doi: 10.1016/S0021-9258(19)38872-6
 37. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. vol. 27-1. USA; Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
 38. McFarland Standards Barium Sulfate Turbidity, Technical Data Sheet No 500 Rev.2: PLM Microbiologicals, INC; 2001. pp 231.
 39. Alzate A. Medidas de concordancia: El índice de Kappa. *Rev. Colombia Médica.* 2008;65(9):65

40. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995 Jun 28;270(30):17771-7. doi: 10.1074/jbc.270.30.17771
41. Mégraud F, Corti R. Bacterial resistance of *Helicobacter pylori* in the world in 2009. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2009 Dec;39(4):282-90. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199317368014>
42. Broutet N, Tchamgoué S, Pereira E, Lamouliatte H, Salamon R, Mégraud F. Risk factors for failure of *Helicobacter pylori* therapy—results of an individual data analysis of 2751 patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003 Jan;17(1):99-109. doi: 10.1046/j.1365-2036.2003.01396.x
43. Castro M, Vargas J. Infection with *Helicobacter pylori*. Prevalence, research and impact of antibiotic resistance. *Rev Esp Enferm Dig*. 2009 Nov;101(811):743-56. doi: 10.4321/s1130-01082009001100001
44. Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. Correlation between substitutions in penicillin-binding protein 1 and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol*. 2007 Jan;51(10):939-44. doi: 10.1111/j.1348-0421.2007.tb03990.x
45. Gerrits MM, Schuijffel D, van Zwet AA, Kuipers EJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jul;46(7):2229-33. doi: 10.1128/AAC.46.7.2229-2233.2002
46. Guzmán K, Montenegro L, Pazos A. The *Helicobacter pylori* single nucleotide polymorphisms SNPs associated with multiple therapy resistance in Colombia. *Front. Microbiol*. 2023 Jul 7;14(1): 198325. doi: 10.3389/fmicb.2023.1198325
47. Guzman K, Pazos A. *Helicobacter pylori* SNPs associated to tetracycline, clarithromycin and amoxicillin resistance in Colombia. *Annals of Oncology*. 2021 Jul; 32(3):187- 8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.05.318>
48. Ford AC, Forman D, Hunt R, Yuan Y, Moayyedi P. *Helicobacter pylori* eradication for the prevention of gastric neoplasia. *Cochrane Database of Syst Rev*. 2015 Jul 22; 2015(7):CD005583. doi: 10.1002/14651858.CD005583.pub2
49. Chiang TH, Chang WJ, Chen LS, Yen AM, Fann JC, Chiu SY, et al. Mass eradication of *Helicobacter pylori* to reduce gastric cancer incidence and mortality: a long-term cohort study on Matsu Islands. *Gut*. 2021 Feb; 70(2):243-250. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322200
50. Kumar S, Metz DC, Ellenberg S, Kaplan DE, Goldberg DS. Risk factors and incidence of gastric cancer after detection of *Helicobacter pylori* infection: A large cohort study. *Gastroenterology*. 2020 Feb; 158(3):527-536. doi: 10.1053/j.gastro.2019.10.019
51. Piazuolo MB, Bravo LE, Mera RM, Camargo MC, Bravo JC, Delgado AG, et al. The Colombian chemoprevention trial: 20-year follow-up of a cohort of patients with gastric precancerous lesions. *Gastroenterology*. 2021 Mar; 160(4):1106-1117.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2020.11.017
52. Hunt RH, Yaghoobi M. The esophageal and gastric microbiome in health and disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017 Mar; 46(1):121–141. doi: 10.1016/j.gtc.2016.09.009

53. Borbet TC, Zhang X, Müller A, Blaser MJ. The role of the changing human microbiome in the asthma pandemic. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Dec; 144(6):1457–1466. doi: 10.1016/j.jaci.2019.10.022
54. Miftahussurur M, Nusi IA, Graham DY, Yamaoka Y. Helicobacter, hygiene, atopy, and asthma. *Front Microbiol*. 2017 Jun; 8:1034. doi: 10.3389/fmicb.2017.01034
55. Fontham TH, Correa P, Mera R, Bravo LE, Bravo JC, Piazuelo MB, et al. Duration of exposure, a neglected factor in chemoprevention trials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Nov;14(11):2465–6. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0518
56. Megraud F, Corti R. Resistencia bacteriana de Helicobacter pylori en el mundo año 2009. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*. 2009 Dic;39(4):282-90. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199317368014>
57. Mégraud F, Lehours P. Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Apr;20(2):280–322. doi: 10.1128/CMR.00033-06
58. Ortiz R, Calafatti SA, Moraes LA, Deguer M, Ecclissato CC, Marchioretto MA, et al. Effect of Helicobacter pylori infection and acid blockade by lansoprazole on clarithromycin bioavailability. *Braz J Med Biol Res*. 2007 Mar;40(3):383-9. doi: 10.1590/s0100-879x2007000300014
59. Gatta L, Di Mario F, Vaira D, Franzé A, Rugge M, Pilotto A, et al. Helicobacter pylori eradication: are we really all equal? A controlled study in native and immigrant population. *Intern Emerg Med*. 2011 Feb;6(1):35-9. doi: 10.1007/s11739-010-0443-0

CAPÍTULO 4.

Ancestros filogeográficos de *Helicobacter pylori*



INTRODUCCIÓN

Los seres humanos fueron infectados por *H. pylori* por lo menos hace 50000 años y es probable que durante toda su evolución. Esta relación antigua ha permitido la adaptación mutua y coevolución de la bacteria con su hospedero. Mediante la comparación de secuencias de nucleótidos de diferentes cepas y la medición de las tasas máximas de mutación *in vivo*, es posible calcular el tiempo mínimo que *H. pylori* y *Homo sapiens* evolucionaron a la par de su ancestro particular y de ubicación geográfica común (1). La diversidad genética entre cepas de *H. pylori* disminuye con la distancia geográfica de la población de *H. pylori* y África Oriental, al igual que disminuye la diversidad genética entre los seres humanos (2). En conjunto, estos datos muestran que *H. pylori* coevolucionó con los seres humanos, al menos desde su éxodo de África y probablemente a lo largo de sus 900000 años de evolución (3, 4, 5, 6, 7).

4.1 RELACIONES ANCESTRALES DE *Helicobacter pylori*

Las nuevas poblaciones de *H. pylori* derivan su conjunto de genes de poblaciones ancestrales que se originaron en África, Asia Central y Asia Oriental (5, 8, 9-11). La propagación y mezcla posterior de las cepas se atribuyen a los flujos migratorios humanos, como la colonización prehistórica de la Polinesia y de América, la introducción de la agricultura neolítica a Europa, la expansión bantú en África y el comercio de esclavos (5, 8). Además, es importante estudiar la filogenia de las cepas de *H. pylori* como una herramienta discriminatoria que define los patrones de migración humana (12), así como las innovaciones metodológicas de la biología sintética que aportan para dilucidar y desentrañar la estructura motriz flagelar generadora de alto torque de *Helicobacter pylori*, que probablemente evolucionó del último ancestro común del filum *Campylobacterota* (13).

La migración de humanos a América ocurrió cuando pobladores de Asia atravesaron el estrecho de Bering, se extendieron por todo el continente y permanecieron aislados durante, al menos, 12000 años, hasta la llegada de los españoles y los africanos en el siglo XV (6). Durante los últimos 550 años, estos tres grupos conviven, interactúan y se mezclan, lo que ha originado poblaciones genéticamente diversas, tanto de *H. pylori* como de humanos (14). Estudios sobre cepas que colonizaron a los humanos,

durante su prolongado aislamiento en América, evidencian que adquirieron la isla de patogenicidad PAI-*cag*, posiblemente por recombinación entre las cepas autóctonas de amerindios y cepas traídas por los emigrantes africanos y europeos y propagadas durante los últimos cinco siglos (8, 15).

Luego de la llegada de emigrantes a Nariño, el nivel de mestizaje permitió que, en un área geográfica pequeña, se representen diferentes grupos étnicos, que responden ante la infección con diferentes filogenotipos de *H. pylori* de forma variable. La variabilidad geográfica en la incidencia de cáncer gástrico se explica, en parte, por diferencias en los filogenotipos de la bacteria. La asociación entre la enfermedad, el origen ancestral de *H. pylori* y diferentes grupos étnicos se conoce parcialmente (16). Determinar el origen ancestral de *H. pylori* permite inferir sobre la incidencia de cáncer gástrico en distintos grupos humanos; sin embargo, variantes genéticas en el hospedero le confieren un papel importante en la susceptibilidad a la enfermedad (8, 15, 17, 18). Los sistemas genéticos más utilizados en estudios étnicos son el ADN mitocondrial (mtADN) y la región no recombinante del cromosoma Y. Ambos son sistemas haploides que no se recombinan y que se heredan uniparentalmente, por lo que preservan la historia de los linajes paternos y maternos presentes en las poblaciones (12, 14).

4.2 TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS MLST DE *Helicobacter pylori*

Existen varios métodos para tipificar *H. pylori* con base en la diversidad de secuencias de genes estructurales (*housekeeping*); los sistemas de restricción-metilación (R-M); los motivos EPIYA del gen *cagA*; la diversidad de alelos de *vacA*, *iceA*, *rpoB*, *babA* y *hopQ*, el gen *16S rRNA* y los elementos transponibles ISHp60 (12, 13). Estas metodologías permiten agrupar geográficamente cepas de *H. pylori* bajo un patrón de distribución similar al patrón de los humanos; permiten estudiar su co-evolución y utilizarlas como marcadores moleculares de las migraciones humanas (12). Esta variación geográfica de las características genéticas de *H. pylori* es un factor que contribuye a la variación geográfica en la incidencia de cáncer gástrico (19, 20). Otros estudios reportan que las diferencias geográficas en la incidencia de cáncer gástrico en áreas con prevalencia de infección similares se explican, al menos, por tipificación de secuencias multilocus (MLST) de genes estructurales de *H. pylori* (17).

La tipificación de secuencias multilocus MLST de *H. pylori* se establece por caracterización de las secuencias concatenadas de siete genes estructurales o de mantenimiento *atpA*, *efp*, *ureI*, *ppa*, *mutY*, *trpC*, *yphC* (15, 17). Al considerar que los genes se encuentran en diferentes locus en el genoma, esta caracterización se conoce como MLST o multilocus (8). Con esta metodología, se establecen seis patrones filogeográficos o poblaciones de *H. pylori*: hpAfrica1, hpAfrica2, hpNEAfrica, hpEAsia, hpAsia2 y hpEurope (4, 8). A su vez, hpAfrica1 se subdivide en las subpoblaciones: hspSAfrica y hspWAfrica. hpEAsia se subdivide en las subpoblaciones: hspEAsia, hspAmerindio y hspMaori. Incluso se establecen patrones filogeográficos ancestrales como población: ancestral Europa1, ancestral Europa2, ancestral África1, ancestral EastAsia y ancestral Africa2 (8), que permiten estudiar los ancestros filogeográficos y sugieren rutas migratorias humanas.

Conocer el origen ancestral de las poblaciones de *H. pylori* permite relacionarlo con la incidencia de cáncer gástrico en áreas geográficas particulares. Los países con alta incidencia de cáncer gástrico poseen cepas con genotipo que se incluye en la población hpEAsia. Por el contrario, áreas geográficas con baja incidencia de CG se asocian con cepas de genotipo africano: hpNEAfrica, hpAfrica1 o hpAfrica2 (17). Estas diferencias geográficas en la incidencia de cáncer gástrico en áreas con prevalencia de infección similares (los enigmas de África y Asia) se explican por los diferentes genotipos de *H. pylori*.

Los estudios clásicos de MLST de *H. pylori* los iniciaron Falush D, Achtman M y col. (2003); ellos encontraron que los mestizos o amerindios tienen genotipo europeo hpEurope; se presume que se adquirió de las cepas que introdujeron los inmigrantes de Europa durante la Colonia (8, 18). No obstante de Sablet y col; Pazos y col (2011), mediante un análisis MLST preliminar en cepas colombianas, sugirieron que aunque las cepas aisladas de pacientes provenientes de Túquerres se ubican en el patrón filogeográfico hpEurope, las cepas provenientes de Tumaco se incluyen en su mayoría en el patrón filogeográfico hspWAfrica, lugar donde los mercaderes capturaron esclavos de África Occidental; unas pocas cepas se incluyen en la población del sur de África hspSAfrica, posiblemente traída al oeste de África por emigrantes del sur de África para que los captaran los mercaderes, y un buen número de cepas de Tumaco tiene genotipo hpEurope. Este último genotipo se describió por primera vez en afrodescendientes del Continente Americano (16, 21).

4.3 ORIGEN FILOGEOGRÁFICO DE *Helicobacter pylori* EN POBLACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO-COLOMBIA

A *H. pylori* se lo considera un carcinógeno tipo I (22); sin embargo, una pequeña proporción de los individuos infectados desarrollan úlcera o cáncer gástrico (4). Recientes estudios reportan que las diferencias geográficas en la incidencia de cáncer gástrico en áreas con prevalencia de infección similares se explican, en parte, por el origen filogeográfico de las cepas de *H. pylori* (17). Esta bacteria coloniza a los humanos al menos desde hace 50000 años e incluso se cree que coevolucionó con ella, para establecer en ese transcurso una interacción bacteria-hospedero que indujo procesos de selección y variabilidad genética (4). Algunos autores reportan que, en la mayoría de los casos, *H. pylori* puede infectar sin desarrollar la enfermedad; sin embargo, la incidencia de cáncer gástrico depende de diversos factores: uno de los más importantes es la zona geográfica y, en esta, los filogenotipos de *H. pylori* juegan un papel determinante (8, 17). Investigaciones previas reportan que la patogenicidad de *H. pylori* se relaciona íntimamente con el lugar de procedencia (16, 17). Mediante un análisis de secuencias multilocus (MLST) de siete genes estructurales (*housekeeping*), *atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI*, *yphC*, es posible clasificar poblaciones de *H. pylori* según el área geográfica de la que posiblemente migraron con los humanos (8, 23). Investigaciones previas encontraron que las poblaciones con alta incidencia de cáncer gástrico se relacionan filogeográficamente con el genotipo hpEAsia, hpEurope 1 y 2 y las poblaciones de baja incidencia de cáncer gástrico se asocian con cepas cuyo genotipo es hpAfrica1 (16, 17).

El propósito de esta investigación fue determinar los ancestros filogeográficos de *H. pylori* y su relación con lesiones precursoras de cáncer gástrico en las dos poblaciones

estudiadas. Se incluyeron 252 cepas de *H. pylori* de las dos poblaciones. Tipificación de secuencias multilocus-MLST de siete genes estructurales permitió, por el método de agrupamiento entre vecinos (*Neighbour-joining*), establecer los patrones filogeográficos de *H. pylori*.

Para los análisis evolutivos, se utilizaron los *software* Geneious Pro 5.4.3 y Mega 5.0. Se aplicó la prueba exacta de Fisher y χ^2 para evaluar la asociación entre los ancestros filogeográficos y las lesiones precursoras de cáncer gástrico.

Se encontró que el ancestro filogeográfico hpEurope predomina en las cepas aisladas de pacientes de Túquerres, en contraste con las cepas provenientes Tumaco que se incluyen en los ancestros filogeográficos hspWAfrica, hspSAfrica y hpEurope. Las cepas de *H. pylori* de las dos poblaciones se clasifican como hpEurope o hpAfrica1 y ninguna cepa se clasifica como hpEAsia (hspAmerind o hspEAsia).

Se encontraron dos nuevos agrupamientos en el árbol filogeográfico, no reportados en la literatura que, por su sitio de ubicación, potencialmente representan nuevas subpoblaciones MLST de *H. pylori* en Suramérica. Se observó mayor frecuencia del ancestro hpEurope en pacientes con metaplasia intestinal (82,2%) que en pacientes con gastritis atrófica multifocal (17%), $P = 0,051$. Este hallazgo sugiere que los pacientes de Túquerres con gastritis atrófica infectados con el filogenotipo europeo se asocian a lesiones precursoras de cáncer gástrico más avanzadas, como la metaplasia intestinal. El filogenotipo hpEurope identificado en aislados de la región de bajo riesgo de cáncer gástrico se asocia al gen de virulencia *cagA* (+), en contraste el filogenotipo hpÁfrica1 de esta misma región se asocia al marcador de baja patogenicidad *cagA* (-), $P = 0,042$. Se observó asociación entre los ancestros filogeográficos y la virulencia de las bacterias. La frecuencia del ancestro hpEurope asociado al genotipo virulento fue 89,8%, mayor que 75% del ancestro hpAfrica1 asociado al mismo genotipo, $P = 0,012$.

4.3.1 Tipificación por MLST de genes estructurales de *Helicobacter pylori*

La tipificación de secuencias multilocus (MLST) de *H. pylori* se caracterizó por PCR y secuenciación de siete genes estructurales (*housekeeping*) que codifican proteínas de carácter constitutivo encargadas del metabolismo. Los genes *atpA*, *efp*, *ureI*, *ppa*, *mutY*, *trpC*, *yphC* se amplificaron por PCR. Los genes, su función, los cebadores y el tamaño de los amplificados se encuentran disponibles en los manuales de procedimientos del Laboratorio de Microbiología Molecular del Grupo de Investigación Salud Pública de la Universidad de Nariño. Las secuencias de los cebadores se obtuvieron de la base de datos de MLST para *H. pylori*, disponible en <http://pubmlst.org/helicobacter/>, algunas descritas previamente por Achtman y col (8).

4.3.2 PCR para genes estructurales de *Helicobacter pylori*

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo bajo condiciones idénticas para los 7 genes, en un volumen final de 50 μ l de una solución que contenía buffer de PCR 1X; $MgSO_4$ 2,0 mM; dNTPs 0,1 mM; 0,2 μ M de cada cebador; 1,0 U de ADN *taq* polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) y 20 ng de ADN genómico. La

amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Bio Rad T-100[®]) con ciclos similares para los 7 genes, ya que los amplificadores se encontraron en un rango de 350-650 pb y, según Tay y col. (2009), (24), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 30 s; 44 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 55 °C por 30 s y extensión a 68 °C por 1 min. El ciclo final de extensión fue a 68 °C por 5 min.

4.3.3 Electroforesis para 7 genes estructurales de *Helicobacter pylori*

Se corrieron 20 µl del producto de PCR en gel de agarosa al 1,5% con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio, en una cámara de electroforesis (Thermo Scientific[®]), a 70 V, 0,16 A por 1 h. Posteriormente, el ADN se visualizó en un transiluminador (Kodak[®]) acoplado a un fotodocumentador (Macintosh HD[®]). Para determinar el tamaño de los amplificadores de todos los genes, se utilizó un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen[®]). El tamaño de los genes osciló entre 398 a 627 pb dependiendo del gen. Para garantizar la alta calidad de los amplificadores, 30 µl de producto de PCR se utilizaron en la purificación enzimática del ADN con ExoSAP-IT (Affymetrix[®]). Se incubó a 37 °C por 15 min para degradar y remover remanentes de oligonucleótidos y dNTPs. Una incubación final a 80 °C por 15 min permitió la inactivación de la enzima ExoSAP-IT.

4.3.4 Secuenciación de ADN de genes *housekeeping*

Se sometieron 20 ng de producto del amplificado, purificado y dispensado en platos de 96 pozos, a reacciones de secuenciación automatizada de ADN en ambos sentidos, con los cebadores descritos en el manual de procedimientos. Se usó BigDye (AB, versión 3.1) para la síntesis de ADN a partir de las plantillas y dNTPs marcados con fluorocromos específicos para cada nucleótido (24).

Las secuencias de nucleótidos marcadas con fluorocromos se detectaron por electroforesis capilar en un analizador de secuencias de ADN ABI 3730x1, que produjo un electroferograma y la secuencia alfabética de nucleótidos en archivo fasta.abs.

4.3.5 Análisis de secuencias multilocus

Se compararon los genotipos MLST de *H. pylori* identificados con los descritos en otras zonas geográficas del mundo, con el fin de establecer su posición en el árbol filogeográfico. El análisis bioinformático se realizó en dos programas que se cargaron con las secuencias de los siete genes estructurales, con las secuencias de la cepa control ATCC 26695 de *H. pilory* y con las publicadas en la base de datos pubMLST (25). El *software* Geneious (Versión Pro 5.4.3) se utilizó para el ensamblaje y alineamiento de secuencias; se editaron las secuencias; las secuencias consenso se compararon con las secuencia consenso de los 7 genes estructurales de la cepa control ATCC 26695 antes de su edición final y concatenación.

La determinación del haplotipo de cada cepa a una variante fileogeográfica en particular se realizó con el programa MEGA (Versión 5.0) (23, 24). Se compararon las secuencias consenso concatenadas de cada cepa con las secuencias globales. El método Neighbor comparativo permitió deducir la estructura de la población y la generación del árbol filogenético (8, 23, 24). En resumen, se compararon 3584 secuencias concatenadas de

genes estructurales de 252 aislamientos con las correspondientes secuencias de 745 cepas obtenidas de la base de datos pubMLST (25). El análisis comparativo generó el árbol filogenético y asignó cada cepa a uno de los 10 haplotipos ancestrales de *H. pylori*.

4.3.6 Generación del árbol filogeográfico de *Helicobacter pylori*

Los métodos para el análisis evolutivo en MEGA 5,0 son los siguientes: las relaciones evolutivas se infirieron por el método de agrupamiento de vecinos (*Neighbor-Joining*), que generó un árbol de consenso “árbol de mejor conjetura” derivado de 10000 réplicas. Las ramas correspondientes a las poblaciones se reprodujeron en menos del 50%; las demás réplicas colapsaron. El árbol se dibujó a una escala de 0,005, con la longitud de las ramas en las mismas unidades utilizadas para el cálculo de las distancias evolutivas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando los parámetros de *Kimura 2*, que se sustenta en el número de sustituciones de nucleótidos por sitio en cada secuencia concatenada. El análisis incluyó un total de 997 aislamientos: 252 aislamientos de este estudio y 745 cepas globales, y un tamaño de 3406 pb por secuencia concatenada de cada aislamiento.

4.4 RESULTADOS CAPÍTULO 4. ANCESTROS FILOGEOGRÁFICOS DE *Helicobacter pylori*

4.4.1 Origen ancestral de *Helicobacter pylori* en poblaciones de Nariño

Se analizó ADN genómico de 309 aislados de *H. pylori* obtenidos de 133 pacientes de Tumaco y 149 de Túquerres. De las 309 muestras de ADN, 252 pasaron al análisis por MLST, de las cuales 121, de 252, eran de Tumaco (48%) y 52% de Túquerres, porque en ellas se logró la amplificación por PCR de los 7 genes estructurales (Foto 1) y secuencias concatenadas sin bases ambiguas de alta calidad. Se compararon 3584 secuencias de los 252 aislamientos con las correspondientes secuencias de 745 cepas globales (25) y se asignaron a tres de los diez ancestros filogeográficos de *H. pylori*.

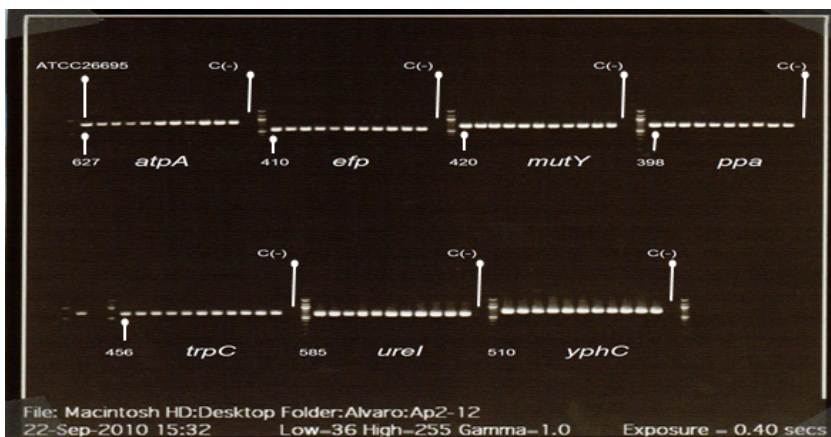


Foto 1. Patrón electroforético de productos de amplificación por PCR de siete genes estructurales (*housekeeping*) de *Helicobacter pylori* para el análisis MLST

Se observan bandas de peso molecular (flechas) para cada uno de los fragmentos amplificados. Los carriles correspondientes a los controles positivo (ATCC26695) y negativo C(-) (agua destilada) se señalan con flechas en la parte superior de las bandas. En la parte inferior de las bandas, el nombre de cada gen. Al inicio y final de cada lote de muestras amplificadas, se observa el marcador de tamaño molecular de 100 pb. Fuente: esta investigación.

El análisis MLST de las cepas de las dos poblaciones estudiadas encontró que el ancestro filogeográfico hpEurope predomina en las cepas aisladas de pacientes de Túquerres, una zona habitada por mestizos, en contraste con las cepas provenientes Tumaco, zona habitada en su mayoría por afrodescendientes, que se incluyen en los ancestros filogeográficos hspWAfrica, hspSAfrica y hpEurope, coincidente con un estudio previo (21). Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de *Helicobacter pylori* en ancestros filogeográficos según poblaciones de Nariño

Ancestro filogeográfico	Tumaco		Túquerres	
	n	%	n	%
HpEurope	63	52	131	100
HspWAfrica	28	23		0
HspSAfrica	30	25		0
Total	121	100	131	100

Las cepas de *H. pylori* de Tumaco se clasifican en tres poblaciones filogeográficas de *H. pylori*; 28, de 121 (23%), se agrupan en la subpoblación del oeste de África, (hspWAfrica), lugar donde los mercaderes de esclavos reclutaron africanos después de la Colonia. En mayor proporción, 30, de 121 (25%), se relacionan con cepas del Sur de África, (hspSAfrica), donde aparentemente los humanos emigraron del sur al oeste de Africa a tiempo para que los reclutaran los mercaderes (72). La mayor cantidad de cepas: 63, de 121 (52%), expresa marcadores europeos (hpEurope); este genotipo en afrodescendientes del Continente Americano se ha descrito en un estudio previo (21). Por otra parte, todas las 131 cepas estudiadas de Túquerres (100%) se agrupan en el filogenotipo europeo (hpEurope), consistente con los estudios clásicos de tipificación MLST realizados por Atchman y col. (1999), que encontró que todos los mestizos poseen *H. pylori* con patrón filogeográfico hpEurope (18), presumiblemente adquirido de las cepas que llegaron a las Américas en la época de la colonización europea hace más de 500 años (4, 8, 17). Tabla 1.

4.4.2 Arquitectura del árbol filogeográfico de *Helicobacter pylori*

La arquitectura del árbol filogeográfico muestra que las cepas de *H. pylori* de las dos poblaciones se clasifican como hpEurope o hpAfrica1 y ninguna cepa clasifica como hpEAsia (hspAmerind o hspEAsia). Figura 1. Se observan en el árbol dos hallazgos novedosos: uno, que la subpoblación hspAmerind (ramas de color azul claro en el árbol) se agrupa entre los aislados de origen europeo hpEurope y los de origen africano hpsWAfrica de este estudio y no cerca de las poblaciones hspAsia y hspMaori, como lo describen otros trabajos, y la asocian con las migraciones de asiáticos al continente americano antes de la Colonia (4, 8, 21). Es posible que los aislados que se agrupan cerca de los amerindios y europeos son mezclas entre europeos, africanos y amerindios (2, 23). Por otra parte, un número considerable de aislados de este estudio se agrupan en posiciones nuevas (no descritas) en el árbol (llaves en el árbol). Por su sitio de agrupación al compararlo con árboles descritos previamente, estos, potencialmente, representan nuevas subpoblaciones MLST, que se encuentran en Suramérica.

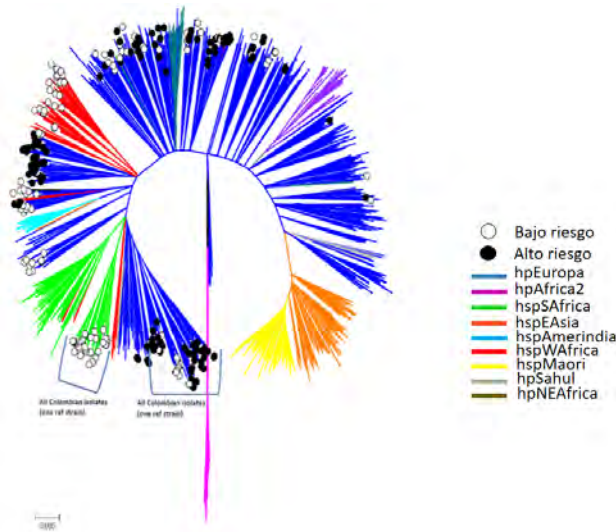


Figura 1. Arquitectura del árbol filogeográfico de *Helicobacter pylori* realizado por MLST de muestras provenientes de regiones de alto y bajo riesgo de cáncer gástrico de Colombia. El árbol se construyó por el método de agrupamiento entre vecinos (*Neighbor-Joining*). Los aislados de Tumaco (LR isolate) se marcaron con (o); y de la zona de Túquerres (HR isolates) se marcaron con (●). Las ramas a color representan los ancestros de diferente origen filogeográfico del mundo clasificados en estudios previos. Las ramas del árbol y clados se han dibujado a una escala de 0,005, para representar la distancia evolutiva. Las distancias evolutivas se estimaron aplicando los parámetros de *Kimura 2*. Diferentes poblaciones (hp) y subpoblaciones (hsp) de *H. pylori* se describen en la parte derecha del árbol.

4.4.3 Ancestros filogeográficos de *Helicobacter pylori* según procedencia, género y tipo de gastritis

El análisis MLST no encontró asociación entre los ancestros filogeográficos de *H. pylori* y el tipo de gastritis. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las prevalencias de los ancestros hpAfrica1 y hpEurope, tanto en pacientes con gastritis no atrófica como atrófica (23% vs. 25%) y (77% vs. 75%) respectivamente, $P = 0,84$; sin embargo, la clasificación de los aislados por el tipo de riesgo de cáncer gástrico se encontró asociada con el origen filogeográfico de las cepas, $P = 0,00$. Tabla 2. No se encontraron diferencias entre el género de los pacientes y los ancestros filogeográficos de *H. pylori*.

Tabla 2. Ancestros filogeográficos según procedencia, género y tipo de gastritis

Característica	Ancestro de <i>H. pylori</i>					
	n	hpAfrica1		hpEurope		P
		n	%	n	%	
Procedencia						
Bajo riesgo	121	58	47,9	63	52,1	0,000
Alto riesgo	131	0	0	131	100	
Género						
Hombres	102	25	24,5	77	75,5	0,65
Mujeres	150	33	22,0	117	78,0	
Tipo de gastritis						
No-atrónica	206	47	23,0	159	77,0	0,84
Atrónica	44	11	25,0	33	75,0	

4.4.4 Ancestros filogeográficos según susceptibilidad antibiótica y virulencia de *Helicobacter pylori*

La prevalencia de resistencia a CLA y AMX del ancestro hpAfrica1 de *H. pylori* fue (18% y 20,1%), significativamente mayor que (8% y 11,8%) del ancestro hpEurope, respectivamente, $P < 0,05$. Tabla 3. Se observó asociación entre los ancestros filogeográficos y la virulencia de las bacterias; la frecuencia del ancestro hpEurope asociado al genotipo virulento fue 89,8% mayor que 75% del ancestro hpAfrica1, asociado al mismo genotipo, $P = 0,012$. Tabla 3.

Tabla 3. Ancestros filogeográficos según susceptibilidad y virulencia de *Helicobacter pylori*

Característica	Ancestro de <i>H. pylori</i>					
	n	hpAfrica1		hpEurope		P
		n	%	n	%	
Susceptibilidad-CLA						
Resistente	24	9	18,0	15	8,00	0,005
Sensible	213	41	82,0	172	92,0	
Susceptibilidad-AMX						
Resistente	32	10	20,1	22	11,8	0,05
Sensible	205	40	80,0	165	88,2	
Susceptibilidad-AMX+CLA						
Resistente	13	5	12,2	8	4,80	0,14
Sensible	194	36	87,8	158	95,2	
Genotipo						
Virulento	192	42	75,0	150	89,8	0,012
No-virulento	31	14	25,0	17	10,2	

4.4.5 Ancestros filogeográficos según gen *cagA* de *Helicobacter pylori*

En el estudio de la relación de los ancestros filogeográficos y el marcador de virulencia gen *cagA*(+), se encontró que la frecuencia del filogenotipo hpEurope de Tumaco asociado al gen *cagA*(+) fue mayor, 37,7%, que la frecuencia del filogenotipo hpAfrica1, 20%, asociado al mismo gen, $P = 0,042$. Tabla 4. Este hecho sugiere que el filogenotipo hpEurope identificado en aislados de la región de bajo riesgo de cáncer gástrico se asocia al gen de virulencia *cagA* (+); en contraste, el filogenotipo hpÁfrica1 de esta misma región se asocia al marcador de baja patogenicidad *cagA* (-), $P = 0,042$.

Se encontró que el ancestro filogeográfico hpEurope identificado en la totalidad de los aislados de Túquerres se asocia al gen *cagA* (+); su frecuencia fue mayor, 86,6%, que la frecuencia de este mismo filogenotipo, 13,4%, asociado al marcador *cagA* (-), $P = 0,002$. Tabla 4.

Tabla 4. Ancestros filogeográficos de *Helicobacter pylori* según gen *cagA*

Gen <i>cagA</i>	n	Ancestros-Tumaco				P	Ancestro-Túquerres		P
		hpEurope		hpAfrica1			hpEurope		
		n	%	n	%		n	%	
<i>cagA</i> (+)	39	26	37,7	13	20	0,019	123	86,6	0,002
<i>cagA</i> (-)	95	43	62,3	52	80		19	13,4	
Total	134	69	100	65	100		142	100	

4.4.6 Origen ancestral de los aislados de *Helicobacter pylori*

Los resultados de esta investigación determinaron que el origen filogeográfico de *H. pylori* de todos los habitantes de la Región Andina es europeo (hpEurope) y que las personas que viven en la Costa del Pacífico nariñense se han infectado con cepas de origen europeo o africano, con el predominio del primero. Estos resultados indican que los mestizos de la región montañosa de alto riesgo de cáncer gástrico perdieron sus cepas ancestrales amerindias, y que los mulatos de la región costera de bajo riesgo (26, 27) conservan las cepas de origen africano que, presumiblemente, adquirieron cuando sus ancestros las trajeron al Nuevo Mundo durante el comercio de esclavos. Se planteó la hipótesis referida a que los amerindios tienen cepas de origen hspAmerind que forman parte del grupo hpEAsia (8), pero los mestizos de la Región Andina en nuestro estudio se han infectado exclusivamente con cepas de origen europeo, hpEurope; es posible que las cepas hpEurope, por mecanismos no conocidos, incidieron en la desaparición gradual de las cepas indígenas hspAmerind (28).

Otro enfoque que explica este hallazgo se basa en la diversidad de genotipos de *H. pylori* observada en el árbol filogeográfico de este estudio, donde las cepas que se agrupan en poblaciones más diversas genéticamente, como hpEurope y hpAfrica1, tienen mayor probabilidad de recombinación y de conservar sus características ancestrales que cepas menos diversas, como la subpoblación hspEmerind. Si la diversidad es importante para conservar las características filogenéticas, la baja diversidad de cepas amerindias se vincula a su aparente tendencia a desaparecer. Esta observación sugiere que las cepas amerindias carecen de la diversidad necesaria para sobrevivir ante la alta diversidad presentada por otras poblaciones no amerindias (28). De hecho, una de las características de *H. pylori* es su gran diversidad genética, que le permite a cada cepa interactuar de forma particular con su hospedero y que influye en el resultado clínico. La amplia diversidad genómica de las cepas de *H. pylori* es el resultado de una alta tasa de mutación y un intercambio frecuente de material genético durante las infecciones por múltiples cepas de la bacteria (7, 29). *H. pylori* de diferentes áreas geográficas presenta una clara diferenciación filogeográfica y los estudios de las variantes genéticas sirven como marcadores de las migraciones humanas. Además, la distribución geográfica de las poblaciones de *H. pylori* permite correlacionarla con los diferentes resultados clínicos de la enfermedad a nivel mundial. La infección por *H. pylori* es una condición necesaria, pero no es un factor suficiente, en la carcinogénesis gástrica. El vínculo hipotético de la infección por *H. pylori* como factor causal de cáncer gástrico lo ha impugnado Holcombe (1992), al tomar como referencia varios países de África donde la infección es prácticamente universal, pero la incidencia de cáncer gástrico es baja. A este fenómeno, él lo denominó el “enigma africano” (30). Similar tendencia se observa en otras poblaciones del mundo y en la población de Tumaco-Nariño y, dado que el cáncer gástrico es una enfermedad multicausal, factores como la dieta, las coinfecciones y los filogenotipos de *H. pylori* se ofrecen como posibles explicaciones de ese “enigma africano”. Independiente de otros factores que pueden modular el riesgo de la adquisición de cáncer gástrico, el ancestro filogeográfico de las cepas de *H. pylori* es un factor determinante (17).

Los resultados derivados del árbol filogeográfico muestran que las cepas de *H. pylori* de las dos poblaciones se clasifican como hpEurope o hpAfrica1 y ninguna cepa clasifica como hpEAsia (hspAmerind o hspEAsia). Las cepas de Tumaco se clasifican en tres poblaciones. Una cantidad considerable se identifica con filogenotipos del oeste de África (hspWAfrica), lugar donde los mercaderes de esclavos captaron africanos después de la Colonia. Una mayor proporción se relaciona con cepas del sur de África, (hspSAfrica), donde aparentemente los humanos emigraron debido al desarrollo de la agricultura y la caza de animales salvajes, del sur al oeste de África, a tiempo para que los captaran los mercaderes (4); sin embargo, la mayoría de las cepas de Tumaco presenta marcadores europeos (hpEurope); en afrodescendientes del Continente Americano, este genotipo se reportó en un trabajo previo (21), pero en este trabajo se encontró identidad con hpEurope en más de la mitad de esa población afrodescendiente. Por otra parte, todas las cepas estudiadas de Túquerres se agrupan en el filogenotipo europeo (hpEurope), lo que es consistente con los estudios clásicos de tipificación MLST realizados por Atchman y col. (1999), que encontraron que todos los mestizos poseen *H. pylori* con patrón filogeográfico hpEurope (18); se presume que el filogenotipo europeo se adquirió de las cepas que llegaron a Suramérica en la época de la colonización europea hace más de 500 años (4, 8, 17).

4.4.7 Migraciones humanas y la historia evolutiva de *Helicobacter pylori*

Tras muchos años de migraciones humanas y de la permanente interacción con *H. pylori*, se establecieron, en la faz de la tierra, siete poblaciones filogenéticas de la bacteria, con un patrón de distribución geográfica particular en todos los continentes. Las cepas actuales de *H. pylori* tiene marcadores moleculares que revelan las migraciones de las poblaciones a través de los tiempos. La colonización de América, así como la trata de esclavos, introdujo cepas de Europa y África al Nuevo Mundo. La relación entre las propiedades del genoma de *H. pylori* y la incidencia de cáncer gástrico se vincula a la distribución geográfica de la bacteria; sin embargo, el conocimiento sobre este tema es incompleto, porque características del huésped participan en el desenlace de la enfermedad (5). Se estima que el organismo humano consiste en 10^{13} células eucariotas y 10^{14} células microbianas (31), donde *H. pylori* se considera un miembro importante de la microbiota humana que acompaña constantemente a *Homo sapiens* en su compleja historia migratoria (6).

Estudios de De Sablet y col., (2011), demostraron que las personas de la región de Túquerres tienen más daño histológico y en el ADN que las personas de la región de Tumaco. Este hallazgo se fundamentó en un incremento del daño oxidativo del ADN en las células infectadas por cepas hpEurope en comparación con hpAfrica1; este hecho sugiere que las diferencias son atribuibles al origen filogeográfico de las cepas. Si bien en nuestro estudio no se cuantifica aún el puntaje histológico que gradúa en una escala las alteraciones histológicas encontradas, las prevalencias de los ancestros hpAfrica1 y hpEurope son similares tanto en pacientes con gastritis atrófica como no atrófica. Estos datos aún no son concluyentes; no obstante, se observó que el filogenotipo hpEurope identificado en la mayoría de aislados de la región de bajo riesgo de cáncer gástrico se asocia al gen de virulencia *cagA* (+); en contraste, el filogenotipo hpÁfrica1 de esta

misma población se asocia al marcador de ausencia de la isla de patogenicidad *cagA* (-). En alguna medida, estos hallazgos apoyan la hipótesis referida a que las cepas de *H. pylori* de las dos regiones presentan importantes diferencias en la patogenicidad que se relacionan con su origen filogeográfico. Como se discutió previamente, otros factores, como la dieta, la susceptibilidad del hospedero y la virulencia de la bacteria, juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad.

4.4.8 Características de los ancestros filogeográficos

Un aporte al nuevo conocimiento es el referente a que se encontraron dos grupos de cepas, que se muestran entre llaves en el árbol filogeográfico (Figura 4), que consisten casi en su totalidad en cepas de este estudio. Por el sitio de agrupación de las ramas generadas de nodos divergentes con respecto a los árboles descritos previamente (4, 5, 21), potencialmente, estos grupos representan nuevas subpoblaciones MLST, que se encuentran en Suramérica. Posiblemente, este hallazgo en cepas de nuestro estudio requiere un análisis con base en la reproducibilidad del árbol, construido con otros métodos.

La evolución adaptativa o evolución divergente, como un proceso que describe la distribución de una o varias poblaciones en nichos biogeográficos, explica, en parte, la aparición de las nuevas subpoblaciones encontradas en este estudio. Los mecanismos de divergencia de las ramas en el árbol de un ancestro común (hpAfrica2) implican un proceso de evolución cuyas herramientas biológicas son la mutación y la selección natural. Es posible que la evolución adaptativa de las nuevas subpoblaciones que aparecen en el árbol ocurra por la introducción de cepas de *H. pylori* hpEurope en la época de la Colonia o hspWAfrica, debido al comercio de esclavos, luego de la llegada de Cristóbal Colón al Nuevo Mundo. Estas cepas evolucionaron para adaptarse a un nuevo ecosistema microbiano, que les permitió persistir en un ambiente hasta entonces colonizado por cepas nativas hspAmerind. Los análisis evolutivos indican que las nuevas poblaciones derivan su conjunto de genes de uno o varios ancestros. Del alto número de combinaciones genéticas, solo algunas pueden sobrevivir en el tiempo, y la dinámica de las nuevas poblaciones indica que evolucionan hasta que desaparecen y las reemplazan otras que, posiblemente, se adaptan a las nuevas condiciones ambientales (32).

Si bien los resultados del estudio de cepas de *H. pylori* están en concordancia con investigaciones previas (8, 15, 17, 18), al observar el árbol filogeográfico se destaca que buena parte de los aislamientos de Túquerres y Tumaco son quiméricos entre africanos, europeos y amerindios, ya que las cepas amerindias no se agrupan cerca de la rama de Asia Oriental del árbol, en concordancia con el origen migratorio de los amerindios, y en su lugar están en medio de las poblaciones filogeográficas hspWAfrica y hpEurope de aislamientos, en su mayoría de este estudio. Es posible que la mezcla de cepas nativas hspAmerind con las cepas de origen africano y europeo en los últimos quinientos años ha generado, por recombinación, características en el genoma de las poblaciones actuales que se reflejan en las cepas de nuestro estudio y se manifiestan en los agrupamientos de las poblaciones en el árbol.

La prevalencia de resistencia a CLA y AMX del ancestro hpAfrica1 de *H. pylori* fue mayor que la resistencia del ancestro hpEurope respectivamente, $P < 0,05$. Se observó asociación entre los ancestros filogeográficos y la virulencia de las bacterias; la frecuencia del ancestro hpEurope asociado al genotipo virulento fue mayor que la frecuencia del ancestro hpAfrica1 asociado al mismo genotipo, $P = 0,012$. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de este estudio, que sustenta que los aislados no virulentos de *H. pylori* presentes con mayor frecuencia en los pacientes provenientes de la región de bajo riesgo de cáncer gástrico son más resistentes a CLA y AMX que los aislados virulentos, estos, a su vez, más frecuentes en pacientes de la región de alto riesgo de cáncer gástrico. En la totalidad de los pacientes de Túquerres, las cepas aisladas se agrupan en el filogenotipo europeo (hpEurope); estas cepas se asocian al genotipo virulento de *H. pylori* y son más sensibles a los antibióticos CLA y AMX en comparación con las cepas con filogenotipo spAfrica1 aisladas de los pacientes de Tumaco, que son menos virulentas y más resistentes a los dos antibióticos estudiados.

Respecto al “enigma africano”, que cuestiona sobre la variabilidad geográfica de la incidencia y riesgo de cáncer gástrico en poblaciones con prevalencias de la infección similares, este estudio encontró que el filogenotipo hpEurope identificado en un buen número de aislados de la región de bajo riesgo de cáncer gástrico se asocia al gen de virulencia *cagA* (+); en contraste, el filogenotipo hpAfrica1 de esta misma población se asocia al marcador de patogenicidad nula *cagA* (-), $P = 0,019$.

4.4.9 Conclusiones capítulo 4. Origen filogeográfico de *Helicobacter pylori*

El ancestro filogeográfico hpEurope de *Helicobacter pylori* predomina en las cepas aisladas de los pacientes de Túquerres; en contraste, las cepas provenientes de Tumaco se incluyen en los ancestros filogeográficos hspWAfrica, hspSAfrica y hpEurope.

Las cepas de *Helicobacter pylori* de las poblaciones de Túquerres y Tumaco se clasifican como hpEurope o hpAfrica1 y ninguna cepa clasifica como hpEAsia (hspAmerind o hspEAsia).

Se encontraron dos agrupamientos nuevos en el árbol filogeográfico, no reportados en la literatura, que, por su sitio de ubicación, potencialmente representan nuevas subpoblaciones MLST de *Helicobacter pylori* en Suramérica.

La prevalencia de resistencia a claritromicina y amoxicilina del ancestro hpAfrica1 de *Helicobacter pylori* fue significativamente mayor que la resistencia del ancestro hpEurope a los mismos antibióticos.

Se observó asociación entre los ancestros filogeográficos y la virulencia de las bacterias. La frecuencia del ancestro hpEurope asociado al genotipo virulento fue mayor que la del ancestro hpAfrica1 asociado al mismo genotipo.

El filogenotipo hpEurope identificado en aislados de la región de bajo riesgo de cáncer gástrico se asocia al gen de virulencia *cagA* (+); en contraste, el filogenotipo hpAfrica1 de esta misma región se asocia al marcador de baja patogenicidad *cagA* (-).

Aunque no se encontró relación entre los ancestros filogeográficos de *Helicobacter pylori* y las lesiones precursoras de cáncer gástrico, como lo reportan estudios anteriores, esta investigación encontró que la frecuencia del ancestro hpEurope asociado al genotipo virulento fue mayor que la del ancestro hpAfrica1 asociado al mismo genotipo. Estos hallazgos apoyan la hipótesis que sustenta que el ancestro hpEurope se asocia al genotipo virulento de *Helicobacter pylori* y a lesiones precursoras de cáncer gástrico más avanzadas.

4.5 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 4

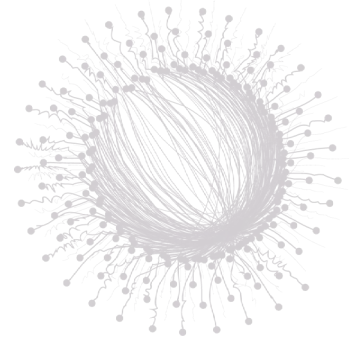
1. Falush D, Kraft C, Taylor NS, Correa P, Fox JG, Achtman M, et al. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2001 Dec 18;98(26):15056-61. doi: 10.1073/pnas.251396098
2. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, et al. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature.* 2007 Feb 22; 445(7130):915-8. doi: 10.1038/nature05562
3. Ikarashi A. Human ancestors nearly went extinct 900,000 years ago. *Nature.* 2023 Aug 31. doi: 10.1038/d41586-023-02712-4
4. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest.* 2009 Sep;119(9):2475-87. doi: 10.1172/JCI38605
5. Correa P, Piazuelo MB. Evolutionary history of the *Helicobacter pylori* genome: Implications for gastric carcinogenesis. *Gut Liver.* 2012 Jan;6(1):21-8. doi: 10.5009/gnl.2012.6.1.21
6. Dong QJ, Wang LL, Tian ZB, Yu XJ, Jia SJ, Xuan SY. Reduced genome size of *Helicobacter pylori* originating from East Asia. *World J Gastroenterol.* 2014 May 21;20(19):5666-71. doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5666.
7. Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Jun;5(6):441-52. doi: 10.1038/nrmicro1658
8. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, et al. Traces of human migration in *Helicobacter pylori* populations. *Science.* 2003 Mar 7;299(7):1582-5. doi: 10.1126/science.1080857
9. Guzman K, Montenegro L, Pazos A. *Helicobacter pylori* babA gene evolution and adaptation in Colombian populations. *Annals of Oncology.* 2021; Julio 32(3):171-72. doi: doi.org/10.1016/j.annonc.2021.05.267
10. Guzman K, Pazos A. Microevolution *Helicobacter pylori* alpA gene in colombian population. *Gastroenterology.* 2021;160(6):464-5. doi: doi.org/10.1016/S0016-5085(21)01817-5
11. Guzman K, Pazos A. Rapid evolution of *Helicobacter pylori* vacA gene from Colombian populations with opposite gastric cancer risk. *Gastroenterology.* 2022 May;162 (7):712-3. doi: 10.1016/S0016-5085(22)61676-7
12. Idris AB, Hassan HG, Salaheldin MA, Eltaher SM, Idris LB, Altayb HN, et al. Molecular phylogenetic analysis of 16s rRNA sequences identified two lineages of *Helicobacter pylori* strains detected from different regions in sudan suggestive of differential evolution. *Int J Microbiol.* 2020 Oct 27;2020:8825718. doi: 10.1155/2020/8825718
13. Mo R, Zhu S, Chen Y, Li Y, Liu Y, Gao B. The evolutionary path of chemosensory and flagellar macromolecular machines in *Campylobacterota*. *PLoS Genet.* 2022;18(7): e1010316. doi: 10.1371/journal.pgen.1010316.
14. Sans M. Admixture studies in Latin America: From the 20th to the 21st Century. *Hum Biol.* 2000 Feb;72(1):155-77. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.2307/41465813>
15. Wirth T, Wang X, Linz B, Novick RP, Lum JK, Blaser M, et al. Distinguishing hu-

- man ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: lessons from Ladakh. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Apr 6;101(14):4746-51. doi: 10.1073/pnas.0306629101
16. Kodaman N, Pazos A, Schneider BG, Piazuolo MB, Mera R, Sobota RS, et al. Human and *Helicobacter pylori* coevolution shapes the risk of gastric disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2014;111(4):1455-60. doi: 10.1073/pnas.1318093111
 17. Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Inter Med*. 2008 Jun 16;47(12):1077-83. doi: 10.2169/internalmedicine.47.0975
 18. Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan ZJ, et al. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol*. 1999 May; 32(3):459-70. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01382.x
 19. Vale F, Mégraud F, Vitor J. Geographic distribution of methyltransferases of *Helicobacter pylori*: evidence of human host population isolation and migration. *BMC Microbiology*. 2009 Sep 8;9:193. doi: 10.1186/1471-2180-9-193
 20. Cao P, Lee KJ, Blaser MJ, Cover TL. Analysis of hopQ alleles in East Asian and Western strains of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Oct 1;251(1):37-43. doi: 10.1016/j.femsle.2005.07.023
 21. De Sablet T, Piazuolo MB, Shaffer CL, Schneider BG, Asim M, Chaturvedi R, et al. Phylogeographic origin of *Helicobacter pylori* is a determinant of gastric cancer risk. *Gut*. 2011 Sep; 60(9):1189-95. doi: 10.1136/gut.2010.234468
 22. International Agency for Research on Cancer (IARC) Working Group. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Vol. 61. Lyon, France: IARC; 1994. p. 177-240. Disponible en: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Schistosomes-Liver-Flukes-And-Em-Helicobacter-Pylori-Em--1994>
 23. Devi SM, Ahmed I, Khan AA, Rahman SA, Alvi A, Sechi LA, et al. Genomes of *Helicobacter pylori* from native Peruvians suggest admixture of ancestral and modern lineages and reveal a western type cag pathogenicity island. *BMC Genomics*. 2006 Jul 27;7:191. doi: 10.1186/1471-2164-7-191
 24. Tay CY, Mitchell H, Dong Q, Goh KL, Dawes IW, Lan R. Population structure of *Helicobacter pylori* among ethnic groups in Malaysia: recent acquisition of the bacterium by the Malay population. *BMC Microbiol*. 2009 Jun 19; 9:126-39. doi: 10.1186/1471-2180-9-126
 25. <http://pubmlst.org/helicobacter/info/primers.shtml>.
 26. Whary MT, Sundina N, Bravo LE, Correa P, Quiñones F, Caro F, et al. Intestinal helminthiasis in Colombian children promotes a Th2 response to *Helicobacter pylori*: possible implications for gastric carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Jun;14(6):1464-9. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0095
 27. Correa P, Cuello C, Duque E. Carcinoma and intestinal metaplasia of the estomach in Colombia migrants. *J Natl. Cancer Inst*. 1970 Feb;44(2):297-306. doi: <https://doi.org/10.1093/jnci/44.2.297>
 28. Dominguez MG, Pérez ME, Bortolini MC, Salzano FM, Pericchi LR, Zambra-

- no-Guzmán O, et al. Amerindian *Helicobacter pylori* strains go extinct, as european strains expand their host range. PLoS ONE. 2008 Oct 2;3(10):1-7. doi: 10.1371/journal.pone.0003307
29. Israel DA, Salama N, Krishna U, Rieger UM, Atherton JC, Falkow S, et al. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Dec 4; 98(25):14625-30. doi: 10.1073/pnas.251551698
 30. Holcombe C. *Helicobacter pylori*: The African enigma. Gut. 1992 Apr;33(4):429-31. doi: 10.1136/gut.33.4.429
 31. Blaser MJ, Theodore E, Woodward Award: Global warming and the human stomach: microecology follows macroecology. Trans Am Clin Climatol Assoc. 2005; 116:65-75. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1473131/>
 32. Ahmed N. Coevolution and adaptation of *Helicobacter pylori* and the case for 'functional molecular infection epidemiology'. Med Princ Pract. 2011 Oct 4;20(6):497-503. doi: 10.1159/000329786.

CAPÍTULO 5.

Biomarcadores de susceptibilidad humana a cáncer gástrico



INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico es la quinta neoplasia maligna más frecuente y tercera causa de muerte en el mundo. Las tasas de incidencia y mortalidad, así como el riesgo al cáncer gástrico, varían geográficamente a escala global. En Colombia, el cáncer gástrico constituye la principal causa de muerte y presenta un marcado patrón geográfico en la distribución de su incidencia, al ser alta en las regiones montañosas y baja en regiones costeras.

La infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es el principal factor etiológico del desarrollo de cáncer gástrico; sin embargo, la alta prevalencia de la infección no predice la incidencia de la enfermedad. Otros factores de riesgo de tipo ambiental, higiénico-sanitarios, la dieta, la coevolución huésped-*H. pylori* y la susceptibilidad genética humana, intervienen en la patogénesis del cáncer gástrico.

La susceptibilidad genética humana al cáncer gástrico la median polimorfismos de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias que participan en la respuesta inmune a la infección por *H. pylori*. La persistencia de la expresión de los polimorfismos de interleucinas (IL) - proinflamatorias es un factor importante que contribuye a la transformación de la mucosa gástrica normal en una mucosa con lesiones precancerosas; sin embargo, la evidencia de su asociación con las lesiones gástricas depende de la población de estudio. Algunas investigaciones demuestran asociación positiva entre los genotipos de *IL-1B-511* y el riesgo de cáncer gástrico en poblaciones caucásicas y no asociación en algunas poblaciones asiáticas y latinoamericanas, como Costa Rica, Brasil y Venezuela, en contraste con lo reportado para algunas poblaciones de Colombia, donde se encontró asociación. La susceptibilidad genética representada en polimorfismos en genes de citocinas proinflamatorias *IL-1B-511*, *FNT-A-308* y antiinflamatorias *IL-1RN* e *IL-10*, se considera como un factor básico en la transformación maligna de la mucosa gástrica normal. Estas citocinas participan en la respuesta inmune a la infección y modulan el tipo y la severidad de la inflamación gástrica. Los resultados opuestos en las asociaciones estudiadas pueden indicar que las diferencias étnicas de las poblaciones influyen en la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos humanos.

En Colombia, el Departamento de Nariño representa un importante modelo de estudio para dilucidar la etiopatogénesis del cáncer gástrico debido a su situación geográfica, sociocultural y étnica, contrastante, con una Zona Andina de alta montaña, habitada por población de origen amerindio (67%) y una elevada incidencia de cáncer gástrico, considerada una de las más altas del mundo (150/100000 habitantes) y otra Zona Costera, con población de origen principalmente africano (58%) con una baja incidencia de cáncer gástrico (6/100000 habitantes). Al tomar en cuenta el riesgo opuesto de cáncer gástrico en estas poblaciones y los contrastes en la asociación de los polimorfismos de citocinas, nuestro interés de investigación lleva a estudiar la relación de los polimorfismos *IL-1B-511*, *IL10-1082* y *TNF-A-308* con lesiones gástricas en dos poblaciones colombianas con contraste en el riesgo de cáncer gástrico.

5.1 RESPUESTA INMUNE A LA INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori*

H. pylori coevolucionó con los humanos durante miles de años y su adaptación al hospedero le permite, al menos en parte, evadir la respuesta inmune e incidir en su regulación. Se supone que esto ayuda a su supervivencia y contribuye a su extraordinaria persistencia a lo largo de la vida humana (1, 2). A pesar de ello, el componente inflamatorio de la respuesta inmune es importante en la enfermedad, así como las características genéticas del hospedero y factores celulares de la interacción huésped-bacteria son fundamentales en la respuesta local y sistémica (3-4).

La infección activa tanto la respuesta inmune innata como la adquirida (5). El paso inicial en este proceso es el reconocimiento de la bacteria por el Nod1 (Nucleotide-binding oligomerization domain protein I), un mecanismo innato de detección de bacterias Gram negativas que identifica un muropeptido de los peptoglicanos (5, 6). El reconocimiento del microorganismo por el Nod1 resulta en gastritis crónica, pues paralelamente *H. pylori* también activa la respuesta inmune celular de tipo inflamatorio, que infiltra el epitelio colonizado y que influyen en la densidad de la colonización, el grado de inflamación y la generación de la respuesta inmune adaptativa (5). La respuesta innata es un factor determinante de la gravedad de la enfermedad y de la carcinogénesis gástrica.

H. pylori activa la inmunidad humoral en la respuesta inmune adquirida. Sin embargo, la respuesta humoral no protege de la infección (4) y la respuesta mediada por células ante el microorganismo es la responsable de la cronicidad de la inflamación y la respuesta celular adquirida en la patogenia de la enfermedad (7). La respuesta inmune a *H. pylori* se media predominantemente por células Th1, asociada a la liberación de citoquinas proinflamatorias IL1, IL2, interferón gamma (IFN γ) y la activación de macrófagos. Este tipo de respuesta T-CD4, Th1, se asocia con gastritis y atrofia gástrica, en tanto la respuesta mediada por citoquinas antiinflamatorias IL4, IL10, característica de la respuesta de linfocitos T-CD8, Th2, parece ser protectora (7). La respuesta inmune proinflamatoria y el daño celular resultante del estrés oxidativo mediado por los polimorfonucleares (PMN) juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (7).

La respuesta Th1 resulta una respuesta “equivocada”, porque *H. pylori* es una bacteria extracelular que debería desencadenar una respuesta Th2 (8). La respuesta Th1

produce IFN γ , factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), IL-12, IL-18 (9, 10), que activa macrófagos para la secreción de factores proinflamatorios y adquiere mayor capacidad bactericida en comparación con activación por respuesta Th2 (10). La gravedad de la gastritis crónica se relaciona con el número de células que secretan IFN γ (11, 12). La diferenciación de la respuesta Th1 la inducen la bacteria y factores ambientales (12, 13).

Las infecciones por parásitos que inducen respuesta Th2 constituyen un factor que pretende explicar la menor incidencia de cáncer gástrico en regiones de África (“enigma africano”) (14) e incluso en Colombia se documentó en niños de Tumaco (15). La respuesta Th2 produce IL-4, IL-5, IL-10 y factor de crecimiento transformante β de fibroblastos, IgA e IgE, y disminuye la inflamación causada por Th1 en respuesta al *H. pylori* (15). Así, la helmintiasis en los niños promueve la polarización a Th2, lo que altera la respuesta usual a la infección por *H. pylori* y disminuye el riesgo de cáncer gástrico más tarde en la vida de esos individuos. La infección tiene un período largo de infección subclínica, durante el cual produce inflamación y daño progresivo de la mucosa gástrica. A pesar de que las diferentes cepas de *H. pylori* difieren en su capacidad para producir inflamación (16), el desenlace clínico depende de la interacción entre las características genéticas del huésped, el medio ambiente y el microorganismo (17).

5.2 POLIMORFISMOS DE CITOCINAS BIOMARCADORES DE RIESGO DE CÁNCER GÁSTRICO EN NARIÑO

En el Departamento de Nariño, a la Región Andina se la considera de alto riesgo para cáncer gástrico, con una tasa de incidencia de 150/100000 personas por año, en comparación con la Costa Pacífica, Tumaco: 6/100000 personas por año, a pesar de que ambas poblaciones presentan una prevalencia de la infección alta y similar (~90 %). Con el propósito de aportar al esclarecimiento de este fenómeno, nuestro grupo de trabajo encontró que la ancestría del huésped y del patógeno juegan un papel importante en la patogénesis del cáncer gástrico, para concluir que pacientes infectados con cepas de *H. pylori*, que tienen una ascendencia distinta a la del hospedero, tienen más probabilidad de sufrir lesiones clínicas graves. No obstante, cada individuo tiene un grado diferente de susceptibilidad genética para llegar a desarrollar cáncer gástrico; estas diferencias pueden ser producto de ciertos polimorfismos genéticos, como, por ejemplo, los polimorfismos funcionales de distintas citosinas proinflamatorias (IL-1, IL-10, IL-1RN, TNF α) correlacionadas con variaciones en sus niveles de producción proteica, la respuesta inmune contra *H. pylori*, la ancestría del huésped y el desarrollo de alteraciones histológicas premalignas en la mucosa gástrica. A pesar de que varios reportes muestran diferencias en la correlación entre los polimorfismos proinflamatorios, el incremento del riesgo de desarrollar cáncer gástrico y ciertas patologías a nivel geográfico, la susceptibilidad genética es un factor que aún no se ha estudiado suficientemente y los hallazgos encontrados en este estudio nos permiten avanzar en el conocimiento de su asociación con la coevolución hospedero-patógeno. En consideración a lo ya expuesto, el desarrollo de la investigación ofreció una oportunidad única para identificar marcadores de riesgo clave en la prevención futura de la enfermedad asociada con la infección y, dado que estos factores analizados en forma aislada no han proporcionado explicaciones adecuadas, las variaciones de

acuerdo al origen étnico y geográfico justifican integrar al análisis el papel de la ancestría del anfitrión y patógeno, su asociación con la susceptibilidad genética humana para desarrollar cáncer gástrico y las patologías gástricas asociadas en nuestras poblaciones de Nariño. Para estudiar dicha relación, este estudio identificó biomarcadores coevolutivos y de susceptibilidad genética humana al cáncer gástrico en los pobladores de Túquerres (Nariño): alto riesgo de cáncer gástrico, y Tumaco (Nariño): bajo riesgo, de tal modo que, a partir de su análisis conjunto, explicamos las asociaciones entre los biomarcadores de susceptibilidad humana al cáncer gástrico, y: 1. El riesgo poblacional al cáncer gástrico; 2. El origen filogeográfico de *H. pylori*, 3. La ancestría del huésped; 4. La coevolución humano – *H. pylori*.

5.3 SINOPSIS METODOLÓGICA PARA LA DETECCIÓN DE BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD HUMANA A CÁNCER GÁSTRICO EN NARIÑO

Se incluyeron 265 individuos con síntomas de dispepsia, de ambos sexos, mayores de 18 años: 160 de Túquerres y 105 de Tumaco. Se aplicó una encuesta para indagar sobre los factores sociodemográficos de las poblaciones. Las lesiones gástricas se clasificaron por el sistema de Sydney y, a partir de allí, se tomaron dos tipos de lesiones para estudio: gastritis crónica no atrófica (GNA) y gastritis atrófica, con o sin metaplasia (GAM). Se tomaron dos alícuotas de sangre total para extracción de ADN con posterior genotipificación de los genes *IL-1B-511 CT*, *FNT- α -308 GA*, *IL-10-1082 AG* e *IL-1RN*A2* por PCR-RFLP. Los ancestros filogeográficos de *H. pylori* se determinaron por MLST de siete genes Housekeeping (*atpA*, *efp*, *ureI*, *ppa*, *mutY*, *trpC* y *yphC*), que van desde un tamaño 398 a 627 pb por gen, para un total de 3,406 pb para la secuencia concatenada, que se amplificaron por PCR y se secuenciaron por electroferesis capilar. Las secuencias concatenadas para *H. pylori* se analizaron con uso del algoritmo bayesiano STRUCTURE, y los ancestros evolutivos humanos se identificaron con immunochip, una plataforma que contiene más de 196524 SNPs. Las secuencias se procesaron con el Software STRUCTURE para determinar las proporciones evolutivas de los humanos. Para el diseño de los estudios evolutivos, se incluyeron 82 individuos de Túquerres y 44 de Tumaco; del total (126), 63 pacientes con GAM y en disrupción con el origen filogeográfico de *H. pylori*, y 63 pacientes con GNA y en coevolución con *H. pylori*. Se establecieron como criterio de coevolución cuando un individuo tiene un porcentaje de ascendencia de aproximadamente el 50% de un determinado grupo étnico, y la ascendencia de *H. pylori* es aproximadamente el 50% cerca del grupo étnico humano; entonces, se presenta un evento de evolución conjunta. Criterio de disrupción. Cuando el individuo tiene un porcentaje de ascendencia menor que 17,6% de un determinado grupo étnico, y la ascendencia de *H. pylori* es mayor que 19% de una cepa no relacionada con la etnia del individuo, se considerará un evento de ruptura coevolutiva. Se creó una base de datos relacional que contenía para cada individuo el tipo de lesión, la procedencia, la edad, el genotipo para cada biomarcador, el origen filogeográfico de *H. pylori*, el ancestro humano, y la coevolución huésped-*H. pylori*. Se realizó el ajuste del equilibrio Hardy-Weinberg con las frecuencias genotípicas y alélicas. La estimación del riesgo relativo (OR) de los genotipos de los polimorfismos de citocinas y su asociación con enfermedad gástrica se determinó por regresión logística binaria. Se elaboraron tablas de contingencia que relacionan las variables independientes: susceptibilidad

genética humana al cáncer gástrico y coevolución Humano-*H. pylori* con las lesiones precursoras de cáncer gástrico en la población objeto de estudio. A través de un análisis multivariado, se llevó a cabo una regresión logística no condicional para obtener el OR con intervalos de confianza del 95 % (IC) para cuantificar la asociación entre la susceptibilidad genética humana, la coevolución Humano-*H. pylori* y la enfermedad gástrica asociada; las diferencias entre grupos se valoraron utilizando la prueba U de Mann-Whitney, con $P < 0,05$.

5.3.1 Sujetos y muestras

Se incluyeron 265 sujetos de 19-67 años de edad, con síntomas de dispepsia, 44,2% (63/160) hombres de Túquerres, una población en las montañas de los Andes de Colombia, con alta prevalencia de *H. pylori* y lesiones preneoplásicas, y 41% (38/105) hombres de Tumaco, población de la Costa Pacífica de bajo riesgo de cáncer gástrico. Se analizaron 52 pacientes con lesiones precursoras de cáncer gástrico en las dos poblaciones: 8 con gastritis crónica atrófica y 44 con metaplasia intestinal, y 213 pacientes del grupo control con gastritis no atrófica. Se obtuvieron 4 biopsias de antro y cuerpo gástrico, para la evaluación histopatológica y el diagnóstico de *H. pylori*. Para la evaluación de biomarcadores de susceptibilidad genética al cáncer gástrico, se tomaron muestras de sangre total por parte del personal profesional de enfermería vinculado a la investigación. El procedimiento se llevó a cabo por punción de la vena media cubital en condiciones asépticas, basales y en ayunas. Se recolectaron 3 alícuotas de 5 mL de sangre en tubos Vacutainer con anticoagulante (EDTA) (No high altitude para Tumaco y High altitude para Túquerres). Las muestras se transportaron a 4 °C al Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad de Nariño de la ciudad de Pasto. Posterior a la firma del consentimiento informado por los participantes, se aplicó una encuesta que indagó sobre factores sociodemográficos. Este estudio lo aprobaron el Comité de Ética Humana de la Universidad del Valle y de la Universidad de Nariño.

5.3.2 PROCEDIMIENTOS DE HISTOPATOLOGÍA

Se procesaron 4 biopsias de mucosa gástrica, una de antro incisura angularis, una de antro curvatura mayor, una de cuerpo curvatura mayor y una de cuerpo pared anterior media. Se siguió un protocolo estándar de deshidratación con alcohol etílico, propílico y xilol, a diferente concentración, con inclusión final en parafina. Secciones histológicas cortadas en micrótomos (Accu-Cut® SRM) de 6 μ , se tiñeron con hematoxilina-eosina (H & E). Para determinar la presencia de *H. pylori*, se utilizó la tinción de Giemsa modificada en busca de bacilos curvos y espiralados. Cada uno de los fragmentos se evaluó por separado y las alteraciones histopatológicas encontradas en la mucosa gástrica se graduaron de acuerdo a la escala visual análoga descrita por Dixon y el sistema de clasificación de Sydney. Las categorías clasificadas fueron gastritis no atrófica (GNA), gastritis crónica atrófica (GCA) y metaplasia intestinal (MI), (18).

5.3.3 PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

El ADN genómico se extrajo a partir de sangre, con utilización del kit Isolation Kit Ultra Clean Blood Spin (Mobio, Technologies Inc, San Diego, EU). La concentración del ADN se determinó en un equipo NanoDrop™ (2000/2000c Spectrophotometers-Thermo Scientific).

5.3.3.1 Determinación de los polimorfismos *IL-1B-511*, *IL-1RN*, *IL-10 1082* y *FNT-A*

Amplificación de los polimorfismos en los genes de citocinas por PCR. Se analizaron tres polimorfismos de nucleótido único (SNP) en los genes de citocinas *IL-1B-511* (C→T, 305 pb), *IL-10-1082* (A→G, 360 pb) y *FNT-α-308* (G→A, 107 pb) y en el polimorfismo penta-alélico de repetición en tándem de 86 pb (VNTR) en el intrón 2 del gen de *IL-1RN* (19, 20). Las regiones que contienen los diferentes sitios polimórficos se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador BioRad (T100™ Thermal Cycler), seguido del método de discriminación alélica por RFLP's. Para el polimorfismo *IL-1RN**2, la genotipificación se realizó por PCR convencional (21). Las reacciones de PCR para *IL-1B-511* y *FNT-α-308* se llevaron a cabo en un volumen final de 30 µl con 1 µl de ADN de concentración entre 5 – 130 ng/µl; 0,5 nM de cada iniciador; 0,1 nM de la mezcla de dNTPs; 0,5 mM de MgCl₂ y 1,25 U de GoTaq® Flexi DNA Polimerasa (Promega®); para la *IL-10-1082*, se modificó el volumen de ADN a 2 µl y 0,2 nM de la mezcla de dNTPs, y para el gen de *IL-1RN*, se trabajó en un volumen final de 25 µl y utilizó 0,25 mM de MgCl₂. Como control negativo, se utilizó un tubo con mix de los componentes de PCR por cada amplificado, y, como control positivo, un amplificado de PCR de la región polimórfica para cada polimorfismo.

Electroforesis de los amplificados. Los productos de amplificado de las regiones polimórficas de cada gen de citocina se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y 2 % para el polimorfismo de *IL-1RN**2 (Bioline, Meridian Life Science, Inc, Memphis, US), con buffer TAE 1X (40 mM Tris acetato, 1 mM EDTA) (MO BIO, Mobio Laboratorios Inc, San Diego, US) y teñidos con 0,4 µL de agente intercalante GelRed (Biotium Inc, Hayward, US). En cada pozo, se inocularon 8 µL del producto amplificado. Se utilizó un marcador molecular de referencia de 100 pb (Hyper Ladder™ 100 pb Bioline). Las condiciones de corrida fueron de 20 min a 40 V de precorrida seguida de una corrida final de 110 min a 100. Los geles se visualizaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador (LabNet, GENTECH), fotografiados con una cámara digital y almacenados en un ordenador para su posterior verificación y análisis.

5.3.3.2 Detección del polimorfismo -511 C/T del gen *IL-1B*

A la secuencia amplificada de 304 pb se la sometió a un protocolo de RFLP. La reacción de restricción se llevó a cabo durante 16 h a 37 °C, en un volumen final de 30,3 µl, que contenía: 10 µl de PCR, 3 U de la enzima *AvaI* (Eco881 Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) en 2 µl del buffer 10X Tango (Thermo SCIENTIFIC). La digestión enzimática se produce en presencia del alelo C, y genera dos bandas: una de 190 pb y otra de 114 pb. Las bandas características para cada genotipo son: individuos homocigotos CC (190 y 114 pb), individuos homocigotos TT (304 pb) y los heterocigotos CT (304, 190 y 114 pb) (22).

5.3.3.3 Detección del polimorfismo -308 G/A del gen *FNT-A*

La reacción de RFLP de la secuencia amplificada se llevó a cabo durante 16 h a 37 °C, en un volumen final de 30,3 µl, que contenía: 10 µl de PCR, 3 U de la enzima *NcoI* en 2 µl del buffer 10X Tango (Thermo SCIENTIFIC). La digestión enzimática se produce en presencia del alelo G. Los individuos homocigotos AA presentan una sola banda de 107 pb, los heterocigotos AG dos bandas, 87 y 107 pb, y los homocigotos GG generan dos bandas de 87 pb y 20 pb (21).

5.3.3.4 Detección del polimorfismo -1082 G/A del gen IL-10

La reacción de RFLP se llevó a cabo durante 45 min a 37 °C, en un volumen final de 15 µl, que contenía: 5 µL de PCR, 2 U de la enzima BseRI en 1,5 µL del buffer 10X NE (New England, BioLabbs® ins). La digestión enzimática se produce en presencia del alelo G. Las bandas características para cada genotipo son: individuos homocigotos GG (320 pb), individuos homocigotos AA (360 pb) y los heterocigotos GAA (360 y 320 pb) (19, 22). Todos los fragmentos de restricción de los polimorfismos evaluados se separaron en geles de agarosa al 1,5% teñidos con 0,4 µl de GelRed™ (BIOTIUM, 10.000X).

5.3.4 PROCEDIMIENTOS GENÓMICOS

5.3.4.1 Ancestros filogeográficos de *Helicobacter pylori* por MLST-STRUCTURE

Los ancestros filogeográficos de *H. pylori* se determinaron por MLST de siete genes *Housekeeping* (*atpA*, *efp*, *ureI*, *ppa*, *mutY*, *trpC* y *yphC*), que van desde 398 a 627 pb por gen para un total de 3406 pb para la secuencia concatenada, como productos de PCR y secuenciación por electroforesis capilar. Las secuencias concatenadas para *H. pylori* se analizaron con uso del algoritmo bayesiano STRUCTURE. La tipificación por MLST de los siete genes estructurales permitió, por el método de agrupamiento entre vecinos (*Neighbour-joining*), establecer los patrones filogeográficos de *H. pylori*. Para los análisis evolutivos, se utilizaron los *software* Genious Pro 5.4.3 y Mega 5.0. Se aplicó la prueba exacta de Fisher y χ^2 para evaluar la asociación entre los ancestros filogeográficos y las lesiones precursoras de cáncer gástrico. Se encontró que el ancestro filogeográfico hpEurope predomina en las cepas aisladas de pacientes de Túquerres; en contraste, las cepas provenientes Tumaco se incluyen en los ancestros filogeográficos hspWAfrica, hspSAfrica y hpEurope. Nosotros utilizamos este modelo para caracterizar seis grupos ancestrales en aislados de *H. pylori* distribuidos globalmente: Ancestral África 1 (AA1); Ancestral Este Asia (AEA); Ancestral Europe 1 (AE1), AE2), y también dos grupos, Ancestral África 2 (AA2) de muestras de hpAfrica2 y un grupo aislado de muestras de hpSahul, que son raros o inexistentes en muestras colombianas. Los análisis con $K = 4$ maximizan la probabilidad del modelo y generan la mayor consistencia de agrupamiento al asignar fracciones a AA1, AEA, AE1, o AE2 en todas las muestras (23).

5.3.4.2 Determinación del origen evolutivo humano

Los orígenes evolutivos de los grupos étnicos participantes del estudio humanos se identificaron con immunoChip, una plataforma que contiene más de 196524 SNPs. El modelo de mezcla de STRUCTURE asigna proporciones de ascendencia a cada muestra individual a través de la constante de inferencia K a grupos ancestrales inferidos. La opción de enlace de este modelo toma en cuenta la posición cromosómica de los polimorfismos, que incorpora en la ascendencia las estimaciones del desequilibrio de enlace que se espera tras la mezcla de la población. Las secuencias obtenidas se procesaron con el *Software* STRUCTURE, para determinar las proporciones evolutivas de los humanos. Para el diseño de los estudios evolutivos, se incluyeron 82 individuos de Túquerres y 44 de Tumaco; del total, 63 pacientes con GAM y en disrupción con el origen filogeográfico de *H. pylori*, y 63 pacientes con GNA y en coevolución con *H. pylori*.

5.3.4.3 Criterios de coevolución y disrupción de la coevolución

Se establecieron como criterio de coevolución cuando un individuo tiene un porcentaje de ascendencia de aproximadamente el 50% de un determinado grupo étnico, y la ascendencia de *H. pylori* es aproximadamente el 50% cerca del grupo étnico humano; entonces, se presenta un evento de evolución conjunto. Criterio de disrupción. Cuando el individuo tiene un porcentaje de ascendencia menor que 17,6% de un determinado grupo étnico, y la ascendencia de *H. pylori* es mayor que 19% de una cepa no relacionada con la etnia del individuo, se considerará un evento de ruptura coevolutiva (23).

5.4 RESULTADOS CAPÍTULO 5. BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD HUMANA A CÁNCER GÁSTRICO

5.4.1 Sinopsis de resultados de biomarcadores de susceptibilidad humana a cancer gástrico en Nariño

Se encontró que la edad de diagnóstico de la lesión fue menor en Túquerres (24 años) que en Tumaco (38 años). El hacinamiento constituyó un factor de riesgo socioeconómico solo para Túquerres: Alto riesgo de cáncer gástrico. Se encontró que los pacientes de Túquerres que consumen ≥ 3 veces/sem carnes procesadas tienen alto riesgo de desarrollar gastritis crónica atrófica (GCA) (OR: 26,3; IC95% 1,8-299,8). Por su parte, el consumo diario de carnes rojas se asoció positivamente con GCA en Tumaco (OR: 27,6; IC95% 1,4-537), a diferencia de la alta ingesta de vegetales amarillos (3-4 veces/sem), que se constituyó en un factor protector de GCA (OR: 0,1; IC95% 0,01-0,8).

La frecuencia del genotipo *IL-1B-511TT* fue significativamente mayor en la población de alto riesgo de cáncer gástrico (54,4%) que en la población de bajo riesgo (36,6%), $P = 0.006$. La frecuencia del genotipo de riesgo *IL-10AA* fue mayor en la población de Túquerres (63,9%) que (16,3%) lo encontrado en Tumaco, $P = 0,01$. Los individuos que habitan en la población de alto riesgo de cáncer gástrico y portadores del genotipo mutado *IL-10-1082AG* tienen un riesgo, 5,45 veces mayor, de desarrollar atrofia gástrica que los individuos portadores del genotipo *IL-10-1082AA* (OR: 5,45; IC95% 1–30,59). Las proporciones de los genotipos mutados *IL-1B-511* e *IL-10-1082* fueron significativamente más altas en individuos infectados por *H. pylori* de ancestro filogeográfico primordialmente europeo 2 (EA2) ($P = 0,02$), independiente de la población en riesgo de cáncer gástrico. Las proporciones de los genotipos mutados *IL-1B-511* e *IL-10-1082* fueron significativamente más altas en humanos de origen evolutivo esencialmente amerindio ($> 68\%$), que en la población de alto riesgo de cáncer gástrico y de origen ancestral principalmente africano ($> 52\%$) en la población de bajo riesgo de cáncer gástrico. Los individuos con gastritis atrófica con metaplasia y en disrupción con los ancestros filogeográficos de *H. pylori* presentaron una mayor proporción de los genotipos mutados de *IL-1B-511* e *IL-10-1082* independiente del riesgo poblacional de cáncer gástrico. ($P = 0,04$). Entonces, se puede afirmar que un evento de coevolución humano-*H. pylori* no se asocia a individuos portadores de genotipos de riesgo de los polimorfismos de *IL-10-1082 (G/A)* y *IL-1B-511(C/T)* y a lesiones gástricas precancerosas.

5.4.2 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y SOCIOECONÓMICAS

En los pacientes de Tumaco, se encontró mayor frecuencia del sexo femenino (63,8%). La edad promedio de hombres y mujeres fue 43,76 años ($\sigma \pm 10,77$ años), con un rango mínimo de 19 y un máximo de 65 años. La distribución de edad en decenios permitió identificar que el mayor número de individuos sintomáticos se encontraron en el rango de edad de 41 a 50 años (33,3%). Para Túquerres, al igual que en Tumaco, hubo una mayor proporción de mujeres (60,6%). La edad promedio fue de 41,6 años ($\sigma \pm 11,29$ años), con un rango mínimo de 19 y un rango máximo de 67 años. Los grupos edad por decenios indicaron que, al igual que Tumaco, el mayor porcentaje de pacientes se encontró dentro del rango de edad de 41 a 50 años (31,3%)

5.4.3 Detección de los polimorfismos *IL-1B-511C/T*, *IL1-RN*A2*, *IL-10-1082A/G* y *FNT-A-308G/A*

5.4.3.1 Genotipificación del polimorfismo *IL1-RN*A2*

La amplificación del polimorfismo *IL1-RN* por PCR corresponde a un sitio polimórfico penta-alélico en el intrón 2 que contiene una secuencia de 86 pb. Se lograron obtener 160 y 105 amplificados de Túquerres y Tumaco, respectivamente. Se permitió observar los cinco alelos reportados previamente en literatura científica, que se identificaron según el tamaño del fragmento amplificado: Alelo 1 (A1) 410 pb; alelo 2 (A2) 240 pb; alelo 3 (A3) 500 pb; alelo 4 (A4) 325 pb y el alelo 5 (A5) 595 pb. Figura 1.

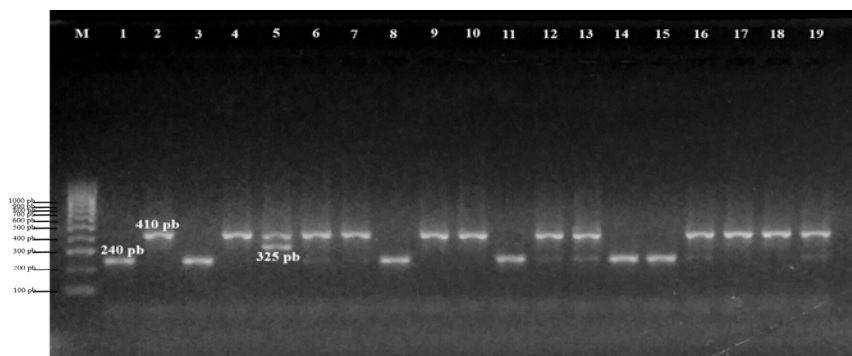


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los polimorfismos del intrón variable *IL-1RN*

Carril M: marcador de tamaño molecular 100 pb. Carriles: 1, 3, 8, 11, 14 y 15: genotipos homocigotos A2*A2. Carriles: 2, 4, 9, 10, 17 y 18: genotipos homocigotos L*L. Carriles: 5, genotipo heterocigoto A1*A4. Carriles: 6, 7, 12, 13 y 16: heterocigotos A1*A2. Carril 19: control positivo, paciente con genotipo heterocigoto A1*A2. Carril 20: control negativo Mix de PCR sin ADN.

5.4.3.2 Detección del polimorfismo *IL-1B-511C/T*

El polimorfismo *IL-1B-511C/T* corresponde a un SNP localizado en la región promotora del gen que codifica para la proteína IL-1 β , en la posición -511, y corresponde a un cambio de citocina por timina (C>T) (transición). Para este polimorfismo, se logró amplificar el fragmento esperado de 304 pb (Figura 2A). Se lograron obtener 158 y 101 amplificados de Túquerres y Tumaco, respectivamente, del total de las muestras procesadas. Mediante la

técnica PCR-RFLPs, se logró determinar el genotipo de los pacientes para este polimorfismo. El genotipo homocigoto *IL-1B-511CC* se determinó al observar 2 bandas resultantes de la digestión (190 pb y 114 pb); el genotipo homocigoto *IL-1B-511TT* se confirma al observar una única banda de 304 pb y el genotipo heterocigoto *IL-1B-511CT* se determina al observar 3 bandas (304 pb, 190 pb y 114 pb) (Figura 2B).

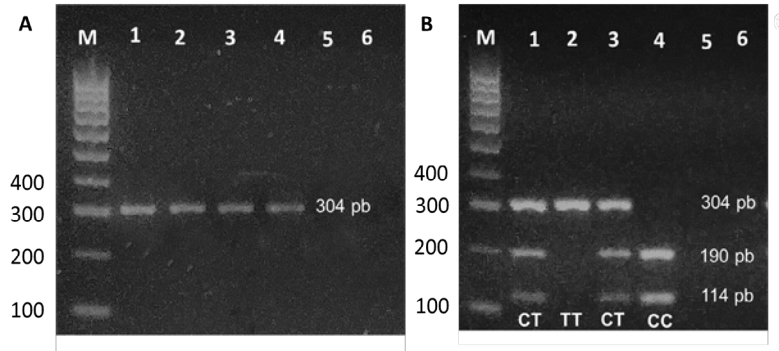


Figura 2. Electroforesis en agarosa al 1,5% del gen *IL-1B* y genotipificación del polimorfismo -511C/T. **A)**

Amplificación de la región polimórfica -511C/T del gen *IL-1B*. Carril M: marcador de peso molecular 100. Carriles 1 a 4: productos de amplificación de la región -511C/T (304 pb) de muestras de individuos vinculados al estudio. Carril 5: control negativo Mix de PCR sin ADN. Carril 7: control negativo agua miliQ. **B).** Genotipificación de la región polimórfica -511C/T del gen *IL-1B*. Carriles 1 a 4: muestras de genotipos CT, TT, CT y CC, respectivamente. Carril 5, control negativo: Mix RFLPs sin ADN. Carril 6: control negativo agua miliQ.

5.4.3.3 Detección del polimorfismo *IL-10-1082A/G*

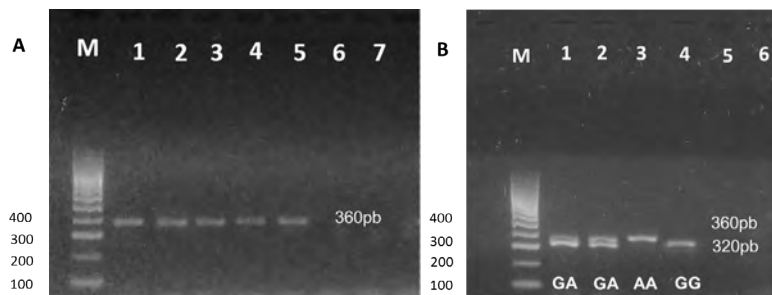


Figura 3. Electroforesis en agarosa al 1,5% del gen *IL-10* y genotipificación del polimorfismo 1082A/G

A). Amplificación de la región polimórfica -1082A/G del gen *IL-10*. Carril M: marcador de peso molecular 100 pb. Carriles 1 a 5: productos de amplificación de la región -1082A/G (360pb). Carril 6: control negativo Mix PCR sin ADN. Carril 7: control negativo agua miliQ. **B).** Genotipificación de la región polimórfica -1082A/G del gen *IL-10*. Carriles 1 y 2. Muestras del genotipo heterocigoto CT. Carril 3. Genotipo homocigoto AA. Carril 4. Muestra genotipo GG. Carril 5. Control negativo: Mix RFLPs sin ADN. Carril 6: control negativo miliQ.

Se logró amplificar el fragmento esperado de 360 pb del polimorfismo *IL-10-1082A/G*, que contiene la región polimórfica -1082, que corresponde a un cambio de una adenina

por guanina (Transición). Se lograron obtener 158 y 104 amplificados de Túquerres y Tumaco, respectivamente. La digestión de los productos de amplificación del polimorfismo *IL-10-1082A/G* generó tres posibles genotipos: el genotipo homocigoto *IL-10-1082GG* observado como 1 banda de 320 pb; el genotipo heterocigoto *IL-10-1082CT* observado como 2 bandas de 360 y 320 pb y el genotipo homocigoto *IL-10-1082AA* observado como una sola banda de 360 pb (Figura 3).

5.4.3.4 Detección del polimorfismo *FNT-α-308 G/A*

Se logró amplificar el fragmento esperado de 107 pb del polimorfismo *FNT-α-308 G/A* en 159 y 105 muestras de la población de Tumaco y Túquerres, respectivamente. El genotipo homocigoto *FNT-A-308 A/A* se encontró ausente en la población de Tumaco. Los individuos homocigotos *FNT-A-308 GG* presentan una única banda de 87 pb, los individuos heterocigotos *FNT-A-308AG* presentan dos bandas de 87 y 107 pb y los individuos con el genotipo homocigoto *FNT-A-308 AA* presentaron una única banda de 107 pb (Figura 4).

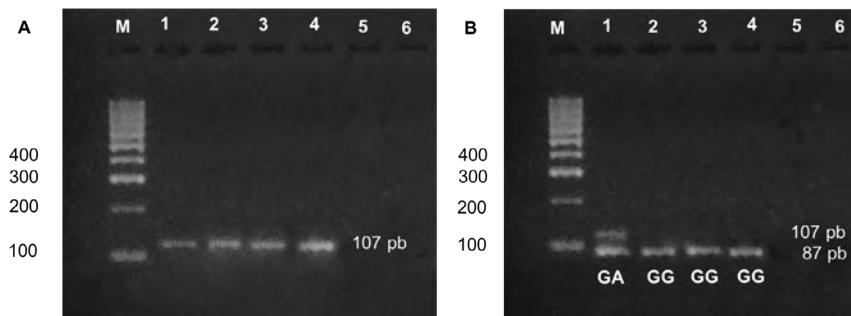


Figura 4. Electroforesis en agarosa al 1,5% del gen *FNT-α* y genotipificación del polimorfismo *-308G/A*

A). Amplificación de la región polimórfica *-308 G/A* del gen *FNT-α*. Carril M: marcador de tamaño molecular 100 pb. Carriles 1 al 4: productos de amplificación de la región *-308G/A* (107pb). Carril 5: control negativo Mix de PCR sin ADN. Carril 7: control negativo agua miliQ. B). Genotipificación de la región polimórfica *-308G/A* del gen *FNT-α*. Electroforesis en gel agarosa al 2%. Carriles 1: genotipo heterocigoto GA. Carriles 2, 3 y 4: genotipo homocigoto GG. Carril 5, control negativo: Mix RFLPs sin ADN. Carril 6: control negativo agua miliQ.

5.4.3.5 Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de citocinas en pacientes de Túquerres

Se encontró que un alto porcentaje de los pacientes es portador del alelo *IL-1B-511T* (72%) y del genotipo heterocigoto *IL-1B-511CT* (36,07%). Respecto al polimorfismo del gen *IL-10-1082*, el 79% de los pacientes fue portador del alelo *IL-10-1082A* y el 29,75% del genotipo heterocigoto *IL-10-1082AG*. Para el polimorfismo *FNT-α-308GA*, los pacientes son predominantemente portadores del alelo *FNT-A-308G* (95%) y solo el 5% portó el alelo *FNT-α-308A*. El genotipo *FNT-α-308AA* se encontró ausente en esta población. Es importante señalar que la frecuencia del alelo G fue de 95%; cuando un alelo alcanza una frecuencia de este valor, se dice que alcanzó la fijación, lo que da como resultado la pérdida del alelo mutante. Por su parte, en cuanto a los polimorfismos del intrón variable *IL-1RN*, se encontró que el 74% de los pacientes es portador de los alelos

que se agrupan dentro de la categoría de alelos largos (A1, A3, A4 y A5), mientras que el 26% fue portador del alelo A2 (Tabla 1). Debido a que el genotipo *FNT- α -308AA* reportado como de riesgo de cáncer gástrico estuvo ausente en esta población, no se tuvo en cuenta para el análisis de asociación de RLM.

Tabla 1. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de *IL-1B-511*, *FNT- α -308*, *IL-10-1082* e *IL-1RN* en los pacientes de Túquerres

SNP	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas	
	CC	CT	TT	C	T
<i>IL-1B-511</i>	15 (9,50%)	57 (36,07%)	86 (54,43%)	0,28	0,72
<i>FNT-α-308</i>	GG	GA	AA	G	A
	143 (89,94%)	16 (10,06%)	-	0,95	0,05
<i>IL-10-1082</i>	AA	GA	GG	A	G
	101 (63,92%)	47 (29,75%)	10 (6,33%)	0,79	0,21
<i>IL-1RN</i>	LL	LA2	A2*A2	L	A2
	95 (59,4%)	48 (30,0%)	17 (10,6%)	0,74	0,26

5.4.3.6 Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de citocinas en pacientes de Tumaco

La mayor proporción de pacientes es portadora del alelo *IL-1B-511T* (65%) y del genotipo heterocigoto *IL-1B-511C/T* (56,4%). Para el polimorfismo del gen *FNT- α -308*, se encontró que la mayoría de los pacientes posee el alelo *FNT- α -308G* (88%). El genotipo *FNT- α -308 AA* estuvo presente con una baja frecuencia (2,9%), aunque solo en el grupo control. En relación con el polimorfismo del gen *IL-10-1082*, se encontró alta frecuencia del alelo *IL-10-1082A* (68%); el genotipo más frecuente fue el homocigoto *IL-10-1082AA* (54,3%). Por su parte, en cuanto a los polimorfismos del intrón variable *IL-1RN*, similar a Túquerres, los pacientes son portadores en mayor proporción de los alelos largos (L) (82%) y del genotipo homocigoto LL (65,7%) (Tabla 2). Debido a que los genotipos *FNT- α -308AA* e *IL-1RNA2*A2** se encontraron ausentes en el grupo de casos de esta población, se descartaron del análisis de asociación de RLM.

Tabla 2. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de *IL-1B-511*, *IL-1082*, *FNT- α -308* e *IL-1RN* en los pacientes de Tumaco

SNP	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS			FRECUENCIAS ALÉLICAS	
	CC	CT	TT	C	T
<i>IL-1B-511</i>	7 (6,9%)	57 (56,4%)	37 (36,7%)	0,35	0,65
<i>FNT-α-308</i>	GG	GA	AA	G	A
	82 (78,1%)	20 (19%)	3 (2,9%)	0,88	0,12
<i>IL-10-1082</i>	AA	AG	GG	A	G
	57 (54,3%)	29 (27,6%)	19 (18,1%)	0,68	0,32
<i>IL-1RN</i>	L*L	L*A2	A2*A2	L	A2
	69 (65,7%)	35 (33,3%)	1 (1,0%)	0,82	0,18

5.4.3.7 Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos de citocinas según lugar de procedencia

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos evaluados, según el lugar de procedencia (Tabla 4). Los genotipos reportados en la literatura como de riesgo a *CG IL-1B-511TT*, *IL-10-1082GA* e *IL-1RN*2*, se presentaron con mayor frecuencia en la zona de alto riesgo (54,4%, 29,7% y 10,6%, respectivamente) en comparación con la zona de bajo riesgo (36,6%, 27,9% y 1%, respectivamente) (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos de *IL-1β-511*, *FNT-α-308*, *IL-10-1082* e *IL-1RN*2*, según lugar de procedencia

SSNP	TÚQUERRES			TUMACO			P
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
<i>IL1 B-511</i>	15 (9,5%)	57 (36%)	86 (54%)	7 (6,9%)	57 (56%)	37(36,6%)	0,006
<i>FNT-α-308</i>	GG	GA	AA	GG	GA	AA	0,009
	143 (90%)	16 (19%)	-	82 (78%)	20 (19%)	3 (2,9%)	
<i>IL10-1082</i>	AA	AG	GG	AA	AG	GG	0,001
	101 (64%)	47 (30%)	10 (6,3%)	58 (56%)	29 (28%)	17 (16,3%)	
<i>IL1-RN</i>	L*L	L*A2	A2*A2	L*L	L*A2	A2*A2	0,009
	95 (59,4%)	48 (30%)	17 (11%)	69 (66%)	35 (33%)	1 (1,0%)	

5.4.3.8 Equilibrio Hardy-Weinberg (EH-W)

Tabla 4. Estimación de X^2 para determinar equilibrio Hardy-Weinberg en las dos poblaciones de estudio

Grupo	SNP	Genotipos	Tumaco					Túquerres				
			n	Fg	Fo	FE	p	n	Fg	Fo	FE	p
Control	<i>IL-1B-511</i>	CC	4	0,12	0,58	0,45	0,01	14	0,07	0,332	0,39	0,04
		CT	47	0,44				41	0,39			
		TT	30	0,44				72	0,53			
	<i>FNT-A-308</i>	GG	63	0,72	0,22	0,25	0,37	115	0,90	0,09	0,09	1,00
		GA	19	0,25				12	0,09			
		AA	3	0,02				0	0,00			
	<i>IL-10-1082</i>	AA	15	0,09	0,25	0,42	0,00	6	0,04	0,31	0,32	0,78
		AG	22	0,42				40	0,33			
		GG	48	0,48				80	0,63			
<i>IL-1RN</i>	L*L	59	0,71	0,29	0,26	0,68	76	0,54	0,30	0,38	0,00	
	L*A2	25	0,27				37	0,38				
	A2*A2	1	0,02				15	0,06				

Control: pacientes con Gastritis no atrófica; Fg: frecuencia genotípica; Fo: frecuencia observada heterocigotos; FE: frecuencia esperada heterocigotos

Las frecuencias genotípicas del polimorfismo *FNT-α-308* se ajustaron al modelo del EH-W en los grupos control (GNA) de las dos poblaciones (Túquerres $P = 0,38$ y Tumaco $P = 1,00$), lo que significa que no están bajo la influencia de factores o fuerzas evolutivas que las modifiquen. En el polimorfismo *IL-10-1082*, se encontró EH-W solo en el grupo control de los individuos de la población de Túquerres ($P = 0,78$), mientras

que el polimorfismo *IL-1RN* solo presentó EH-W en el grupo control de la población de Tumaco ($P = 0,27$). Respecto al polimorfismo *IL-1B-511*, se encontró desviación del E-HW en los grupos control de las dos poblaciones (Túquerres $P = 0,04$ y Tumaco $P = 0,01$).

En los estudios de asociación de casos y controles, es de gran importancia que el grupo control esté en equilibrio de EH-W para evitar tanto errores técnicos como asociaciones falsas-positivas, por lo cual, para el análisis de asociación de RLM, únicamente se tuvieron en cuenta los polimorfismos que se ajustaron al EH-W teórico (Tabla 4)

5.4.3.9 Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de citoquinas según población en riesgo de cáncer gástrico

Se analizaron 259, 262 y 264 perfiles polimórficos de los genes *IL-1B-511*, *IL-10-1082* y *TNF-A-308*, respectivamente. Se determinó que los grupos control de las dos poblaciones están en equilibrio EH-W para el polimorfismo del gen *TNF-A-308* ($P = 0,37$ para Tumaco y $P = 1,0$ para Túquerres). El polimorfismo del gen *IL-10-1082* se ajustó al equilibrio EH-W ($P = 0,78$) únicamente en el grupo control de la población de alto riesgo, lo que significa que no están bajo la influencia de factores o fuerzas evolutivas que las modifiquen. Respecto al polimorfismo del gen *IL-1B-511*, se ajustó al EH-W en las dos poblaciones (25).

Los genotipos *IL1B-511TT* y *IL-10-1082AA* portadores de los alelos de riesgo T y A fueron significativamente más frecuentes en la población de alto riesgo de cáncer gástrico: Túquerres (54,4% y 63,9%) que en la población de bajo riesgo: Tumaco (36,6% y 54,3%), respectivamente, $P \leq 0,05$. La distribución de los alelos mostró que los pacientes con alto riesgo de cáncer gástrico tienen significativamente mayor frecuencia de los alelos mutados *IL1B-511T* (72%) y *IL-10-1082A* (79%), que las frecuencias encontradas para estos alelos en los pacientes de bajo riesgo de cáncer gástrico: Tumaco, $P \leq 0,05$. Se encontró que el genotipo *TNF-A-308AA* está ausente en la población de Túquerres, mientras que en la población de Tumaco solo estuvo presente en el 2,9% de los pacientes; con igual tendencia, la distribución de la frecuencia del alelo A de este genotipo es casi nula en las dos poblaciones.

5.4.3.10 Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de citoquinas según tipo de lesión gástrica

La distribución de los diferentes genotipos entre el grupo control (GNA) y el grupo de casos (GCA) observó que los polimorfismos de los genes *IL1B-511*, *IL-10-1082* y *TNF-A-308* no presentan diferencias entre el tipo de lesión gástrica y los genotipos de (IL) en las dos poblaciones estudiadas (Tabla 3). Independiente de la población, se encontró que el genotipo más predominante en el grupo de pacientes con GCA fue el heterocigoto *IL-1B-511CT*, que presentó mayor frecuencia tanto en Túquerres (51,6%) como en Tumaco (50%). Por su parte, el genotipo *IL-10-1082AA*, portador del alelo de riesgo A, fue el más prevalente en los pacientes con GCA de las dos poblaciones, Túquerres (65,6%) y Tumaco (45%). No se encontraron diferencias significativas entre

la sumatoria de las frecuencias de los genotipos de riesgo vs. los genotipos normales de los tres genes estudiados y el tipo de lesión gástrica.

Se encontró que el genotipo *TNF-A-308AA*, portador del alelo raro A, está ausente en los pacientes del grupo de casos (GCA) de las dos poblaciones, siendo frecuente, a nivel general, el genotipo *TNF-A-308GG*, portador del alelo frecuente. Por estar ausente este polimorfismo en el grupo de casos, no se incluyó en el modelo de regresión logística.

Los resultados del análisis de regresión logística binaria ajustada por sexo, edad, infección por *H. pylori* y todos los polimorfismos de forma simultánea, indicaron que las personas que habitan en la zona de alto riesgo y portadores del genotipo heterocigoto *IL-10-1082AG* presentaron una probabilidad 5,45 veces más alta de desarrollar atrofia gástrica en comparación con los portadores del genotipo *IL-10-1082AA* (OR: 5.4; IC95% 1,0-30,59). Respecto a los demás genotipos, no se encontró una asociación positiva con la lesión gástrica.

5.4.3.11 Ancestría humana y ancestría de *Helicobacter pylori* en las dos poblaciones de estudio

Mediante una base de datos de los contenidos proporcionales de ancestros humanos y de *H. pylori*, se realizaron los análisis de mezcla de genotipo humano de alta densidad.

Los datos revelaron un importante grupo ancestral africano en la población costera de Tumaco (proporción media de $0,58 \pm 0,23$; $n = 122$), con un componente significativo de individuos de ascendencia amerindios ($0,23 \pm 0,13$) y europeos ($0,19 \pm 0,13$) (Figura 5 C). Por el contrario, la población de montaña: Túquerres, es en su mayoría de amerindios ($0,67 \pm 0,12$; $n = 120$), con componente significativo de ascendencia europea ($0,31 \pm 0,11$) y una proporción insignificante de ascendencia africana ($0,03 \pm 0,02$, Figura 5 D). La falta de normalidad en las proporciones de mezcla de individuos de Tumaco es consistente con migraciones recientes y/o apareamiento no aleatorio.

Encontramos que las cepas colombianas de *H. pylori* se derivan de cuatro poblaciones ancestrales: África1 (AA1), Europa 1 y 2 (AE1 y AE2), y Asia Oriental (AEA) (Figura 5E-F). A pesar de que la mayoría de los aislados contenía fracciones sustanciales de África y ascendencia europea, AA1 predominó en la Costa, y AE2 predominó en la región montañosa (Ver la leyenda de la Figura 5E-F), consistente con el reemplazo de ncestral Amerindian de *H. pylori* por ancestral East Asia (AEA).

Observamos que el mayor grupo ancestral en las montañas es AE2, el grupo más común en el sur de Europa, no AEA, que se esperaría en una población humana de origen asiático. Esta observación indica una reciente transferencia de cepas de *H. pylori* de los europeos a los amerindios poscolonización. Figura 5.

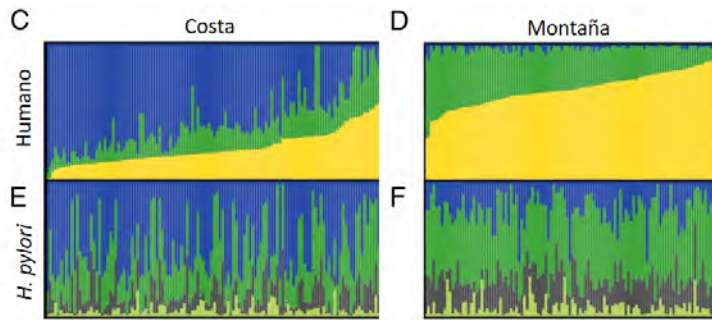


Figura 5. Proporción de ancestros humanos y de *Helicobacter pylori* en las dos poblaciones de estudio

(C-D) Mezcla de proporciones ancestrales humanas; (E-F) Mezcla de proporciones ancestrales de *H. pylori*. Proporciones de mezcla de ascendencia humana (C y D) y *H. pylori* (E y F) ($n = 233$). Cada huésped humano y su aislado de *H. pylori* correspondiente se representan por una barra vertical que abarca ambos paneles, con proporciones de mezcla indicadas por color. (C) Humanos de la región costera: Tumaco. (D) Humanos de la región montañosa: Túquerres. (E) *H. pylori* de la región costera. (F) *H. pylori* de la región montañosa. Para la mezcla humana, azul = africano; verde = europeo y amarillo = amerindio. Para el complemento *H. pylori*, azul = AA1 (Ancestral África 1); verde = AE2 (Ancestral Europe 2); gris = AE1 (Ancestral Europe 1 y verde lima = AEA (Ancestral East Asia).

5.4.3.12 Asociación de biomarcadores de susceptibilidad a cáncer gástrico y el origen ancestral humano

Se encontró un importante grupo ancestral humano de origen africano en la población de Tumaco, con un componente significativo de individuos de ascendencia amerindia y europea (Figura 5 y 6). Los individuos con una proporción mayor de ancestro africano no se asociaron con el genotipo heterocigoto del polimorfismo *IL-1B-511(G/A)*; sin embargo, esta misma población, con un componente evolutivo africano, se asocia de forma significativa con el genotipo mutado del polimorfismo *IL-10-1082*, $P = 0,032$ (Figura 6, 7).

Para Túquerres, se encontró un mayor componente ancestral humano de origen amerindio en su perfil evolutivo, acompañado de una proporción significativa de individuos de ascendencia europea. Se encontró asociación del componente ancestral amerindio con la forma alélica mutada del polimorfismo *IL-10-1082(G/A)*, ($P = 0,012$), y con el genotipo mutado de *IL-1B-511(C/T)*, ($P = 0,018$). (Figura 8).

El análisis conjunto para las poblaciones de Tumaco y Túquerres observó que las proporciones promedio de las formas alélicas del polimorfismo *IL-1B-511(C/T)* no se asocian al componente promedio del ancestro africano; sin embargo, el componente promedio del genotipo mutado de *IL-10-1082 (G/A)* se asocia al componente promedio del ancestro africano, independiente de la población en riesgo de cáncer gástrico ($P = 0,013$). (Figura 9).

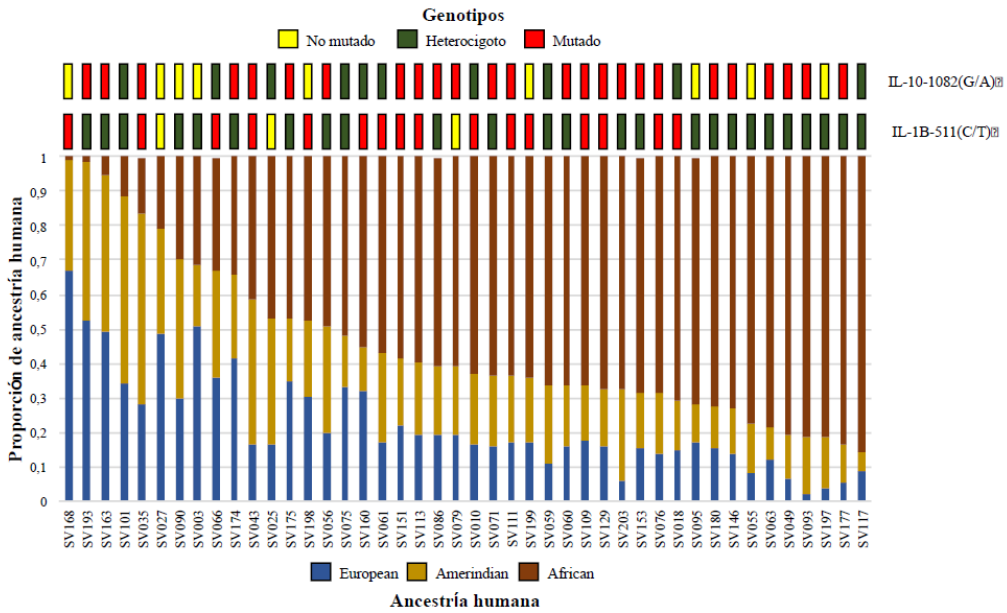


Figura 6. Perfil de proporciones de ancestros humanos según genotipos de interleuquinas *IL-1B-511*, *IL-10-1082* en la población de Tumaco

Obsérvese una mayor proporción del ancestro africano en el perfil evolutivo de los humanos de Tumaco (barras inferiores en color café). Si bien no se observó asociación del componente ancestral africano con ninguna las tres formas alélicas del polimorfismo *IL-1B-511(C/T)*, se encontró asociación con el genotipo mutado de *IL-10-1082(G/A)* (barras superiores en color rojo) ($P = 0,032$).

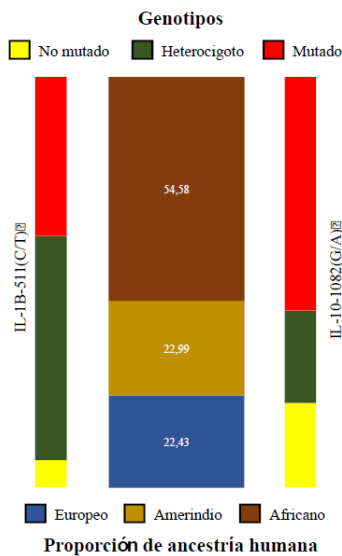


Figura 7. Proporción general promedio de genotipos de interleuquinas *IL-1B-511*, *IL-10-1082* según las proporciones de ancestros humanos en la población de Tumaco. Las proporciones promedio de las formas alélicas del polimorfismo *IL-1B-511(C/T)* (barra izquierda) no se asocian al componente promedio del ancestro africano; sin embargo, el componente promedio del genotipo mutado *IL-10-1082(G/A)* (barra roja derecha) se asocia al componente promedio del ancestro africano de los individuos de Tumaco.

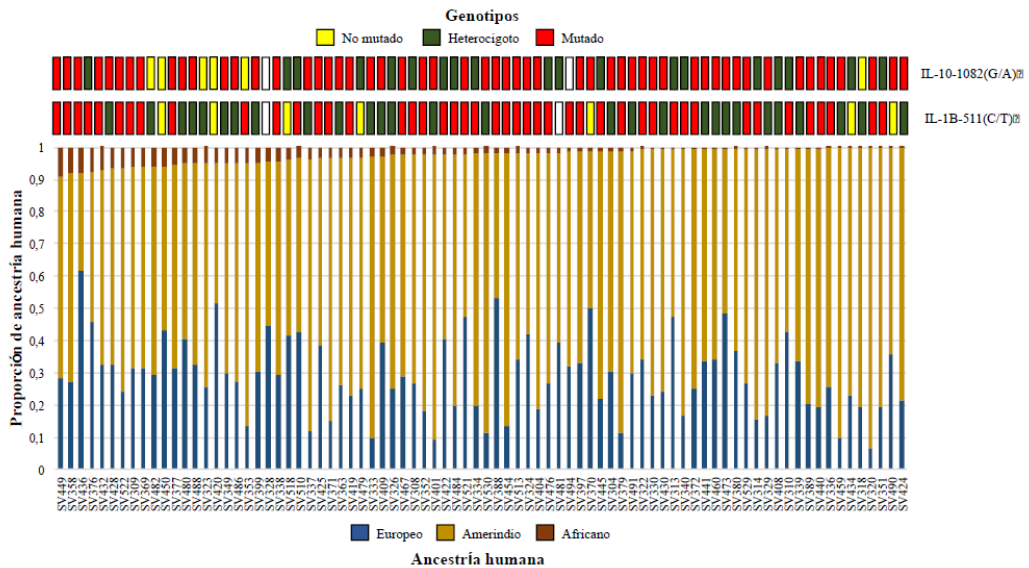


Figura 8. Perfil de proporciones de ancestros humanos según genotipos de interleuquinas *IL-1B-511*, *IL-10-1082* en la población de Túquerres

Obsérvese una mayor proporción del ancestro amerindio en el perfil evolutivo de los humanos de Túquerres (Barras inferiores en color magenta). Se encontró asociación del componente ancestral amerindio con la forma alélica mutada del polimorfismo *IL-10-1082(G/A)*, ($P = 0,012$), y con el genotipo mutado de *IL-1B-511(C/T)*, ($P = 0,018$) (barras superiores en color rojo) ($P = 0,032$).

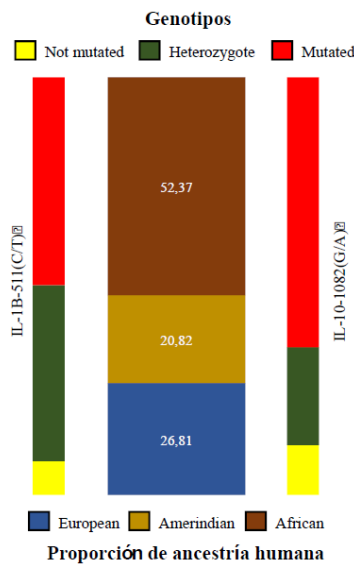


Figura 9. Proporción general promedio de genotipos de interleuquinas *IL-1B-511*, *IL-10-1082* según ancestros humanos en las poblaciones de Tumaco y Túquerres

Las proporciones promedio de las formas alélicas del polimorfismo *IL-1B-511(C/T)* no se asocian al componente promedio del ancestro africano; sin embargo, el componente promedio del genotipo mutado de *IL-10-1082(G/A)* se asocia al componente promedio del ancestro africano, independiente de la población en riesgo de cáncer gástrico ($P = 0,013$).

5.4.3.13 Asociación de biomarcadores de susceptibilidad humana al cáncer gástrico y el origen filogeográfico de *Helicobacter pylori*

Encontramos que las cepas de *H. pylori* de las dos poblaciones de este estudio se derivan de cuatro poblaciones ancestrales: Ancestral Africa1 (AA1), Ancestral Europe 1 y 2 (AE1 y AE2), y Ancestral East Asia (AEA) (Figura 5E-F). A pesar de que la mayoría de los aislados contenía fracciones sustanciales de Africa y ascendencia europea, AA1 predominó en la Costa, y AE2 predominó en la región montañosa. Las cepas de *H. pylori* aisladas de Tumaco con una proporción mayor de ancestro africano (AA1) se asociaron a la forma alélica mutada del polimorfismo *IL-10-1082AA* ($P = 0,012$), y esta misma población con ancestro filogeográfico africano (AA1) de *H. pylori* se asocia de forma significativa con el genotipo heterocigoto mutado de *IL-1B-511CT*, ($P = 0,035$) (Figura 10, 11).

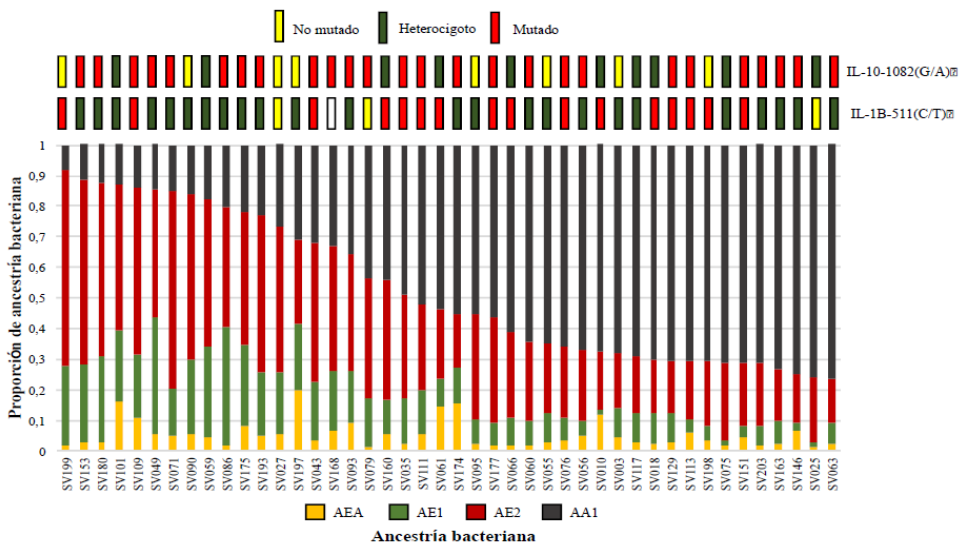


Figura 10. Perfil de proporciones de ancestros filogeográficos de *Helicobacter pylori* según genotipos de interleuquinas *IL-1B-511*, *IL-10-1082* en la población de Tumaco. Los orígenes evolutivos de *H. pylori* se clasificaron por MLST. Cada barra representa los componentes evolutivos de *H. pylori* y el genotipo de las dos IL para cada individuo. Las ancestrías de *H. pylori* se identifican con las siguientes siglas: AEA: ancestral east Asia, se marcaron para cada aislado con amarillo. AE1: ancestral Europe 1, se marcó con verde. AE2: ancestral Europe 2, se marcó con rojo y AA1: ancestral African 1, se marcó con negro. Los genotipos de susceptibilidad a cáncer gástrico, de acuerdo a la *IL-1B-511CC*, normales (no mutados), se marcaron con amarillo. El genotipo *IL-1B-511CT*, heterocigoto mutado, se marcó con verde. El genotipo *IL-1B-511TT*, mutado, se marcó con rojo. Los genotipos de susceptibilidad a cáncer gástrico, de acuerdo a la *IL-10-1082GG*, normales (no mutados), se marcaron con amarillo. El genotipo *IL-10-1082GA*, heterocigoto mutado, se marcó con verde. El genotipo *IL-10-1082AA*, mutado, se marcó con rojo. La barra marcada con blanco corresponde al genotipo *IL-1B* no determinado. Obsérvese una mayor proporción del ancestro africano AA1 en el perfil filogeográfico de *H. pylori* de pacientes de Tumaco, en que se destaca su asociación con la forma alélica mutada del polimorfismo *IL-10-1082AA* y significativamente con el genotipo heterocigoto mutado de *IL-1B-511CT*.

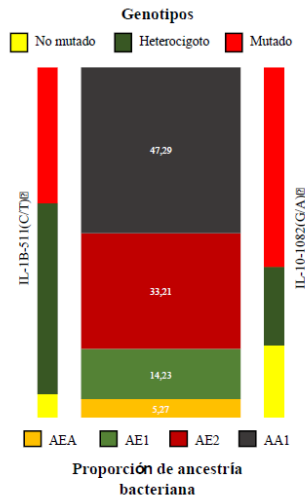


Figura 11. Proporción general promedio de genotipos de interleuquinas *IL-1B-511*, *IL-10-1082* según las proporciones de ancestros filogeográficos de *Helicobacter pylori* en la población de Tumaco

Se observó asociación entre el filogenotipo africano (AA1) de *H. pylori* aislado de Tumaco y la forma alélica mutada del polimorfismo *IL-10-1082AA* ($P = 0,012$) y el ancestro filogeográfico africano (AA1) de *H. pylori* con el genotipo heterocigoto mutado de *IL-1B-511CT* ($P = 0,035$).

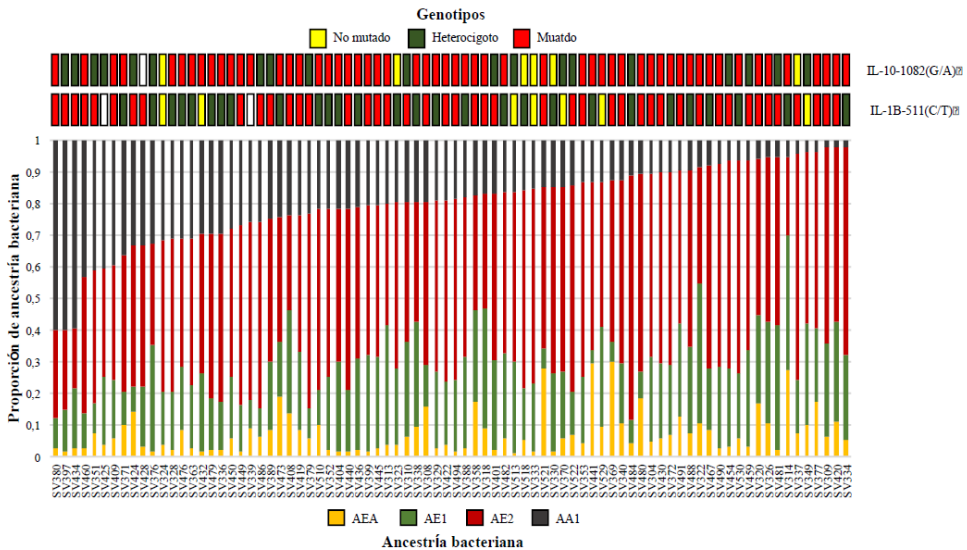


Figura 12. Perfil de proporciones de ancestros filogeográficos de *Helicobacter pylori* según genotipos de interleuquinas *IL-1B-511*, *IL-10-1082* en la población de Túquerres. Se puede observar una mayor proporción del ancestro filogeográfico Europe 2 (AE2), barras en rojo, en el perfil evolutivo de *H. pylori* aislado de Túquerres. Se encontró asociación del componente ancestral Europe 2 + Europe 1 (AE2+AE1) con la forma alélica mutada del polimorfismo *IL-10-1082(G/A)*, ($P = 0,010$), y con el genotipo mutado de *IL-1B-511(C/T)* ($P = 0,037$).

En el perfil de proporciones de ancestros filogeográficos de *H. pylori*, según genotipos de interleuquinas *IL-1B-511*, *IL-10-1082*, para Túquerres, se observa una mayor

proporción del ancestro filogeográfico Europe 2 (AE2). Se encontró asociación del componente ancestral Europe 2 + Europe 1 (AE2+AE1) con la forma alélica mutada del polimorfismo *IL-10-1082(G/A)*, ($P = 0,010$), y con el genotipo mutado de *IL-1B-511(C/T)* ($P = 0,037$). (Figura 12).

Para esta misma población, se observó asociación entre el filogenotipo Europe 2 (AE2) + Europe 1 (AE1) de *H. pylori* y la forma alélica mutada del polimorfismo *IL-10-1082 (G/A)*, ($P = 0,018$), y con el genotipo mutado de *IL-1B-511(C/T)*, ($P = 0,035$). (Figura 13).

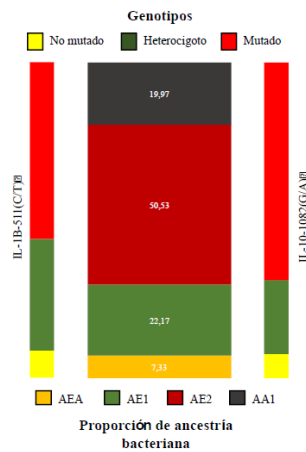


Figura 13. Proporción general promedio de genotipos de interleuquinas *IL-1B-511*, *IL-10-1082* según ancestros filogeográficos de *Helicobacter pylori* en la población de Túquerres. Se observó asociación entre el filogenotipo Europe 2 (AE2) + Europe 1 (AE1) de *H. pylori* y la forma alélica mutada del polimorfismo *IL-10-1082 (G/A)*, ($P = 0,018$) y con el genotipo mutado de *IL-1B-511(C/T)*, ($P = 0,035$).

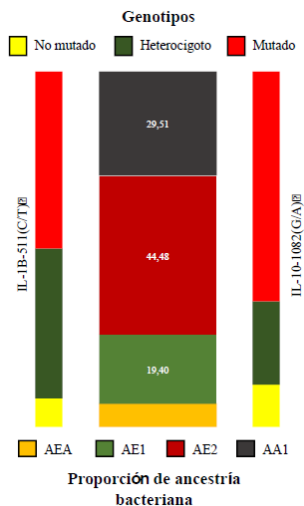


Figura 14. Proporción general promedio de genotipos de interleuquinas *IL-1B-511*, *IL-10-1082* según ancestros filogeográficos de *Helicobacter pylori* en las poblaciones de Tumaco y Túquerres.

Las proporciones promedio de las formas alélicas del polimorfismo *IL-1B-511TT* se asocian al componente promedio del ancestro Europe 2 (AE2), ($P = 0,028$), así como el componente promedio del genotipo mutado de *IL-10-1082 AA* se asocia al componente promedio del ancestro Europe 2 (AE2), independiente de la población en riesgo de cáncer gástrico, ($P = 0,012$).

En general, respecto a las proporciones de genotipos de interleuquinas *IL-1B-511*, *IL-10-1082* según ancestros filogeográficos de *H. pylori* en las poblaciones de Tumaco y Túquerres, se encontró que el promedio de las formas alélicas del polimorfismo *IL-1B-511TT* se asocian al componente promedio del ancestro Europe 2 (AE2), ($P = 0,28$), así como el componente promedio del genotipo mutado de *IL-10-1082 AA* se asocia al componente promedio del ancestro Europe 2 (AE2), independiente de la población en riesgo de cáncer gástrico, ($P = 0,012$). (Figura 14)

5.4.3.14 Coevolución Humano-*Helicobacter pylori* y biomarcadores de susceptibilidad al cáncer gástrico

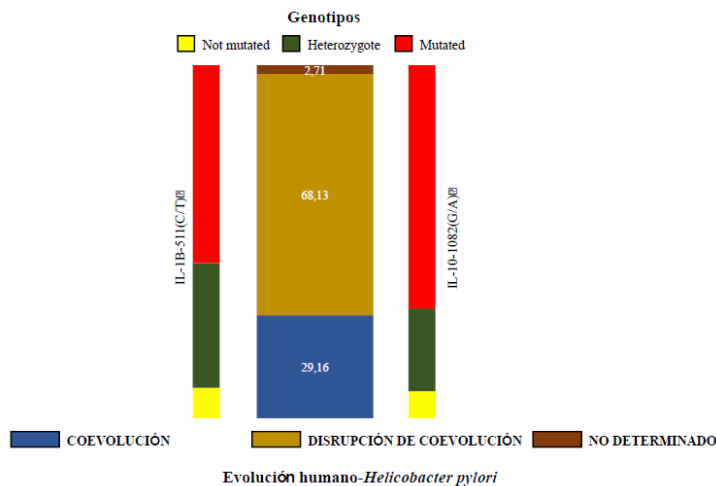


Figura 15. Efecto de la evolución Humano-*Helicobacter pylori* sobre la susceptibilidad genética al cáncer gástrico y sobre enfermedad gástrica

Los individuos con gastritis no atrófica (GNA) y con similar origen ancestral a *H. pylori* se marcaron con azul-Coevolución. Los individuos con gastritis crónica atrófica (GCA) y con origen ancestral disímil a *H. pylori* se marcaron de color magenta-Disrupción de coevolución. Los individuos con origen evolutivo no determinado se marcaron de color café. Se observa que una proporción (68,13%) de individuos con disrupción de la coevolución Humano-*H. pylori* y atrofia gástrica se asocian a la forma alélica mutada del polimorfismo *IL-1B-511TT* ($P = 0,021$) y a los alelos mutados del polimorfismo *IL-10-1082 AA* ($P = 0,014$).

Para el análisis del efecto de la coevolución o disrupción de la coevolución Humano-*H. pylori* sobre la susceptibilidad genética al cáncer gástrico y sobre la enfermedad gástrica, seleccionamos a individuos con GCA y en disrupción con el origen filogeográfico de *H. pylori* y pacientes con GNA y en coevolución con *H. pylori*. Se establecieron como criterios de coevolución cuando un individuo tiene un porcentaje de ascendencia de aproximadamente el 50% de un determinado grupo étnico, y la ascendencia de *H. pylori* es aproximadamente el 50% cerca del grupo étnico humano; entonces, se presenta un evento de evolución conjunta. Criterio de disrupción. Cuando el individuo tiene un porcentaje de ascendencia menor que 17,6% de un determinado grupo étnico, y la ascendencia de *H. pylori* es mayor que 19% de una cepa no relacionada con la etnia del individuo, se considerará un evento de ruptura coevolutiva. Se encontró que los individuos que están en disrupción de la coevolución con el origen ancestral de *H. pylori* y con atrofia gástrica se asocian a la forma alélica mutada del polimorfismo

IL-10-1082 (G/A), ($P = 0,019$) y con el genotipo mutado de *IL-1B-511(C/T)*, ($P = 0,032$). Entonces, se puede afirmar que un evento de coevolución humano-*H. pylori* no se asocia a individuos portadores de genotipos de riesgo de los polimorfismos de *IL-10-1082 (G/A)* y *IL-1B-511(C/T)* y a lesiones gástricas precancerosas. (Figura 15).

5.4.4 Sinopsis de la discusión de resultados de biomarcadores de susceptibilidad humana a cáncer gástrico

La prevalencia de infección por *H. pylori* fue mayor en la población de bajo riesgo (Tumaco, 94,3%) respecto a la población de alto riesgo (Túquerres, 85,65%) (26, 27), sin ser estas diferencias significativas. Sin embargo, existen diferencias en las tasas de incidencia de cáncer gástrico entre estas dos poblaciones, a pesar de encontrarse geográficamente cercanas (~ 200 Km) una de otra; la incidencia es 25 veces más alta en la población de Túquerres, ubicada en los Andes Colombianos con ascendencia predominante amerindia y europea, que en la población de Tumaco, ubicada en la Costa Pacífica, de ancestría principalmente africana (23, 28, 29). Este fenómeno se asemeja al descrito como “enigma africano”, que explica que la prevalencia de la infección por *H. pylori* en África es muy elevada, pero el cáncer gástrico es poco frecuente (30), similar a lo observado en la población de Tumaco, fenómeno ya reportado anteriormente y descrito como “enigma colombiano” (29). En concordancia con esto, en este trabajo y en relación con la severidad de las lesiones gástricas, en la población de alto riesgo de cáncer gástrico: Túquerres, se encontró mayor prevalencia de metaplasia intestinal (MI) (68,2%) que en Tumaco (31,8%), considerada una lesión histológica premaligna en la progresión a adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, descrita en el modelo de cascada precancerosa de cáncer gástrico (31-33). El riesgo de desarrollo de cáncer gástrico aumenta 90 veces cuando la MI aparece, en comparación a individuos con mucosa normal (33). Estas observaciones sugieren que existen otros factores complementarios de tipo sociocultural como la dieta, ambientales (29, 34) como la infección bacteriana, genéticos asociados al humano y biológicos como el sexo y la edad, importantes en el desarrollo y progresión de la enfermedad (30-33, 35-38).

Este estudio encontró que los hombres tienen un riesgo 3 veces mayor de desarrollar GCA que las mujeres, concordante con otra investigación que reportó un riesgo dos veces más común de atrofia gástrica en hombres que en mujeres, y que en ellos aparece a una edad más temprana, (< 55 años) que en las mujeres (33). En este estudio, encontramos que, después de los 30 años de edad, el riesgo de GCA se incrementa 5 veces más en las dos poblaciones de estudio, en concordancia con un estudio en población colombiana, que reportó una asociación positiva entre la gastritis atrófica y metaplasia intestinal con la edad de pacientes entre 40 y 64 años (39). Estos hallazgos deben motivar la práctica de gastroscopias en personas menores de 30 años, para lograr la detección temprana de cambios preneoplásicos, como lo reporta K. Haruma *et al.*, que encontró que la gastritis atrófica y metaplasia intestinal aumentaron significativamente el riesgo de cáncer gástrico en pacientes jóvenes de 18-29 años de edad de una población asiática (40).

Estudios sobre polimorfismos genéticos que codifican para diferentes citocinas anti y pro inflamatorias, se consideran un factor clave en el proceso de la carcinogénesis gástrica;

su estudio puede emplearse como una herramienta en la búsqueda de variaciones en la susceptibilidad genética individual a cáncer gástrico (31, 35, 36, 38, 41, 42).

Este estudio encontró diferencias significativas en la distribución de las frecuencias de los genotipos *IL-1B-511TT* e *IL-10-1082AA* entre las dos poblaciones, al ser **más frecuentes en los pacientes** de la zona de alto riesgo de cáncer gástrico (54 y 63,9%, respectivamente) en comparación con los pacientes de la zona de bajo riesgo (36,6 y 54,3%, respectivamente). Resultados similares los encontró Zabaleta *et al.* (43) en las frecuencias alélicas y genotípicas de *IL-1B-511TT* e *IL10-1082AA* más altas en individuos de alto riesgo de cáncer gástrico, afroamericanos (26,8 y 41,2%, respectivamente) que en caucásicos de bajo riesgo (12,1 y 26%, respectivamente); no obstante, la distribución de las frecuencias de estos genotipos fue mayor para las poblaciones colombianas encontradas en nuestro estudio, en el que las frecuencias alélicas de los genotipos de riesgo *IL-1B-511T* e *IL-10-1082A* fueron más altas en los pacientes de la población de alto riesgo de cáncer gástrico: Túquerres (72% y 79%, respectivamente), que en la población de bajo riesgo: Tumaco (66 y 72%).

A las diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *IL-1B-511* e *IL-10-1082* entre las dos poblaciones de este estudio, posiblemente las influya la composición genética de los grupos étnicos en estas regiones (44-48). La alta frecuencia del alelo de riesgo *IL-1B-511T* en la población de Túquerres: alto riesgo de cáncer gástrico, fue similar a la reportada para poblaciones de Latinoamérica, como Perú (79%), Venezuela (52%) y Ecuador (62,9%) (49-51), mientras que la frecuencia del alelo de riesgo *IL-10-1082A* encontrada en la misma población fue alta y similar a la reportada para poblaciones asiáticas y latinas (45-47, 52-54).

Los genotipos *IL-1B-511TT* e *IL-10-1082AA* se asocian a mayor riesgo de lesiones precursoras de cáncer gástrico (49, 52) en poblaciones caucásicas (20, 41), en Colombia (52, 45), Venezuela (55), EEUU (56), asiáticas, y en el Japón (57). Estos estudios se apoyan en que la *IL-1β* inducida por *H. pylori* es una citocina proinflamatoria que modula la función biológica de varios tipos de células epiteliales gástricas (56); es un inhibidor del ácido gástrico *in vivo* que inicia y amplifica la respuesta inflamatoria y lleva a hipoclorhidria y atrofia gástrica (32, 41, 56). Esta citocina se encuentra aumentada en portadores de los genotipos de *IL-1B-511*, *IL-1B-31* e *IL-1RNA2*A2* y, por consiguiente, aumenta el riesgo de lesiones precancerosas y adenocarcinomas de tipo distal (33, 34, 58).

Se encontró asociación positiva entre el polimorfismo *IL-1B-511* y GCA en la población de alto riesgo; los pacientes portadores de los genotipos *IL-1B-511CT* e *IL-1B-511TT* presentaron un aumento del riesgo de 5,54 y 2,35 veces mayor de GCA (OR = 5,54; IC 95% 0,58-52,82); (OR = 2,35; IC 95% 0,25-21,9), aunque dicha asociación no fue significativa. Resultados compatibles con lo anterior en pacientes colombianos (52), reportaron asociación entre el genotipo *IL-1B-511TT* y metaplasia intestinal, (OR=4,05; IC 95% 1,35-12,1) y el metanálisis de Peleteiro *et al.* (52) que informaron una asociación positiva entre el genotipo *IL-1B-511CT* con MI en una población

de alto riesgo de cáncer gástrico de origen caucásico (OR=1,86; IC 1,00-3,45), pero no asociación en una población de bajo riesgo de cáncer gástrico de origen africano (40). El efecto biológico de la IL-1 β en el riesgo de la carcinogénesis gástrica continúa presentando disparidad, como lo evidencian varios metanálisis de asociación (25, 50, 59) y no asociación (45).

En este estudio, se encontró que el genotipo *TNF-A-308AA* está ausente en la población de alto riesgo de cáncer gástrico, mientras que en la población de bajo riesgo solo se presenta en el 2,9% de los pacientes del grupo control GNA. Las frecuencias alélicas y genotípicas para este polimorfismo siguen la tendencia mundial de baja frecuencia del alelo mutante A y un aumento significativo del alelo normal G (50). Se puede afirmar que este polimorfismo no se encuentra asociado con lesiones precursoras de cáncer gástrico en ninguna de las dos poblaciones de estudio, lo que concuerda con los hallazgos de otros estudios, como los de Acosta *et al.* (50), Torres *et al.* (59), Martínez *et al.* (45) en población peruana y colombiana; resultados de no asociación también se reportaron en el metanálisis de Peleteiro *et al.* (53) y en el estudio de Kato *et al.* (55) en Venezuela. El consenso de estos resultados más los encontrados en este trabajo sugieren que este polimorfismo no debe ser considerado como un predictor para el riesgo de cáncer gástrico en poblaciones colombianas, posición compartida con otros autores, que concluyen que el polimorfismo *TNF-A-308* no es relevante como factor predictor del riesgo de cáncer gástrico en poblaciones hispanas (50).

La citocina proinflamatoria *IL-10*, tiene como función *in vivo* limitar las respuestas inflamatorias (19, 32, 60). El genotipo *IL-10-1082GG* se asocia con una mayor producción de IL-10 y efectos inhibidores de la función inflamatoria de citocinas, como, por ejemplo, la IL-1 β y TNF- α . Mientras que el genotipo *IL-10-1082AA* se asocia a baja cantidad de IL-10 en la mucosa gástrica y a cáncer gástrico (46). En esta investigación, se encontró que el alelo G presente en los genotipos *IL-10-1082GG+GA* vs. *GG* se asocia significativamente a GCA en pacientes del grupo control de la población de Túquerres: alto riesgo de cáncer gástrico; asociación no reportada para la población de Tumaco. Previamente se reportó, en poblaciones caucásicas, el genotipo asociado a cáncer gástrico *IL-10-1082AA*, mientras que en poblaciones asiáticas es *IL-10-1082AG* (25, 37, 39), donde el alelo de riesgo es G, igual a lo reportado en la población de alto riesgo de este estudio. En esta investigación, no se identificó asociación entre el genotipo *IL-10-1082AA* y el riesgo de desarrollar GCA, resultados concordantes con lo reportado en un estudio realizado en población colombiana, donde no se encontraron diferencias en la distribución de los genotipos *IL-10-1082 AA+GA* vs. *GG* entre el grupo control y el grupo de GCA (OR = 2,91; IC 95% 0,76-11,08) (52). Un resultado concluyente al respecto remite a que los individuos que habitan en la población de alto riesgo de cáncer gástrico de Colombia: Túquerres, y portadores del genotipo mutado *IL-10-1082AG*, tienen un riesgo 5,45 veces mayor de desarrollar atrofia gástrica que los individuos portadores del genotipo *IL-10-1082AA* (OR: 5,45; IC95% 1-30,59), lo que destaca que esta asociación no se encontró en individuos que habitan en la población de bajo riesgo de cáncer gástrico: Tumaco. Estos resultados son comparables con lo encontrado para poblaciones de origen asiático, también catalogadas de alto riesgo a cáncer gástrico, y

donde Loh *et al.* (44) encontró que este genotipo se asocia con cáncer gástrico (OR: 1,56 IC 95% 1,23-1,96), similar a lo reportado por Zhou *et al.* (54) (OR: 1,50 IC 95% 1,06-2,11). Este genotipo se asocia a una baja expresión de la citocina IL-10 en la mucosa gástrica, con la disminución de su efecto antiinflamatorio y subsecuente pérdida de la inhibición del efecto proinflamatorio conferido por algunas citocinas, como la IL- β y el FNT- α (47) e inducido por la infección por *H. pylori* (19, 20, 35, 44, 45).

Diversos autores proponen que los contrastantes de la asociación de los polimorfismos con lesiones precancerosas y cáncer gástrico en poblaciones del mundo son el resultado de diferencias en la composición genética de los grupos étnicos que causan efectos sobre su frecuencia (23, 30, 43, 45, 47, 53), resultados que se ajustan a los obtenidos en este estudio, donde la distribución de los genotipos y alelos de los polimorfismos de riesgo estudiados son significativamente diferentes entre las dos poblaciones, con contraste en el origen étnico: Tumaco, de origen principalmente africano, y Túquerres, de origen mayormente amerindio y evidencia de asociación entre el genotipo mutado *IL-10-1082AG* con GCA. Es posible que estas evidencias, apoyadas en la teoría coevolutiva demostrada en nuestras poblaciones de estudio, que describe que la interrupción de la coevolución huésped-*H. pylori* se asocia a lesiones gástricas más severas (23), determinen relaciones biológicas menos favorables para el huésped (19, 55), y expliquen, en parte, las diferencias entre el riesgo e incidencia de cáncer gástrico entre las dos poblaciones colombianas de estudio.

5.4.5 Conclusiones capítulo 5. Biomarcadores de susceptibilidad humana a cáncer gástrico

El contraste de riesgo de **cáncer gástrico** en las dos poblaciones puede determinarse por la interacción de varios factores ambientales genéticos-evolutivos y los de susceptibilidad humana a cáncer gástrico; entre estos últimos:

Diferencias significativas se identificaron en la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de *IL-1B-511* e *IL-10-1082* y la asociación positiva entre el genotipo *IL-10-1082AG* con atrofia gástrica en la población de alto riesgo de cáncer gástrico en Colombia.

Los individuos que habitan en la población de alto riesgo de cáncer gástrico y portadores del genotipo mutado *IL-10-1082AG*, tienen un riesgo 5,45 veces mayor de desarrollar atrofia gástrica que los individuos portadores del genotipo *IL-10-1082AA*.

Las proporciones de los genotipos mutados *IL-1B-511* e *IL-10-1082* fueron significativamente más altas en individuos infectados por *H. pylori* de ancestro filogeográfico primordialmente Europe 2 (EA2), independiente de la población en riesgo de cáncer gástrico.

Las proporciones de los genotipos mutados *IL-1B-511* e *IL-10-1082* fueron significativamente más altas en humanos de origen evolutivo básicamente amerindio en la población de alto riesgo de cáncer gástrico, que las proporciones encontradas de

estos mismos genotipos en individuos de origen ancestral principalmente africano en la población de bajo riesgo de cáncer gástrico.

Los individuos con gastritis atrófica con metaplasia y en disrupción con los ancestros filogeográficos de *H. pylori*, presentaron una mayor proporción de los genotipos mutados de *IL-1B-511* e *IL-10-1082* independiente del riesgo poblacional de cáncer gástrico.

Entonces, se puede afirmar que un evento de coevolución humano-*H. pylori* no se asocia a individuos portadores de genotipos de riesgo de los polimorfismos de *IL-10-1082 (G/A)* y *IL-1B-511(C/T)* y a lesiones gástrica precancerosas.

5.5 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 5

1. Peek RM, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC, et al. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest*. 1995 Dec;73(6):760-70. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8558837/>
2. Sachs G, Weeks DL, Melchers K, Scott DR. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:349-69. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142156
3. Mandell L, Moran AP, Cocchiarella A, Houghton JM, Taylor N, Fox JG, et al. Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. *Infect Immun*. 2004 Nov;72(11):6446-54. doi: 10.1128/IAI.72.11.6446-6454.2004
4. Hwang IR, Kodama T, Kikuchi S, Sakai K, Peterson LE, Graham DY, et al. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1beta production in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2002 Dec;123(6):1793-803. doi: 10.1053/gast.2002.37043
5. Girardin SE, Boneta IG, Carneiro LA, Antignac A, Jéhanno M, Viala J, et al. NodI detects a unique mucopeptide from Gram negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003 Jun; 300(5625):1584-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.1084677>
6. Girardin SE, Travassos LH, Herve M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by NodI and Nod2. *J Biol Chem*. 2003 Oct 24;278(43):41702-8. doi: 10.1074/jbc.M307198200
7. Eaton KA, Mefford M, Thevenot T. The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7456-61. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7456
8. Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, et al. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Nov;60(11):2334-46. doi: 10.1007/s00018-003-3020-0
9. Bravo LE, Matta AJ, Restrepo JM. Immune response Th1/Th2 to *Helicobacter pylori* and Helminths in co-infected patients. *Rev Chil Pediatr*. 2020 Jun;91(3):363-70. doi: 10.32641/rchped.v91i3.1431. PMID: 32730516.
10. Bhuiyan TR, Islam MM, Uddin T, Chowdhury MI, Janzon A, Adamsson J, et al. Th1 and Th17 responses to *Helicobacter pylori* in Bangladeshi infants, children and adults. *PLoS One*. 2014 Apr 8;9(4):e93943. doi: 10.1371/journal.pone.0093943
11. Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007;21(2):205-14. doi: 10.1016/j.bpg.2006.10.005
12. Mueller A, Falkow S, Amieva MR. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: what can be learned by studying the response of gastric epithelial cells to the infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Aug;14(8):1859-64. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0820
13. Correa P, Schneider BG. Etiology of gastric cancer: what is new?. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Aug;14(8):1865-8. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0029
14. Holcombe C. *Helicobacter pylori*: The African enigma. *Gut*. 1992 Apr; 33(4):429-31. doi: 10.1136/gut.33.4.429

15. Whary MT, Sundina N, Bravo LE, Correa P, Quiñones F, Caro F, et al. Intestinal helminthiasis in Colombian children promotes a Th2 response to *Helicobacter pylori*: possible implications for gastric carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Jun;14(6):1464-9. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0095
16. Ernst PB, Peura DA, Crowe SE. The translation of *Helicobacter pylori* basic research to patient care. *Gastroenterology.* 2006 Jan;130(1):188-206. doi: 10.1053/j.gastro.2005.06.032
17. Wu MS, Chen CJ, Lin JT. Host environment interactions: their impact on progression from gastric inflammation to carcinogenesis and on development to new approaches to prevent and treat gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Aug;14(8):1878-82. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0792
18. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system. International workshop on the histopathology of gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol.* 1996 Oct;20(10):1161-81. doi: 10.1097/00000478-199610000-00001
19. Moore K, de Waal R, Coffman R, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683
20. Rad R, Dossumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, et al. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 2004;53(8):1082-9. doi: 10.1136/gut.2003.029736
21. Xue H, Lin B, Ni P, Xu H, Huang G. Interleukin-1 β and interleukin-1 RN polymorphisms and gastric carcinoma risk: a metaanalysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010 Oct; 25:1604-17. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06428.x
22. Camargo MC, Mera R, Correa P, Peek RM Jr, Fontham ET, Goodman KJ, et al. Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Sep; 15(9):1674-87. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0189
23. Kodaman N, Pazos A, Schneider BG, Piazzuelo MB, Mera R, Sobota RS, et al. Human and *Helicobacter pylori* coevolution shapes the risk of gastric disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2014;111(4):1455-60. doi: 10.1073/pnas.1318093111
24. Larsson SC, Andersson SO, Johansson JE, Wolk A. Fruit and vegetable consumption and risk of bladder cancer: A prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Sep;17(9):2519-22. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0407
25. Martínez T, Hernández G, Bravo M, Trujillo E, Quiroga A, Albis R, et al. Asociación de los polimorfismos IL-1 β -511 e IL-1RN, y *Helicobacter pylori* cagA positivo con cáncer gástrico en una zona de riesgo alto en Colombia. *Rev. méd. Chile.* 2011;139(10):1313-21. doi: 10.4067/S0034-98872011001000010
26. Matta AJ, Pazos A, Bustamante A, Bravo LE. Genomic variability of *Helicobacter pylori* isolates of gastric regions from two Colombian populations. *World J Gastroenterol.* 2017 Feb 7;23(5):800-9. doi: 10.3748/wjg.v23.i5.800
27. Pazos A. Ancestros filogeográficos, susceptibilidad antimicrobial y marcadores de virulencia de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica. Universi-

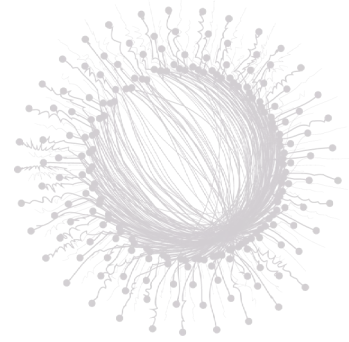
- dad del Valle 2012. Disponible en: <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/7793/1/CB-0516176.pdf>.
28. Piñeros M, Pardo C, Gamboa O, Hernández G. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia: Instituto Nacional de Cancerología e Instituto Geográfico Agustín Codazzi. 3 ed. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia, 2010;99-107. Disponible en: <https://ecare.hablame.co/login.php>
 29. Correa P, Piazuelo MB. Gastric cancer: The colombian enigma. *Rev Col Gastroenterol.* 2010;25:334-7. Disponible:https://www.researchgate.net/publication/262754461_Gastric_cancer_The_colombian_enigma
 30. Holcombe C. Helicobacter pylori: The African enigma. *Gut.* 1992 Apr;33(4):429-31. doi: 10.1136/gut.33.4.429
 31. Peek RM, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan; 2(1): 28-37. doi: 10.1038/nrc703
 32. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet.* 1975 Jul;12:2(7924):58-60. doi: 10.1016/s0140-6736(75)90498-5
 33. Sipponen, P, Marshall, B. J. Gastritis and gastric cancer. Western countries. *Gastroenterol Clin Noeth Am.* 2000 Sep;29(3):579-92. doi: 10.1016/s0889-8553(05)70131-x
 34. Suárez R; Wiesner C, González C, Cortés C, Shinci A. Antropología del cáncer e investigación aplicada en salud pública. *Revista de Estudios Sociales,* 2004 Feb;17:42-55. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/815/81501705.pdf>
 35. Wroblewski LE, Peek RM Jr, Wilson KT. Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Oct;23(4):713-39. doi: 10.1128/CMR.00011-10
 36. Bonequi P, Meneses-González F, Correa P, Rabkin CS, Camargo MC. Risk factors for gastric cancer in Latin America: a meta-analysis. *Cancer Causes Control.* 2013 Feb;24(2):217-31. doi: 10.1007/s10552-012-0110-z
 37. Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Nishida T, Komori M, Yasumaru M, et al. Helicobacter pylori eradication to prevent gastric cancer: underlying molecular and cellular mechanisms. *World J Gastroenterol.* 2006 Mar 21;12(11):1671-80. doi: 10.3748/wjg.v12.i11.1671
 38. Persson C, Canedo P, Machado JC, El-Omar EM, Forman D. Polymorphisms in inflammatory response genes and their association with gastric cancer: A HuGE systematic review and meta-analyses. *Am J Epidemiol.* 2011 Feb 1;173(3):259-70. doi: 10.1093/aje/kwq370
 39. Martínez J, Henao S, Granados C. La gastritis crónica atrófica corporal y la edad. *Revista Colombiana de Gastroenterología.* 2007;22(1):17-22. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3377/337729274005.pdf>
 40. Haruma K, Komoto T, Kamada T, Ito M, Kidatai M, Yoshihara M, et al. Helicobacter pylori infection is a major risk factor for gastric cancer in young patients. *Scan J Gastroenterol.* 2000;35:255-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/003655200750024100>
 41. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, et al. Helicobacter pylori and interleukin genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Nov 20;94(22):1680-7.

- doi: 10.1093/jnci/94.22.1680
42. Ma J, Wu D, Hu X, Li J, Cao M, Dong W. Associations between cytokine gene polymorphisms and susceptibility to *Helicobacter pylori* infection and *Helicobacter pylori* related gastric cancer, peptic ulcer disease: A meta-analysis. *PLoS One*. 2017 Apr 28;12(4):e0176463. doi:10.1371/journal.pone.0176463
 43. Zabaleta J, Schneider B, Ryckman K, Hooper P, Camargo C, Piazuelo B, et al. Ethnic differences in cytokine gene polymorphisms: potential implications for cancer development. *Cancer Immunol Immunother*. 2008 Jan;57(1):107-14. doi: 10.1007/s00262-007-0358-4
 44. Loh M, Koh KX, Yeo BH, Song CM, Chia KS, Zhu F, et al. Meta-analysis of genetic polymorphisms and gastric cancer risk: variability in associations according to race. *Eur J Cancer*. 2009 Sep;45(14):2562-8. doi: 10.1016/j.ejca.2009.03.017
 45. Martínez T, Hernández G, Bravo MM, Trujillo E, Quiroga A, Robayo J, et al. Polimorfismos genéticos de interleucinas IL- β -511, IL-1RN, IL-10, TNF- α -308 e infección por *Helicobacter pylori* CagA positivo en cáncer gástrico y úlcera duodenal en diferentes poblaciones en Colombia. *Rev Colomb Cancerol*. 2011;15(2):85-97. Disponible: <https://www.revistacancercol.org/index.php/cancer/article/view/482/325>
 46. Won HH, Kim JW, Kim MJ, Kim S, Park JH, Lee KA. Interleukin 10 polymorphisms differentially influence the risk of gastric cancer in East Asians and Caucasians. *Cytokine*. 2010 Jul;51(1):73-7. doi: 10.1016/j.cyto.2010.03.007
 47. Kim J, Kim J, A-Lee K. Ethnic differences in gastric cancer genetic susceptibility: Allele flips of interleukin gene. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr;28(16): 4558-65. doi: 10.3748/wjg.v20.i16.4558
 48. Garza E, Bosques F, El-Omar E, Hold G, Tijerina R, Maldonado H. Role of the polymorphic IL-1 β , IL-1RN and TNF- α genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int J Cancer*. 2005 Mar 20;114(2):237-41. doi: 10.1002/ijc.20718
 49. Canas M, Moran Y, Rivero MB, Bohórquez A, Villegas V, Rendón Y, et al. Interleukin-1 genetic polymorphism: association with gastric cancer in the highrisk Central-Western population of Venezuela. *Rev Med Chil*. 2009 Jan;137(1):63-70. doi: /S0034-98872009000100009
 50. Acosta O, Solano L, Huerta D, Oré D, Sandoval J, Figueroa, J, et al. Variabilidad genética de la respuesta inflamatoria. I. Polimorfismo -511 C/T en el gen IL1 β en diferentes subpoblaciones peruanas. *An Fac med*. 2012;73(3):221-5. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v73n3/a09v73n3.pdf>
 51. Cumbal N. Estudio de los polimorfismos en las regiones -31(T>C), -511(C>T) y +3954(C>T) del gen IL-1 β de interleuquina-1 β mediante PCR-RFLP en población ecuatoriana con cáncer gástrico y presencia de *Helicobacter pylori*. Tesis de pregrado. Ecuador. Escuela politécnica del ejército; 2010. Disponible en: <https://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/889/T-ESPE-029617.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 52. Martínez T, Hernández GA, Bravo MM, Trujillo E, Pérez J, Robayo JC, et al. Pre-cancerous gastric lesions in Colombian patients: association with IL-1 β -511, IL-1RN, IL-10-919, IL-10-1082, TNF- α -308 genes polymorphisms, and anti-*Helicobacter pylori* cagA IgG antibodies. *Rev Colomb Cancerol*. 2014; 18 (1): 8–17. doi: 10.1016/S0123-9015(14)70220-3
 53. Peleteiro B, Lunet N, Carrilho C, Duraes C, Machado JC, La Vecchia C, et al. Associ-

- ation between cytokine gene polymorphisms and gastric precancerous lesions: systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(3): 762-76. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0917
54. Zhou Y, Li N, Zhuang W, Liu G, Wu T, Yao X, et al. Interleukin-10-1082 promoter polymorphism associated with gastric cancer among Asians. *Eur J Cancer.* 2008 Nov; 44 (17): 2648-54. doi. 10.1016/j.ejca.2008.07.017
 55. Kato I, van Doorn LJ, Canzian F, Plummer M, Franceschi S, Vivas J, et al. Host bacterial interaction in the development of gastric precancerous lesions in a high risk population for gastric cancer in Venezuela. *Int J Cancer.* 2006 Oct; 119 (7): 1666-71. doi. 10.1002/ijc.21979
 56. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature.* 2000 Mar; 404(6776): 398-402. doi. 10.1038/35006081
 57. Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimura H. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology.* 2002 Jul; 123 (3): 92-105. doi. 10.1053/gast.2002.34156
 58. Perri F, Piepolia A, Bonvicinib C, Gentilea A, Quitadamo M, Di Candia M, et al. Cytokine gene polymorphisms in gastric cancer patients from two Italian areas at high and low cancer prevalence. *Cytokine.* 2005;30(5):293-302. doi: 10.1016/j.cyto.2005.01.011
 59. Torres M, Acosta C, Sicard D, Groot de Restrepo H. Genetic susceptibility and risk of gastric cancer in a human population of Cauca, Colombia. *Biomédica.* 2004 Jun; 24(2):153-62. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84324206>
 60. Johnson VJ, Yucesoy B, Luster MI. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. *Cytokine.* 2004 Sep;27(6):134-41. doi: 10.1016/j.cyto.2004.05.002

CAPÍTULO 6.

Biomarcadores evolutivos de cáncer gástrico



INTRODUCCIÓN

La presencia de *H. pylori* en el estómago humano se describió por primera vez por los Premios Nobel Robin Warren y Barry Marshall en 1980 (1) y, a partir de 1985, se vinculó etiológicamente la infección con el desarrollo de cáncer gástrico (2). A pesar de que su papel se asoció inicialmente como el principal agente en la carcinogénesis gástrica, nuevos estudios encontraron que *H. pylori* estaba presente en la mitad de la población mundial (3), pero tan solo del 1-10% adquirirían úlcera duodenal y del 0,1-3% carcinoma gástrico (4, 5). Por esta razón, la relación de *H. pylori* como un patógeno no es clara y aún existe debate en la comunidad científica sobre el rol del microorganismo en el desarrollo de la enfermedad (6-8). *H. pylori* es una de las bacterias más ancestrales del ser humano y la evidencia más antigua de la presencia del microbio se encontró en la Momia Otzi en los Alpes del Este de Italia, cuya antigüedad data hace 5300 años (9, 10). Se estima que la colonización por este microorganismo ocurrió desde la especiación y origen del *Homo sapiens* hace 130000 años aproximadamente, y lo ha acompañado en sus diferentes rutas migratorias desde el Este de África desde hace 60000 años (11, 12), al originar diferentes poblaciones y subpoblaciones de *H. pylori* acordes a las características geográficas y genéticas del hospedero (13).

Las tasas de incidencia y mortalidad de cáncer gástrico varían alrededor del mundo dependiendo de la ubicación geográfica, genética del huésped y el linaje evolutivo de la bacteria. Para el año 2018, se reportaron 1 millón de casos y 783000 muertes a causa de esta enfermedad en todo el mundo (14). Las más altas tasas de incidencia se observaron en las poblaciones del Este de Asia con alrededor de 40 a 60 casos por cada 100000 habitantes (*H. pylori* de origen evolutivo: hspEAsia) (15). En el Este de Europa, se estima que la incidencia es de aproximadamente 35 por cada 100000 habitantes (*H. pylori*: hpEurope) y en América Latina, varía entre 20 y 30 casos por cada 100000 personas (*H. pylori*: hspColombia, hspMexico, hspNicaragua, etc). En algunos países de África (*H. pylori*: hspWAfrica y hpAfrica) y en Norte América (*H. pylori*: hpEurope) la incidencia de cáncer gástrico es baja: 0,6/100000 habitantes y 5 a 6 casos por cada 100000 habitantes, respectivamente (14-18).

6.1 EVOLUCIÓN DE *Helicobacter pylori* Y SU ASOCIACIÓN CON EL CÁNCER GÁSTRICO

Desde la migración del ser humano fuera de África hace 60000 años, los procesos alopátricos contribuyeron significativamente a la formación de las distintas poblaciones bacterianas de *H. pylori* de acuerdo con la población humana que se encontraba en cada continente. Así, se clasificarían diferentes poblaciones (hpEuropa, hpAfrica1, hpAfrica2 y hpEAsia); a su vez, hpAfrica1 se dividió en hspWAfrica y hspSAfrica y hpEAsia en subpoblaciones hspAmerindia, hspEastAsia y hspMaori (13). Cada cepa de *H. pylori* adquiriría características genéticas propias que serían determinantes en el cáncer gástrico (19-21), y el reciente encuentro hace más de 500 años, de diferentes poblaciones humanas provenientes de Europa y Africa, a la vez implicó el encuentro de diferentes linajes de *H. pylori*.

En los Andes de Colombia, se identificaron aislados de *H. pylori* que pertenecen a un nuevo linaje, conocido como hspColombia, que sugiere un nuevo conjunto de interacciones con su huésped, que empezó hace más de 500 años, mientras que en las cepas en la Costa Pacífica del país, los aislados tienen una ascendencia principalmente africana (hspWAfrica y hspSAfrica) (22, 23). En el Departamento de Nariño (Colombia), al comparar Túquerres (montañas) y Tumaco (costa), se ha reportado que las personas que se encontraban con alta ancestría amerindia, pero infectadas con una cepa de *H. pylori* que contenía un porcentaje mayor al 19,8% de ascendencia africana (disrupción coevolutiva), presentaban una lesión gástrica de tipo metaplasia intestinal severa o extensa. Mientras que los individuos residentes en Tumaco, con ancestría africana e infectados con una cepa con ancestría africana (coevolución), tuvieron bajo nivel de desarrollo de lesiones gástricas, lo que permitió comprender que la coevolución y el linaje de la bacteria son un factor determinante en la carcinogénesis gástrica (23, 24).

6.2 COEVOLUCIÓN DEL GENOMA HUMANO Y DE *Helicobacter pylori* MODULA EL RIESGO DE CÁNCER GÁSTRICO

La bacteria *Helicobacter pylori* coloniza la mucosa gástrica de aproximadamente la mitad de la población mundial. Aunque todas las personas infectadas desarrollan inflamación gástrica, solo una pequeña fracción (<1%) desarrolla adenocarcinoma gástrico, que representa el 10% de la mortalidad mundial relacionada con el cáncer (25, 26). La prevalencia de la infección por *H. pylori* en una población generalmente no predice la incidencia de secuelas clínicas graves, lo que sugiere que la variación genética del huésped y del patógeno, así como los factores ambientales y dietéticos, desempeñan un papel importante (27-30). Sin embargo, estos factores, analizados de forma aislada, no han proporcionado explicaciones adecuadas para la variabilidad en los resultados de la infección.

Desde que acompañó a *Homo sapiens* fuera de Africa, *H. pylori* ha evolucionado junto con poblaciones humanas geográficamente definidas (31). Tanto la teoría evolutiva como las comparaciones empíricas predicen que los patógenos crónicos con transmisión vertical o familiar, como *H. pylori*, deberían tornarse menos virulentos con el tiempo (32-34). De hecho, a la mayoría de las infecciones por *H. pylori* la toleran

bien los humanos, al provocar solo una inflamación de bajo grado en la mayoría de los portadores adultos, y posiblemente conferir protección contra el asma y algunos trastornos esofágicos (35-37). Sin embargo, *H. pylori* también puede transmitirse horizontalmente, especialmente en condiciones asociadas a la pobreza, comunes en países en vías de desarrollo (38). En estas situaciones, la infección con múltiples cepas puede ser más común que en los países desarrollados (39). Debido a que se sabe que *H. pylori* es altamente recombinante (49), la infección con múltiples cepas puede llevar a la transferencia horizontal de genes de segmentos que no han coevolucionado con sus hospedadores, lo que interrumpe la selección de reducción de virulencia (41-43). Por lo tanto, en regiones donde los seres humanos están altamente mezclados, como en América del Sur, la relación humano-*H. pylori* puede ser menos probable que refleje un complejo adaptado y de virulencia reducida.

En muchas partes de América del Sur y Centro América, la incidencia de cáncer gástrico es mayor en áreas montañosas que en regiones costeras (44). Para explorar si este fenómeno puede explicarse por la variación genética del huésped y del microorganismo, aprovechamos un laboratorio natural que consiste en dos comunidades colombianas que tienen una prevalencia prácticamente idéntica de infección por *H. pylori* (~90%), pero tasas de incidencia extremadamente diferentes de cáncer gástrico. La tasa de incidencia de cáncer gástrico reportada en la ciudad de Túquerres, en los Andes de Colombia (~150 por 100000) es aproximadamente 25 veces mayor que en la ciudad de Tumaco, a solo ~200 km de distancia, en la Costa (~6 por 100000) (45). Además, las personas de las montañas muestran una mayor incidencia de lesiones gástricas precancerosas (46).

Los análisis de mezcla de *H. pylori* se han utilizado para describir la historia evolutiva de las bacterias en relación con las migraciones humanas (47-49). En este estudio, ampliamos estos análisis para dilucidar el papel que la mezcla en *H. pylori* y los humanos ha desempeñado en la enfermedad gástrica (es decir, las puntuaciones histopatológicas), al evaluar explícitamente si la variación en los ancestros tanto del huésped como del patógeno y su coevolución afectan las trayectorias y el riesgo de la enfermedad.

6.3 RELEVANCIA DE LA COEVOLUCIÓN HUMANA Y DE *Helicobacter pylori*

La teoría predice que los patógenos crónicos con transmisión vertical o familiar deberían tornarse menos virulentos con el tiempo debido a la coevolución. Aunque transmitido de esta forma, *Helicobacter pylori* es el principal agente causante del cáncer gástrico. En dos poblaciones colombianas distintas, con niveles similares de infección por *H. pylori*, pero incidencias diferentes de cáncer gástrico, examinamos la ancestría humano y patógeno en muestras para evaluar si su variación genómica afecta la gravedad de las lesiones premalignas. La interacción entre la ancestría amerindio humano y la ancestría africana de *H. pylori* explicó la disparidad geográfica en la presentación clínica. Concluimos que las relaciones coevolutivas son determinantes e importantes del riesgo de enfermedad gástrica y que la colonización histórica de las Américas continúa influyendo en la salud de las poblaciones americanas modernas.

6.4 DETECCIÓN DE BIOMARCADORES EVOLUTIVOS DE CÁNCER GÁSTRICO EN NARIÑO

Para determinar si la coevolución entre el huésped y el patógeno influye en el riesgo de enfermedad, examinamos la asociación entre la gravedad de las lesiones gástricas y los patrones de variación genómica en muestras de humanos y *H. pylori*. Los pacientes se reclutaron de dos poblaciones de Nariño-Colombia geográficamente distintas, con incidencias significativamente diferentes de cáncer gástrico, pero una prevalencia de infección por *H. pylori* idéntica. Todos los aislados de *H. pylori* contenían la ancestría genética, al ser predominante un clúster ancestral africano en una población costera de bajo riesgo y un clúster europeo en una población montañosa de alto riesgo. La ancestría humana de los individuos también variaba según la geografía, con predominio de ancestría africana en la Región Costera (58%) y de ancestría amerindia en la región montañosa (67%). La interacción entre la ancestría del huésped y del patógeno explicó completamente la diferencia en la gravedad de las lesiones gástricas en las dos regiones de Colombia. En particular, la ancestría africana de *H. pylori* era relativamente benigna en humanos de ancestría africana, pero era perjudicial en individuos con una considerable ancestría amerindia. Por lo tanto, es probable que la coevolución modulase el riesgo de enfermedad, y la disrupción de los genomas no coevolucionados de humanos y *H. pylori* puede explicar la alta incidencia de enfermedad gástrica en la población montañosa.

6.4.1 Evaluación de alteraciones histológicas de mucosa gástrica

Se tomaron muestras de biopsia de la mucosa gástrica de todos los participantes del antro gástrico (curvatura mayor, a menos de 3 cm del píloro), la incisura angular (curvatura menor) y el cuerpo (pared anterior media) para la histopatología. Una biopsia adicional del antro de cada participante se congeló en glicerol/tioglicolato para el cultivo posterior de *H. pylori*. Todas las endoscopias las realizó un gastroenterólogo experimentado. Una biopsia de cada uno de los tres sitios gástricos se fijó en formalina tamponada y se embebió en parafina para la histopatología. Tras la tinción con H₂E, las muestras de personas de 40 años o más (77 de Tumaco; 49 de Tuquerres) se evaluaron por doble ciego, de forma independiente por dos patólogos, sin información sobre la procedencia de las muestras. Las categorías de las lesiones gástricas diagnósticas se basaron en el sistema Sydney actualizado (50) y la Clasificación Internacional de Padova para la displasia (51). Los casos con diagnósticos discordantes se revisaron hasta llegar a un consenso. Se asignaron valores ordinales de 1 a 6, de la siguiente forma: 1 = normal, 2 = gastritis no atrófica, 3 = gastritis atrófica multifocal sin metaplasia intestinal (MAG), 4 = metaplasia intestinal (MI), 5 = displasia y 6 = carcinoma. También se ha demostrado que las diferencias morfológicas dentro de estos diagnósticos categóricos se asocian con el riesgo de cáncer gástrico (52-54). Por lo tanto, se implementó un sistema de puntuación más detallado para tener en cuenta estas diferencias. Dentro de la categoría de gastritis atrófica multifocal (MAG), la presencia de atrofia indefinida (bordeada) elevó la puntuación a 3,25, la atrofia leve a 3,5, la atrofia moderada a 3,75 y la atrofia grave a 4,0 (55). Las puntuaciones de metaplasia intestinal (MI) se aumentaron de dos formas: primero, se evaluó la extensión de la sección de biopsia que mostraba MI como <30%, entre 30% y 60% o >60% y se le asignó un valor correspondiente de 0,2, 0,4 o 0,6, respectivamente. El segundo ajuste se

basó en el tipo de MI y se determinó mediante tinción especial con ácido periódico de Schiff/azul de Alcian y diamina de hierro alto/azul de Alcian, según se describe antes, cuando fue necesario (55). La MI completa, la MI incompleta predominante mixta, la MI completa predominante mixta y la MI incompleta se asignaron valores de 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4, respectivamente. Se sumaron los dos conjuntos de medidas para crear una puntuación final de MI que oscilaba entre 4,3 y 5,0. Las puntuaciones de displasia se refinaron al asignar una puntuación de 5,25 para la categoría de displasia indefinida, 5,5 para displasia de bajo grado y 5,75 para displasia de alto grado. El sistema de puntuación detallada de histopatología se utilizó para los análisis estadísticos, excepto cuando se indicó lo contrario.

6.4.2 Cultivo, genotipado y tipificación por secuencias multilocus-MLST de *Helicobacter pylori*

H. pylori se cultivó a partir de las biopsias antrales como se describe previamente (56). Los pellets bacterianos obtenidos a partir de colonias individuales de *H. pylori* (una por sujeto, excepto en 13 residentes de Tumaco, de los cuales se identificaron dos cepas distintas por persona) se digirieron con proteinasa K y se aisló el ADN mediante extracción de fenol/cloroformo y precipitación con etanol. Cada cepa se sometió a análisis de MLST y se examinó la presencia de *cagA*, como se describe antes (57).

6.4.3 Caracterización de la ancestría de *Helicobacter pylori*

Para 288 cepas de *H. pylori*, se amplificaron por PCR y se secuenciaron ambas cadenas fragmentos de ADN de siete genes housekeeping (*atpA*, *efp*, *ureI*, *ppa*, *mutY*, *trpC* y *yphC*), que oscilan entre 398 y 627 pb por gen, para un total concatenado de 3406 pb, como se describió previamente (56). Sobre la base de las diferencias en la frecuencia alélica en estos genes estructurales, estudios anteriores (47, 48) han utilizado el algoritmo bayesiano STRUCTURE (58, 59) para asignar aislados de *H. pylori* de múltiples sitios geográficos a una de las siete poblaciones distintas (hpAfrica1, hpAfrica2, hpEurope, hpEAsia, hpNEAfrica, hpAsia2 o hpSahul). Se recuperó un conjunto de 712 secuencias utilizadas en estudios anteriores de una base de datos de MLST (<http://pubmlst.org/helicobacter>), que abarcaba las siete poblaciones globales, incluidas las subpoblaciones conocidas de hpAfrica1 (hspWAfrica y hspSAfrica) y hpEAsia (hspEAsia, hspMaori y hspAmerind). Tras alinear las secuencias colombianas ($n = 288$) con las secuencias de la base de datos de MLST, se demostró, en ejecuciones preliminares de STRUCTURE (versión 2.3), que los dos grupos altamente aislados, hpAfrica2 y hpSahul, no mostraron evidencia de superposición ancestral con las cepas colombianas. En consecuencia, se excluyeron las secuencias de hpAfrica2 y hpSahul del análisis, lo que dio como resultado un conjunto final de 1477 sitios polimórficos derivados de las 638 secuencias restantes de la base de datos de MLST: 156 secuencias de Tumaco y 132 de Tuquerres.

El modelo de mezcla de STRUCTURE asigna proporciones de ascendencia a cada muestra individual en los K grupos ancestrales inferidos. La opción de vinculación de este modelo tiene en cuenta la posición cromosómica de los polimorfismos, al incorporar en las estimaciones de ascendencia el desequilibrio de ligamiento que se espera después de la mezcla de poblaciones. Estudios anteriores han utilizado este

modelo para caracterizar seis grupos ancestrales en aislados de *H. pylori* distribuidos globalmente: AA1, AEA, AE1, AE2, y también dos grupos, AA2, de muestras de hpAfrica2 y un grupo aislado de muestras de hpSahul, raros o inexistentes en muestras colombianas (47). Nuestros análisis con $K = 4$ maximizaron la probabilidad del modelo y generaron la mayor consistencia de agrupamiento al asignar fracciones a AA1, AEA, AE1 o AE2 en todas las muestras. Las representaciones gráficas de la estructura de la población se crearon utilizando DISTRUCT (60).

6.4.4 Caracterización de la ancestría humana

El ADN humano de 242 participantes del estudio (122 de Tumaco y 120 de Túquerres) se extrajo de muestras de sangre utilizando kits Puregene (Qiagen). El ADN se genotipó utilizando ImmunoChip (61), una plataforma que contiene 196524 SNPs de la mayoría de los genes conocidos, por estar incluidos en trastornos inmunológicos. Para enriquecer los SNPs en equilibrio de ligamiento, se eliminaron los SNPs en desequilibrio de ligamiento utilizando PLINK (r^2 umbral $>0,1$) (62). Los análisis preliminares con STRUCTURE (modelo de mezcla) revelaron que la probabilidad del modelo se maximizaba en $K = 3$, con la distribución de los tres grupos ancestrales inferidos en coincidencias con las proporciones esperadas de ascendencia europea, africana y amerindia en ambas ubicaciones (63, 64). Para validar estos resultados y refinar las estimaciones de ascendencia, se fusionaron los siguientes grupos de referencia con los datos existentes utilizando el conjunto de herramientas de PLINK: todos los individuos no relacionados de las poblaciones HapMap europea (CEU) y africana (YRI) (Fase 2, versión 23) tomados de archivos alojados en el sitio web de PLINK (55); la población española ibérica (IBS) del Proyecto 1000 Genomas (66); y el subconjunto H952 de las poblaciones Karitania, Surui y colombianas en el Proyecto de Diversidad Genómica Humana (67, 68). El conjunto final de datos contenía 5947 SNP y 514 individuos. El modelo de mezcla de STRUCTURE (asumiendo frecuencias alélicas correlacionadas) se ejecutó 10 veces (50000 iteraciones después de una fase de calentamiento de 50000 iteraciones) con los ajustes predeterminados y se supervisó por información de la población de referencia. Se utilizó CLUMPP para recopilar las ejecuciones repetidas y calcular las medias de la ascendencia individual (69).

Se realizó un PCA complementario de la ancestría humana utilizando el programa R SNPRelate (70). Antes del PCA, el conjunto combinado de datos de genotipo de las poblaciones fundadoras colombianas y YRI, CEU y asiáticas orientales (CHB + JPT) se redujo a 30735 SNPs utilizando un umbral de LD de 0,5 en el entorno R con utilización de SNPRelate.

6.4.5 Análisis coevolutivo del genoma humano y de *Helicobacter pylori*

Se realizó estadística descriptiva de ascendencia para 242 sujetos humanos y 288 cepas colombianas de *H. pylori* (de 275 sujetos). De estos, 233 coincidieron y se utilizaron para calcular correlaciones de Pearson por pares entre la ascendencia humana (africana, europea, amerindia) y la ascendencia de *H. pylori* (AA1, AEA, AE1, AE2). También se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para validar las correlaciones de Pearson, ya que las pruebas de Shapiro-Wilk revelaron falta de normalidad en algunas ascendencias. Los

análisis de regresión que evalúan la dependencia de la histopatología de la ascendencia humana y de *H. pylori* se basan en datos de individuos de 40 años en adelante ($n = 121$). Debido a que cinco de los individuos (todos de la Costa) contribuyeron con dos cepas cada uno al análisis, se implementaron modelos lineales mixtos. Se utilizó la regresión ordinal, un enfoque no paramétrico, en los puntajes discretos de histopatología para determinar si la probabilidad de aumentos categóricos en los puntajes variaba significativamente con las proporciones de ascendencia, asumiendo que las probabilidades proporcionales se probaron mediante la prueba de Brant. Se construyó un modelo lineal mixto multivariable paso a paso para evaluar si la ascendencia humana y de *H. pylori*, su interacción y el estado de *cagA* podían explicar la asociación conocida entre la histopatología y la zona de residencia. Los residuales se sometieron a prueba de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Se utilizó STATA 11 (StataCorp LP) para todos los análisis.

6.5 RESULTADOS CAPÍTULO 6. BIOMARCADORES EVOLUTIVOS DE CÁNCER GÁSTRICO

6.5.1 Ancestros humanos y de *Helicobacter pylori* en la costa y las montañas andinas de Nariño

Al examinar la genética del huésped en las comunidades de montaña y costeras y producto del análisis de mezcla de datos genotípicos humanos de alta densidad, se reveló un clúster ancestral africano predominante en la población costera (proporción media de $0,58 \pm 0,23$; $n = 122$), con una ancestría amerindia significativa ($0,23 \pm 0,13$) y europea ($0,19 \pm 0,13$) (Figura 1A y C). En contraste, la población de montaña era principalmente amerindia ($0,67 \pm 0,12$; $n = 120$), con una ancestría europea significativa ($0,31 \pm 0,11$) y una proporción insignificante de ancestría africana ($0,03 \pm 0,02$, Figura 1A y D). Las estimaciones de ancestría amerindia y europea tenían una distribución aproximadamente normal en la cohorte de montaña (prueba de Shapiro-Wilk, $P > 0,37$), mientras que todas las distribuciones costeras se sesgaban ($P < 0,001$ para todas las pruebas). La falta de normalidad en las proporciones de mezcla de los individuos de la Costa es consistente con migraciones recientes y/o apareamientos no aleatorios. También se utilizó un análisis de componentes principales (PCA) para evaluar la ancestría humana, y mostró un patrón similar a los análisis de mezcla.

Encontramos que las cepas de *H. pylori* en Colombia se derivan de cuatro poblaciones ancestrales: África (AA1), Europea (AE1 y AE2) y Asia Oriental (AEA) (Figura 1B, E y F). Aunque la mayoría de los aislamientos contenía fracciones sustanciales de ancestría africana y europea, AA1 predominaba en la Costa, y AE2 predominaba en la región montañosa (véase la leyenda de la Figura 1, para las proporciones). De forma consistente con el reemplazo que realizaron las cepas de origen amerindio a partir de las cepas asiático orientales de *H. pylori*, observamos que el clúster ancestral principal en las montañas es AE2, el clúster más común en el sur de Europa, y no el clúster derivado de cepas asiáticas AEA, que se esperaría en una población humana de origen amerindio. Esta observación indica una transferencia reciente de cepas de *H. pylori* de europeos a amerindios después de la colonización.

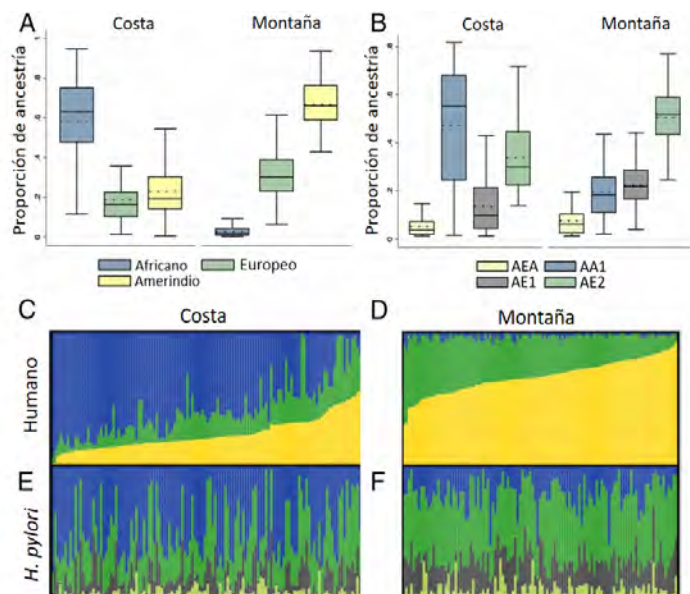


Figura 1. Ancestría humana y de *Helicobacter pylori*

(A) Distribuciones de ancestría humana de los participantes del estudio colombiano de la región costera de Tumaco ($n = 122$) y la región montañosa de Túquerres ($n = 120$). Las líneas negras indican las proporciones medianas de ancestría; las líneas punteadas indican las medias. Los límites de la caja marcan el percentil 25 y el percentil 75. (B) Distribuciones de ancestría de *H. pylori* de la región costera de Tumaco ($n = 156$) y la región montañosa de Túquerres ($n = 132$). Las estimaciones de las medias fueron $0,47 \pm 0,23$ AA1, $0,34 \pm 0,14$ AE2, $0,14 \pm 0,12$ AE1 y $0,05 \pm 0,04$ AEA en la Costa, y $0,20 \pm 0,12$ AA1, $0,50 \pm 0,11$ AE2, $0,22 \pm 0,09$ AE1 y $0,08 \pm 0,07$ AEA en la región montañosa. Las líneas negras indican las proporciones medianas de ancestría; las líneas punteadas indican las medias. En las ancestría de *H. pylori*: AEA, Ancestral del Este de Asia; AA1, Ancestral África 1; AE1, Ancestral Europa 1; y AE2, Ancestral Europa 2. Los límites de la caja marcan el percentil 25 y el percentil 75. (C–F) Proporciones de mezcla de ancestría humana (C y D) y ancestría de *H. pylori* (E y F) ($n = 233$). Cada huésped humano y su correspondiente aislado de *H. pylori* se representan por una barra vertical que abarca ambos paneles, con las proporciones de mezcla indicadas por colores. (C) Humanos de la región costera. (D) Humanos de la región montañosa. (E) *H. pylori* de la región costera. (F) *H. pylori* de la región montañosa. Para la mezcla de ancestría humana, azul = africana, verde = europea y amerindia = amarillo. Para la mezcla de ancestría de *H. pylori*, azul = AA1, verde = AE2, gris = AE1 y verde lima = AEA.

6.5.2 Correlaciones entre ancestría humana y de *Helicobacter pylori*

Se dispuso de datos de ancestría tanto humana como de *H. pylori* para 233 aislamientos (Figura 1C-F), y se realizaron pruebas de correlación entre las ancestrías humano y de *H. pylori*. Encontramos que todas las correlaciones de Pearson entre las proporciones de ancestría del huésped (African, European o Amerindian) y la ancestría de *H. pylori* AA1, AE1 y AE2 fueron significativas al nivel de 0,0005, mientras que esas correlaciones con AEA fueron significativas al nivel de 0,041 (Tabla 1). Los valores de ρ de Spearman arrojaron resultados similares. La proporción de ancestría africana del huésped se correlacionó positivamente con la ancestría AA1 ($r = 0,62$; $P < 0,0001$) y negativamente con la ancestría AE2 ($r = -0,59$; $P < 0,0001$), de modo consistente con la transmisión vertical o familiar y la coevolución. La ancestría Amerindia del huésped se correlacionó negativamente con la ancestría AA1 ($r = -0,60$) y positivamente con la ancestría AE2 ($r = 0,58$; $P < 0,0001$ en ambos casos) (Figura 2).

Tabla 1. Correlaciones entre ancestría humana y *Helicobacter pylori* en poblaciones de montaña y costera de Nariño-Colombia

	Human	<i>H. pylori</i>	r	P	95% CI
	African	AFA	-0.21	0.0015	-0.33 to -0.08
	European		0.13	0.0406	0.01 to 0.26
■	Amerindian		0.19	0.0035	0.06 to 0.31
■	African	AA1	0.62	<0.0001	0.53 to 0.69
	European		-0.34	<0.0001	-0.45 to -0.23
	Amerindian		-0.60	<0.0001	-0.68 to -0.51
	African	AE1	-0.39	<0.0001	-0.49 to -0.28
	European		0.22	0.0005	0.10 to 0.34
■	Amerindian		0.38	<0.0001	0.26 to 0.48
	African	AE2	-0.59	<0.0001	-0.67 to -0.50
	European		0.32	<0.0001	0.20 to 0.43
■	Amerindian		0.58	<0.0001	0.48 to 0.66

Correlación entre proporciones de ancestría humana y de *H. pylori*: Las más altas correlaciones (*r*) entre las ancestrías se marcaron, con cuadro azul: Ancestría humana Amerindian con Ancestral East Asia (AEA); con cuadro verde: Ancestría humana african con Ancestral Africa 1 (AA1); con cuadro amarillo: Ancestría humana Amerindian con Ancestral European 1 (AE1) y con cuadro café: Ancestría humana Amerindian con Ancestral European 2 (AE2). (*n* = 233): Incluye ancestros de huéspedes y *H. pylori* para participantes con ambas ancestrías disponibles, tanto en población de montaña como costera de Nariño-Colombia.

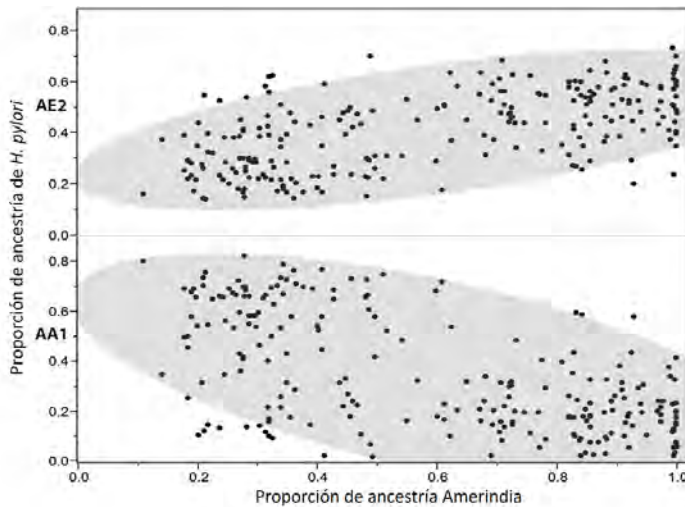


Figura 2. Relación entre la Ancestría de *Helicobacter pylori* y la Ancestría Amerindia humana La proporción de Ancestría Europea de *H. pylori* (AE2) correlaciona positivamente con la proporción de Ancestría Amerindia del huésped. La Ancestría Africana de *H. pylori* (AA1) correlaciona negativamente con la Ancestría Amerindia del huésped. Las elipses de densidad del 90% se delimitan por el área sombreada en cada gráfica. El eje menor más ancho de la elipse inferior indica que AA1 está más disperso que AE2 en los amerindios (*n* = 233).

6.5.3 Ancestría humana asociada a lesiones histopatológicas gástricas

A continuación, evaluamos el efecto de la ancestría humana en la histopatología gástrica, puntuada en una escala continua de mayor gravedad de 2 (gastritis) a 6 (cáncer gástrico), según el modelo en cascada de Correa para la progresión hacia el subtipo intestinal del cáncer gástrico (71, 72). Para este análisis, utilizamos modelos lineales mixtos generalizados con datos de participantes de 40 años de edad o más ($n = 121$). Dentro de este grupo de mayor edad (40-65 años), la edad no se asoció significativamente con la gravedad de la enfermedad ($P = 0,58$). Tanto la ancestría amerindia como europea del huésped se asociaron con lesiones más graves ($\beta = 1,16$, $P = 0,003$; y $\beta = 2,06$, $P = 0,002$, respectivamente, donde β se puede interpretar como el aumento esperado en la puntuación de histopatología a medida que la proporción de ancestría aumenta de 0 a 1). En contraste, la ancestría africana del huésped confería protección ($\beta = -1,11$, $P < 0,001$). El área de residencia también se asoció con la histopatología: la población de montaña mostró lesiones más avanzadas ($P = 0,007$), pero esta asociación dejó de ser significativa cuando se consideró la ancestría genética del huésped, lo que indica que la ancestría del huésped, no tanto la ubicación o altitud, impulsaba la discrepancia en la gravedad de la enfermedad. Consistente con este concepto, la proporción de ancestría amerindia del huésped se asoció con lesiones más graves solo en la población costera ($\beta = 2,49$, $P = 0,017$). La regresión ordinal univariada de las puntuaciones discretas de histopatología proporcionó resultados similares con la gravedad de las lesiones aumentando con la ancestría europea y amerindia del huésped y disminuyendo con la ancestría africana del huésped (valores de P de 0,002, 0,002 y $< 0,001$, respectivamente).

6.5.4 Efecto de la coevolución humano-*Helicobacter pylori* en la severidad de las lesiones gástricas

Ninguno de los cuatro clústeres ancestrales de *H. pylori* se asoció con la histopatología en los análisis univariados de la cohorte completa. Sin embargo, en un análisis de la cohorte de montaña, los clústeres AA1 y AE2 mostraron efectos altamente significativos, pero opuestos: AA1 se asoció con resultados histopatológicos de severidad en las lesiones gástricas y AE2 se asoció con bajas puntuaciones histológicas de alteraciones gástricas ($\beta = 3,38$, $P = 0,002$ y $\beta = -3,42$, $P = 0,012$, respectivamente). La regresión ordinal de las puntuaciones discretas de histopatología confirmó estos resultados (valores de P correspondientes de 0,009 y 0,023 para AA1 y AE2, respectivamente). Debido a que la población de montaña tenía un mínimo de ancestría africana del huésped, nos preguntamos si AA1 aumentaba la gravedad de las lesiones gástricas en todos los sujetos con baja ancestría africana del huésped, independientemente del área de residencia. Este escenario podría significar una coadaptación interrumpida: disrupción de la coevolución humano-*H. pylori*. Cuando consideramos a las 56 personas con menos del 17,6% de ancestría africana (el decil más bajo de ancestría africana del huésped en la Costa), encontramos que todas las personas que portaban *H. pylori* con $>19,8\%$ de ancestría AA1 ($n = 20$) tenían lesiones más severas que solo la gastritis, independientemente de la ubicación ($P < 0,001$; Figura 3).

Dado que AA1 fue predictivo de enfermedad más grave en los sujetos con baja ancestría africana, probamos si había una interacción entre la ancestría humana y la

ancestría de *H. pylori* que afectara la histopatología. Utilizando un modelo lineal mixto multivariado generalizado, encontramos una interacción significativa entre la ancestría amerindia del huésped y la ancestría AA1 de *H. pylori* ($\beta = 5,08$, $P = 0,010$).

La falta de efecto de AA1 en el modelo univariado de toda la cohorte fue un artefacto de sus efectos opuestos en personas con ancestría africana vs. ancestría amerindia. Con el término de interacción incluido en el modelo, la ancestría amerindia humana y el área de residencia ya no fueron factores significativos de forma independiente ($P = 0,62$ y $P = 0,89$, respectivamente). Se evaluaron las cepas de *H. pylori* en busca de la presencia o ausencia del gen asociado a citotoxina A (*cagA*), que codifica un factor de virulencia secretado con actividades similares a oncoproteínas (Tabla S1) (73, 74). La presencia de *cagA* fue un predictor significativo de la patología gástrica premaligna independiente de todas las demás variables en el modelo ($\beta = 0,98$; $P = 0,001$), pero la interacción entre la ancestría humana y la ancestría de *H. pylori* que afectaba la histopatología no se vio afectada por la presencia o ausencia de *cagA*.

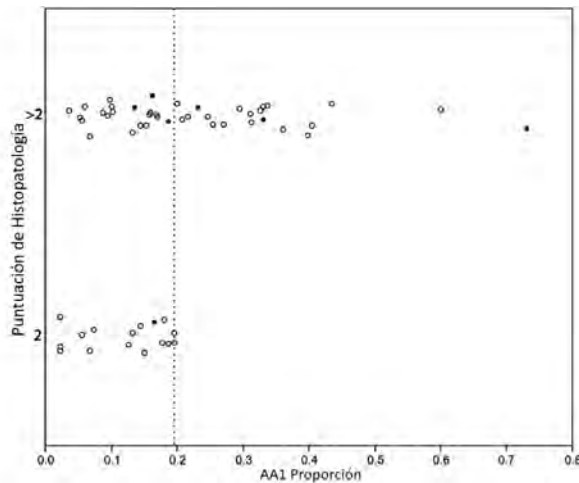


Figura 3. Todos los sujetos con proporciones bajas de ancestría africana del huésped (<17,6%, el decil más bajo en la Costa) y que portaban una cepa de *H. pylori* con >19,8% de ancestría AA1 (línea punteada). Presentaron lesiones gástricas avanzadas (puntuaciones histopatológicas >2), sin importar el lugar de residencia, lo que indica la importancia de la interacción entre la ancestría amerindia del huésped y la ancestría africana AA1 de *H. pylori*. Los círculos cerrados representan a los residentes de la Costa: Tumaco; los círculos abiertos representan a los residentes de la montaña: Túquerres ($n = 56$).

6.5.5 Mezcla de genomas humanos y de *Helicobacter pylori* postcolonización de las Américas

Tanto los genomas de *H. pylori* como los humanos presentaron altos niveles de mezcla de ancestría, pero las proporciones ancestrales difirieron significativamente según la región. La población de montaña tenía solo una pequeña cantidad de ancestría africana para el huésped (~3%), pero una considerable proporción de ancestría AA1 de *H. pylori* (~20%). La mayor proporción de ancestría de *H. pylori* en las montañas era europea. Algunas proporciones de las ancestría AA1 en las montañas puede haberse originado a partir de cepas que alguna vez portaron esclavos de origen africano occidental. Sin

embargo, dados los componentes europeos (AE1 y AE2) en las cepas de montaña, es probable que la mayoría del AA1 se derivase de cepas adquiridas de los españoles después de su conquista de las Américas en el siglo XV. Falush *et al.* documentó una media de ~17% de AA1 en 37 cepas españolas (47).

En América Latina, algunas cepas de poblaciones indígenas aisladas son exclusivamente amerindias, con afinidades a subtipos de *H. pylori* de Asia oriental (75, 76). Sin embargo, en comunidades mestizas, donde las poblaciones amerindias se han mezclado con las poblaciones europeas introducidas, hay evidencia de que las cepas amerindias han sido reemplazadas por cepas europeas con una ventaja competitiva, lo que representa una excepción al patrón de transmisión vertical/familiar (77, 78). Nuestros resultados son consistentes con un remplazo general de *H. pylori* amerindios por cepas ancestrales europeas (como se muestra por la baja presencia de AEA y la alta presencia de AE2) y correlaciones significativas entre AE2 y la ancestría amerindia del huésped. En contraste, mostramos en la población costera una alta correlación entre la ancestría africana del huésped y AA1, lo que es consistente con la transmisión vertical/familiar.

6.5.6 Disrupción de la coevolución humano-*Helicobacter pylori*

Dado que nuestro enfoque actual utilizó muestras emparejadas y examinó la mezcla de ancestría, pudimos evaluar cómo la coevolución podría haber afectado la enfermedad gástrica. Antes, caracterizamos la ancestría de las cepas de *H. pylori* en estas comunidades utilizando la reconstrucción filogenética sin el análisis de mezcla (56). Sin embargo, pasar por alto la mezcla en los aislamientos de *H. pylori* representa una simplificación excesiva, al igual que designar a los residentes humanos de estas comunidades mezcladas como únicamente africanos o únicamente amerindios. La tipificación convencional de cepas hubiera pasado por alto la ancestría AA1 en *H. pylori* de las montañas que, en nuestros análisis, fue una evidencia crítica para detectar una interacción. Notablemente, el efecto de la interacción entre la ancestría amerindia del huésped y AA1 fue aproximadamente cinco veces mayor que el efecto de *cagA* ($\beta = 5.08$ frente a 0.98). Incluimos el estado de *cagA* en nuestro análisis, ya que es un factor de virulencia conocido de *H. pylori* asociado con un mayor riesgo de gastritis atrófica y lesiones premalignas y malignas de cáncer gástrico (73, 74, 79); previamente, se ha demostrado que *cagA* difiere en prevalencia en los dos lugares, con una mayor prevalencia en las montañas (46). Pudimos replicar esta diferencia y también demostrar que *cagA* por sí solo no podía explicar la diferencia en el riesgo de lesiones premalignas entre las poblaciones, mientras que la interacción entre la ancestría del huésped y la ancestría de *H. pylori* explicaba estas diferencias, ya sea que *cagA* se incluyera o no en el modelo. Sin embargo, la presencia del gen *cagA* no necesariamente proporciona información sobre la funcionalidad de CagA, que depende de muchos factores que no se evaluaron en este estudio (80, 81). En contraste con *cagA*, que fue un factor de riesgo para la histopatología premaligna independiente de todas las demás variables, la ubicación geográfica y la ancestría humana no predijeron de forma independiente el resultado de la enfermedad en un modelo lineal mixto multivariado generalizado con la interacción incluida.

6.5.7 Conclusiones capítulo 6. Biomarcadores evolutivos de cáncer gástrico

Tanto el componente genómico humano como el de *H. pylori* influyen en la susceptibilidad y patogenicidad, pero dependen en gran medida del contexto. El efecto de la ancestría humana en la histopatología depende de la ancestría de la cepa de *H. pylori* infectante, y viceversa.

Nuestros datos cumplen con las condiciones básicas para respaldar un modelo de coevolución (82) en el cual un resultado fenotípico debe ser el resultado de una interacción genotipo-por-genotipo entre especies, con los genotipos reflejando cambios adaptativos en lugar de procesos aleatorios o deriva genética.

Se sabe que la variación de *H. pylori* refleja los patrones de migración humana (47-49, 83), pero esta asociación por sí sola no demuestra la coevolución.

Las interacciones entre los grupos ancestrales humano y *H. pylori* pueden confundir los efectos de cada uno en la predicción de las puntuaciones de histopatología; este resultado es evidencia no solo de una evolución paralela, sino también de una relación funcional entre los dos genomas.

El área de residencia se puede descartar como factor cuando se incluye la ancestría genética en el modelo; es probable que las variables clave que influyen en el riesgo de enfermedad sean los patrones genómicos de variación tanto en el huésped como en el patógeno, interactuando para predecir el fenotipo clínico.

La mezcla de *H. pylori*, especialmente en el contexto de la ancestría humana, puede tener implicaciones clínicas significativas, como se ha anticipado en estudios anteriores de Falush *et al.* (47). Por ejemplo, según nuestros datos actuales, un paciente en el percentil 95 de ancestría amerindia (82,6%) tiene un perfil de riesgo muy diferente según el porcentaje de AA1 en la cepa de *H. pylori* infectante; un 73,1% de AA1 (percentil 95) predice una puntuación de histopatología de 4,8 [intervalo de confianza del 95% (IC), 3,5-6,1], mientras que un 5,6% de AA1 (percentil quinto) predice una puntuación de histopatología de 3,1 (IC 95% 2,6-3,6). En contraste, un paciente en el percentil quinto de ancestría amerindia (10,5%) albergando *H. pylori* con un 73,1% de AA1 presentará una puntuación de histopatología de solo 2,4 (IC 95% 2,0-2,8), según nuestro modelo.

Estos resultados pueden ser relevantes para el “enigma africano”, es decir, la relativamente baja incidencia de cáncer gástrico en África a pesar de la alta prevalencia de infección por *H. pylori* (27, 46, 84).

La variación genómica del huésped y del patógeno es más predictiva de la histopatología cuando se analizan juntas que cuando se analizan por separado, y se puede utilizar como biomarcador informativo para canalizar los esfuerzos de prevención para erradicar *H. pylori* en aquellos con mayor riesgo.

En resumen, las relaciones coevolutivas son determinantes importantes de la enfermedad gástrica, y la interrupción de estas relaciones y los resultados adversos para la salud pueden reflejar un legado continuo de la colonización europea.

6.6 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 6

1. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983 Jun 4;1:1273-5. doi: 10.1016/S0140-6736(83)92719-8
2. Egan BJ, O'Morain CA. A historical perspective of *Helicobacter* gastroenteritis and its complications. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol*. 2007;21:335-46. doi: 10.1016/j.bpg.2006.12.002
3. Peek RM, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nature Reviews Cancer*. 2002 Jan;2(1):28-37. doi: 10.1038/nrc703
4. Crowe SE. *Helicobacter pylori* Infection. *N Engl J Med*. 2019 Mar 21;380(12):1158-65. doi: 10.1056/NEJMcp1710945.
5. Alexander SM, Retnakumar RJ, Chouhan D, Devi T, Dharmaseelan S, Devadas K, et al. *Helicobacter pylori* in Human Stomach: The Inconsistencies in Clinical Outcomes and the Probable Causes. *Front. Microbiol*. 2021 Aug 17;12:713955. doi: 10.3389/fmicb.2021.713955.
6. Blaser M. Stop the killing of beneficial bacteria. *Nature*, 2011 Aug 24;476(7361):393-4. doi: 10.1038/476393a.
7. Li J, Perez-Perez GI. *Helicobacter pylori* the latent human pathogen or an ancestral commensal organism. *Front Microbiol*. 2018 Apr 3;9:609. doi: 10.3389/fmicb.2018.00609.
8. Reshetnyak VI, Burmistrov AI, Maev IV. *Helicobacter pylori*: Commensal, symbiont or pathogen?. *World J Gastroenterol*. 2021 Feb 21;27(7):545-60. doi: 10.3748/wjg.v27.i7.545.
9. Maixner F, Krause-Kyora B, Turaev D, Herbig A, Hoopmann MR, Hallows JL, et al. The 5300-year-old *Helicobacter pylori* genome of the Iceman. *Science*. 2016 Jan 8;351(6269):162-5. doi: 10.1126/science.aad2545.
10. Maixner F, Thorell K, Granehall L, Linz B, Moodley Y, Rattai T, et al. *Helicobacter pylori* in ancient human remains. *World j Gastroenterol*. 2019 Nov 14;25(42):6289-98. doi: 10.3748/wjg.v25.i42.6289.
11. Moodley Y, Linz B, Bond RP, Nieuwoudt M, Soodyall H, Schlebusch CM, et al. Age of the association between *Helicobacter pylori* and man. *PLoS Pathogens*. 2012 May 10; 8(5):e1002693. doi: 10.1371/journal.ppat.1002693.
12. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, et al. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):915-8. doi: 10.1038/nature05562.
13. Muñoz-Ramírez ZY, Pascoe B, Mendez-Tenorio A, Mourkas E, Sandoval-Motta S, Perez-Perez G, et al. A 500-year tale of co-evolution, adaptation, and virulence: *Helicobacter pylori* in the Americas. *The ISME journal*. 2021 Jan;5(1):78-92. doi: 10.1038/s41396-020-00758-0.
14. Park JY, Forman D, Waskito LA, Yamaoka Y, Crabtree JE. Epidemiology of *Helicobacter pylori* and CagA-Positive Infections and Global Variations in Gastric Cancer. *Toxins*. 2018 Apr 19;10(4):163. doi: 10.3390/toxins10040163.

15. de Sablet T, Piazuolo MB, Shaffer CL, Schneider BG, Asim M, Chaturvedi R, et al. Phylogeographic origin of *Helicobacter pylori* is a determinant of gastric cancer risk. *Gut*. 2011; 60(9):1189–95. doi: 10.1136/gut.2010.234468.
16. Correa P. Gastric cancer: Overview. *Colomb Med*. 2013 Jan;44(2):211-7. doi: 10.1016/j.gtc.2013.01.002.
17. Correa P, Piazuolo B. Gastric cancer: the colombian enigma. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2010 Dec 10;25(4):334-7. Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/rcg/v25n4/en_v25n4a01.pdf
18. Bedoya-Urresta Á, Yépez Y, Calvache D, Cifuentes Y, Lucero N, González P, et al. Proyecto Urkunina 5000 Investigación de la prevalencia de lesiones precursoras y del efecto de la erradicación de *Helicobacter pylori* como prevención primaria del cáncer gástrico en el departamento de Nariño. *Revista Colombiana de Cirugía*. 2018 Jun 28; 33(4):345-52. doi: 10.30944/20117582.81.
19. Pazos AJ, Guzman K. Microevolution *Helicobacter pylori* alpA gene in Colombian population. *Gastroenterology*. 2021 May 22;160(6):S-464. doi: 10.1016/S0016-5085(21)01817-5.
20. Correa P, Piazuolo MB. Evolutionary History of the *Helicobacter pylori* Genome: Implications for Gastric Carcinogenesis. *Gut liver*. 2012 Jan 12;6(1):21-8. doi: 10.5009/gnl.2012.6.1.21.
21. Gutiérrez-Escobar AJ, Trujillo E, Orlando E, Acevedo O, Bravo MM. Phylogenomics of Colombian *Helicobacter pylori* isolates. *Gut Pathog*. 2017 Sep 11;9:52. doi: 10.1186/s13099-017-0201-1.
22. Guzman K, Montenegro L, Pazos A. The *Helicobacter pylori* genome evolution in different gastric cancer risk Colombian populations. *J Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021 Nov 11;5(3):1-10 <https://www.imedpub.com/articles/the-helicobacter-pylori-genome-evolution-in-different-gastric-cancer-risk-colombian-populations.pdf>
23. Guzman K, Pazos AJ. Coevolutionary analysis of *Helicobacter pylori* isolated from Colombian patients. *Gastroenterology*. 2020 May;158(6):S-569. doi: 10.1016/S0016-5085(20)32128-4
24. Kodaman N, Pazos A, Schneider BG, Piazuolo MB, Mera R, Sobota RS, et al. Human and *Helicobacter pylori* coevolution shapes the risk of gastric disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014 Jan 28;111(4):1455–60. doi: 10.1073/pnas.1318093111
25. Peek RM, Jr, Blaser M. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jan 2;(1):28–37. doi: 10.1038/nrc703
26. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May 71;(3):209-49. doi: 10.3322/caac.21660
27. Holcombe C. *Helicobacter pylori*: The African enigma. *Gut*. 1992 Apr 33;(4):429–31. doi: 10.1136/gut.33.4.429
28. Chiba T, Seno H, Marusawa H, Wakatsuki Y, Okazaki K. Host factors are important in determining clinical outcomes of *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol*. 2006 Jan;41(1):1-9. doi: 10.1007/s00535-005-1743-4
29. Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2004 Sep 3;9(Suppl1):1-6. doi: 10.1111/j.1083-

- 4389.2004.00248.x
30. Ghoshal UC, Chaturvedi R, Correa P. The enigma of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Indian J Gastroenterol*. 2010 Jun 29;29(3):95-100. doi: 10.1007/s12664-010-0024-1
 31. Moodley Y, Linz B, Bond RP, Nieuwoudt M, Soodyall H, Schlebusch CM, et al. Age of the association between *Helicobacter pylori* and man. *PLoS Pathog*. 2012 May 10;8(5): e1002693. doi: 10.1371/journal.ppat.1002693
 32. Bull JJ, Molineux IJ, Rice WR. Selection of benevolence in a host-parasite system. *Evolution*. 1991 Jun;45(4):875-82. doi: 10.1111/j.1558-5646.1991.tb04356.x
 33. Agnew P, Koella JC. Virulence, parasite mode of transmission, and host fluctuating asymmetry. *Proc Biol Sci*. 1997 Jan 22;264(1378):9-15. doi: 10.1098/rspb.1997.0002
 34. Messenger SL, Molineux IJ, Bull JJ. Virulence evolution in a virus obeys a tradeoff. *Proc Biol Sci*. 1999 Feb 22;266(1417):397-404. doi: 10.1098/rspb.1999.0651
 35. Blaser MJ, Chen Y, Reibman J. Does *Helicobacter pylori* protect against asthma and allergy?. *Gut*. 2008 May;57(5):561-7. doi: 10.1136/gut.2007.133462
 36. Carroll IM, Khan AA, Ahmed N. Revisiting the pestilence of *Helicobacter pylori*: Insights into geographical genomics and pathogen evolution. *Infect Genet Evol*. 2004 Jun;4(2):81-90. doi: 10.1016/j.meegid.2004.01.006
 37. Ferrández A, Benito R, Arenas J, María García A, Sopeña F, et al. CagA-positive strains of *Helicobacter pylori* may protect against Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol*. 2000 Sep;95(9):2206-11. doi: 10.1111/j.1572-0241.2000.02305.x
 38. Schwarz S, Morelli G, Kusecek B, Manica A, Balloux F, et al. Horizontal versus familial transmission of *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog*. 2008 Oct 24;4(10): e1000180. doi: 10.1371/journal.ppat.1000180
 39. Ghose C, Perez-Perez GI, van Doorn LJ, Domínguez-Bello MG, Blaser MJ. High frequency of gastric colonization with multiple *Helicobacter pylori* strains in Venezuelan subjects. *J Clin Microbiol*. 2005 Jun;43(6):2635-41. doi: 10.1128/JCM.43.6.2635-2641.2005
 40. Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Achtman M, et al. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Oct 13;95(21):12619-24. doi: 10.1073/pnas.95.21.12619
 41. Galvani A. Epidemiology meets evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol*. 2003 Mar;18(3):132-9. doi: 10.1016/S0169-5347(02)00050-2
 42. Herre EA. Population structure and the evolution of virulence in nematode parasites of fig wasps. *Science*. 1993 Mar 5;259(5100):1442-5. doi: 10.1126/science.259.5100.1442
 43. Stewart AD, Logsdon JM, Jr., Kelley. An empirical study of the evolution of virulence under both horizontal and vertical transmission. *Evolution*. 2005 Apr;59(4):730-9. doi: 10.1111/j.0014-3820.2005.tb01749.x
 44. Torres J, Correa P, Ferreccio C, Hernandez G, Herrero R, Morgan RD, et al. Gastric cancer incidence and mortality is associated with altitude in the mountainous regions of Pacific Latin America. *Cancer Causes Control*, 2013 Feb;24(2):249-56. doi: 10.1007/s10552-012-0114-8
 45. Correa P, Piazuelo B, Epplein M. Gastric cancer in Colombia. III. Natural history of precursor lesions. *J Natl Cancer Inst*. 1976 Nov;57(5):1027-35. doi: 10.1093/jnci/57.5.1027

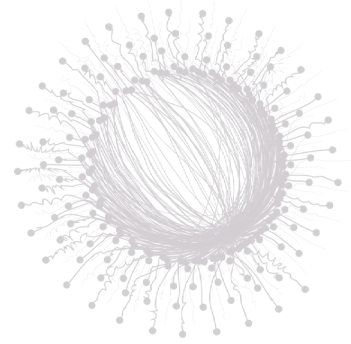
46. Bravo LE, van Doorn LJ, Realpe JL, Correa P. Virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori*: Do they explain the African enigma?. *Am J Gastroenterol*. 2002 Nov;97(11):2839-42. doi: 10.1111/j.1572-0241.2002.07031.x
47. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Yamaoka Y, et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*. 2003 Mar 7;299(5612):1582-5. doi: 10.1126/science.1080857
48. Moodley Y, Linz B, Yamaoka Y, Windsor HM, Breurec S, Achtman M, et al. The peopling of the Pacific from a bacterial perspective. *Science*. 2009 Jan 23;323(5913):527-30. doi: 10.1126/science.1166083
49. Wirth T, Xiaoyan W, Wang X, Linz B, Achtman M. Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: Lessons from Ladakh. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004 Apr 6;101(14):4746-51. doi: 10.1073/pnas.0306629101
50. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol*. 1996 Sep;20(10):1161-81. doi: 10.1155/2001/367832
51. Rugge M, Correa P, Dixon M, Hattori T, Leandro G, Lewin K, et al. Gastric dysplasia: The Padova international classification. *Am J Surg Pathol*. 2000 Feb;24(2):167-76. doi: 10.1097/0000478-200002000-00001
52. Ohata H, Kitauchi S, Yoshimura N, Mugitani K, Iwane M, Ichinose M, et al. Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. *Int J Cancer*. 2004 Mar;109(1):138-43. doi: 10.1002/ijc.11680
53. Filipe M, Muñoz N, Matko I, Kato I, Pompe V, Prijon T, et al. Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: A cohort study in Slovenia. *Int J Cancer*. 1994 May 1;57(3):324-9. doi: 10.1002/ijc.2910570306
54. González C, Pardo M, Ruiz J, Alonso P, Bonet C, Garcia R, et al. Gastric cancer occurrence in preneoplastic lesions: A longterm follow-up in a high-risk area in Spain. *Int J Cancer*. 2010 Dec 1;127(11):2654-60. doi: 10.1002/ijc.25273
55. Mera R, Fontham E, Bravo L, Bravo J, Piazuelo M, Correa P, et al. Long term follow up of patients treated for *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 2005 Nov;54(11):1536-40. doi: 10.1136/gut.2005.072009
56. de Sablet T, Piazuelo M, Shaffer C, Schneider B, Asim M, Correa P, et al. Phylogeographic origin of *Helicobacter pylori* is a determinant of gastric cancer risk. *Gut*. 2011 Sep;60(9):1189-95. doi: 10.1136/gut.2010.234468
57. Sicinschi L, Correa P, Bravo L, Peek R, Wilson K, Schneider B, et al. Non-invasive genotyping of *Helicobacter pylori* *cagA*, *vacA*, and *hopQ* from asymptomatic children. *Helicobacter*. 2012 Apr;17(2):96-106. doi: 10.1111/j.1523-5378.2011.00919.x
58. Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 2003 Aug;164(4):1567-87. doi: 10.1093/genetics/164.4.1567
59. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000 Jun;155(2):945-59. doi: 10.1093/genetics/155.2.945
60. Rosenberg NA. DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes*. 2004 Mar;4:137-8. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x

61. Cortes A, Brown MA. Promise and pitfalls of the Immuchip. *Arthritis Res Ther*. 2011 Feb 1;13(1):101. doi: 10.1186/ar3204
62. Purcell S, Neale B, Brown K, Thomas L, Ferreira M, Sham P, et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 2007 Sep;81(3):559-75. doi: 10.1086/519795
63. Wang S, Lewis Jr. C, Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Ruiz A, et al. Genetic variation and population structure in native Americans. *PLoS Genet*. 2007 Nov;3(11): e185. doi: 10.1371/journal.pgen.0030185
64. Wang S, Ray N, Rojas W, Parra M, Bedoya B, Ruiz-Linares A, et al. Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet*. 2008 Mar 21;4(3):e1000037. doi: 10.1371/journal.pgen.1000037
65. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005 Oct;437(7063):1299-1320. doi: 10.1038/nature04226
66. Altshuler D, Durbin R, Abecasis G, Bentley D, Chakravarti A, Wilson R and 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012 Nov1;491(7422):56-65. doi: 10.1038/nature11632
67. Rosenberg NA. Standardized subsets of the HGDP-CEPH Human Genome Diversity Cell Line Panel, accounting for atypical and duplicated samples and pairs of close relatives. *Ann Hum Genet*. 2006 Nov;70(Pt 6):841-7. doi: 10.1111/j.1469-1809.2006.00285.x
68. Cavalli-Sforza LL. The Human Genome Diversity Project: Past, present and future. *Nat Rev Genet*. 2005 Apr;6(4):333-40. doi: 10.1038/nrg1596
69. Jakobsson M, Rosenberg NA. CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. 2007 Jul 15;23(14):1801-6. doi: 10.1093/bioinformatics/btm233
70. Zheng X, Levine D, Shen J, Gogarten S, Laurie C, Weir B, et al. A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. *Bioinformatics*. 2012 Dec 15;28(24):3326-8. doi: 10.1093/bioinformatics/bts606
71. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res*. 1988 Jul 1;48(13):3554-60. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1458460/>
72. Correa P. Human Gastric Carcinogenesis: A multistep and multifactorial process—First American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res*. 1992 Dec 15;52(24):6735-40. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1458460/>
73. Tummuru MKR, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high molecular mass major antigen of *Helicobacter pylori*: Evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun*. 1993 May;61(5):1799–1809. doi: 10.1128/iai.61.5.1799-1809.1993
74. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Jun 15;90(12):5791-5. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5791>
75. Camorlinga M, Perez G, Gonzalez G, Mendoza I, Peñaloza R, Ramos I, et al. *Helicobacter pylori* genotyping from American indigenous groups shows novel Amerindian *vacA* and *cagA* alleles and Asian, African and European admixture. *PLoS*

- ONE. 2011 Jun 15;6(11): e27212. doi: 10.1073%2Fpnas.90.12.5791
76. Kersulyte D, Kalia A, Gilman R, Mendez M, Herrera P, Cabrera L, et al. Helicobacter pylori from Peruvian amerindians: Traces of human migrations in strains from remote Amazon, and genome sequence of an Amerind strain. PLoS ONE. 2010 Nov 29;5(11): e15076. doi: 10.1371/journal.pone.0015076
77. Kersulyte D, Mukhopadhyay A, Velapatiño B, Su W, Pan Z, Berg D, et al. Differences in genotypes of Helicobacter pylori from different human populations. J Bacteriol. 2000 Jun;182(11):3210-3218. doi: 10.1128/jb.182.11.3210-3218.2000
78. Domínguez M, Pérez M, Bortolini M, Salzano F, Pericchi L, Zambrano O, Linz B. Amerindian Helicobacter pylori strains go extinct, as european strains expand their host range. PLoS ONE. 2008 Oct 2;3(10): e3307. doi: 10.1371/journal.pone.0003307
79. Noto JM, Peek RM, Jr. The Helicobacter pylori cag pathogenicity Island. Methods Mol Biol. 2012 Jan;921:41-50. doi: 10.1007/978-1-62703-005-2_7
80. Olbermann P, Josenhans C, Moodley Y, Uhr M, Stamer C, Vauterin M, et al. (2010) A global overview of the genetic and functional diversity in the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. PLoS Genet. 2010 Aug 19;6(8):e1001069. doi: 10.1371/journal.pgen.1001069
81. Hatakeyama M. Anthropological and clinical implications for the structural diversity of the Helicobacter pylori CagA oncoprotein. Cancer Sci. 2011 Jan;102(1):36-43. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01743.x
82. Woolhouse ME, Webster JP, Domingo E, Charlesworth B, Levin BR. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. Nat Genet. 2002 Dec;32(4):569-77. doi: 10.1038/ng1202-569
83. Latifi S, Ghorashi S, Siavoshi F, Linz B, Massarrat S, Falush D, et al. Ethnic and geographic differentiation of Helicobacter pylori within Iran. PLoS ONE. 2010 Mar 22;5(3): e9645. doi: 10.1371/journal.pone.0009645
84. Campbell D, Warren B, Thomas J, Figura N, Telford J, Sullivan P. The African enigma: Low prevalence of gastric atrophy, high prevalence of chronic inflammation in West African adults and children. Helicobacter. 2001 Dec;6(4):263-7. doi: 10.1046/j.1083-4389.2001.00047.x

CAPÍTULO 7.

Disbiosis de la microbiota gástrica



INTRODUCCIÓN

Un nuevo enfoque en la caracterización de la carcinogénesis gástrica se aborda en este Capítulo, con el objetivo de comprender el mecanismo de patogénesis subyacente del estudio de la microbiota gástrica. De acuerdo con la Ley del mínimo de Liebig y la Ley de Tolerancia de Shelford, los descubrimientos recientes indican que la infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) se asocia estrechamente con el cambio de diversidad de la comunidad microbiana gástrica (disbiosis), y juega un papel importante en la progresión de las lesiones precursoras del cáncer gástrico. Se discute la idea de que el cáncer gástrico surge de la ruptura de la relación de equilibrio dentro del ecosistema gástrico por la infección por *H. pylori*, junto con los principales cambios fisiopatológicos en la cascada precancerosa de Correa. Comprender el origen del cáncer gástrico desde el punto de vista del sistema ecológico y conocer las características biológicas que regulan el equilibrio de la microbiota gástrica traerá perspectivas sobre el desarrollo de una nueva estrategia para mejorar la patogénesis de la enfermedad.

Con más de 720000 muertes por año, el cáncer gástrico es la tercera causa más común de muerte relacionada con el cáncer en el mundo (1). Desde una publicación de Warren y Marshall en el año 1983 (2), se identificó a la infección por *H. pylori* como el principal factor de riesgo etiológico de enfermedad gástrica, y la Organización Mundial de la Salud la clasifica como carcinógeno tipo 1 (1). Se estima que el 50 % de la población mundial se ha infectado, pero la gran mayoría de las personas no muestra síntomas (asintomáticos) y solo entre el 1 y el 3 % de las personas desarrollan cáncer gástrico. Por lo tanto, también se ha designado a la bacteria como patobionte, véase Glosario (Tabla 1). A pesar de su estrecha asociación con el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas, la infección por *H. pylori* puede permanecer como benigna y no se percibe a lo largo de la vida del huésped (3, 4). Si bien la terapia de erradicación de *H. pylori* en individuos sintomáticos es la estrategia convencional para prevenir el desarrollo de úlceras y cáncer gástrico (1, 5), de forma controvertida, la infección por *H. pylori* también se ha asociado negativamente con el desarrollo de enfermedades como la obesidad, el asma, el reflujo gastroesofágico (ERGE) y el cáncer de esófago; y positivamente con la enfermedad de Alzheimer, enfermedades dermatológicas, etc. (6, 7). Además, existen alertas evidentes sobre el aumento del fracaso del tratamiento con antibióticos debido a la farmacoresistencia adquirida de

la bacteria, así como la aparición de efectos secundarios (5–9). Entonces, la estrategia actual que apunta al manejo de *H. pylori* y la prevención de sus enfermedades causales resulta paradójica. En este contexto, surgen las siguientes preguntas de investigación: ¿Bajo qué circunstancias *H. pylori* se comporta como patógeno o infección benigna? ¿Cuáles son las condiciones gástricas específicas que llevan a que *H. pylori* no se percibiera a lo largo de la vida en la mayoría de los huéspedes humanos? Si la erradicación de *H. pylori* aumenta el riesgo de desarrollar otras enfermedades, ¿sería mejor y posible desarrollar un mecanismo o estrategia para controlar la bacteria? ¿Es *H. pylori* un factor de riesgo importante para enfermedades extragástricas? Como *H. pylori* coexiste dentro de una comunidad microbiana en el estómago, en esta revisión y perspectiva, el objetivo principal es comprender la carcinogénesis gástrica iniciada por *H. pylori* desde una perspectiva ecológica. Se destaca el origen del cáncer gástrico en relación con la infección por *H. pylori* que afecta el ecosistema estomacal desde un punto de vista basado en la ecología de poblaciones. En individuos asintomáticos, existe un equilibrio entre *H. pylori* y el ecosistema gástrico. La alteración del equilibrio (disbiosis de la microbiota) en el estómago puede ser el evento clave que desencadene la virulencia de la bacteria, lo que da lugar al desarrollo de lesiones precursoras, hasta el cáncer gástrico. Se proponen las condiciones que permiten definir la forma de interacción biológica entre *H. pylori* y el humano en estado asintomático y discutido si estas condiciones puedan considerarse para aplicarse en el desarrollo de estrategias en medicina preventiva.

Tabla 1. Glosario de términos

Bacteria: Microorganismos procariotes (termino plural).

Bacterium: Microorganismo procariote. En este libro, el concepto se refiere a la especie de *H. pylori* (singular)

Comunidad biológica: Un grupo de varias especies que interactúa en un espacio común.

Biotope: El espacio natural que proporciona las condiciones adecuadas para la comunidad biológica en un ecosistema.

Capacidad de carga (K): límite máximo al que puede extenderse una población dentro de su hábitat sin verse alterada.

Factores limitantes densos dependientes: factores que influyen en el tamaño de una población de forma positiva o negativa.

Factores limitantes independientes de la densidad: factores ambientales que afectan a todas las poblaciones por igual, independientemente de su tamaño.

Disbiosis: Desequilibrio en la composición y estructura de la comunidad microbiana de un organismo con repercusiones negativas para la salud.

Hábitat: En un ecosistema, espacio natural que reúne las condiciones adecuadas para la vida de una determinada especie.

Hipoclorhidria: estado clínico en el que la producción de ácido gástrico del estómago está ausente o es baja.

Factor limitante: Un factor único que limita el crecimiento, la abundancia y la distribución de una población en un ecosistema.

Patobionte: organismo que, en determinadas circunstancias, puede ser inofensivo o patógeno para el huésped.

Plasticidad fenotípica: capacidad de un organismo para ajustar sus características observables (su fenotipo) en función de la presión ambiental.

Resiliencia (✳): capacidad de un ecosistema para recuperarse de una perturbación.

7.1 PERSPECTIVA ECOLÓGICA SOBRE LA CARCINOGENÉISIS GÁSTRICA

La microbiota gástrica comprende una comunidad especial de microorganismos que interactúan entre sí y se adaptan a las condiciones fisiológicas ácidas del biotopo gástrico, lo que forma un ecosistema. El ecosistema gástrico, como cualquier otro, tiene límites específicos, conocidos como factores limitantes, que pueden ser denso-independientes, cuando afectan a todas las especies por igual y restringen la aparición de nuevas especies microbianas (por ejemplo, el pH). Los factores limitantes también pueden ser denso-dependientes cuando regulan el crecimiento de cada población que compone la microbiota (10). A nivel ecológico, estos conceptos describen que existen limitaciones ambientales para todas las especies. Por ejemplo, para cada especie y su hábitat definido existe un tamaño máximo de población que el sistema puede acomodar sin alterar o modificar las especies vivas. Esta propiedad se denomina capacidad de carga (K) y se establece que las poblaciones más grandes que K no son sostenibles y degradarán su hábitat (11, 12). En condiciones normales de individuos asintomáticos y sin infección por *H. pylori*, se considera “ideal” una microbiota gástrica en que las poblaciones microbianas mantienen la estructura de la comunidad y tienen K en equilibrio en el medio gástrico. Esto da como resultado tasas de natalidad y mortalidad iguales, y la abundancia general de bacterias no cambia drásticamente en el tiempo. En este estado, el biotopo gástrico, junto con la microbiota, constituye un ecosistema “armonioso” y balanceado. El inicio del cáncer gástrico se asocia a una alteración en el ambiente del estómago que provoca un cambio en un **factor limitante X denso-dependiente** para *H. pylori* (*), lo que activa el crecimiento de esta población y genera un imbalance y desequilibrio en el ecosistema gástrico (Tabla 2, Fig 1). Esta idea se basa en la Ley del mínimo de Liebig, en la que el crecimiento se controla no solo por la cantidad total de recursos disponibles, sino por el recurso más escaso (13–15) (Fig. 1). El aumento de la abundancia de *H. pylori* puede exceder la capacidad de carga K establecida en la relación de equilibrio inicial, lo que afecta consecuentemente al ecosistema gástrico y otros cofactores de resistencia (p. ej., respuesta inmunitaria) y resiliencia. Estos pueden exacerbar la progresión de la infección y la lesión en el tiempo, para causar gastritis crónica activa (16-18).

Tabla 2. Puntos claves Figura 1

- El estado asintomático humano de *H. pylori* se define por la proporción de la duela más corta (A).
- La alteración de la duela más corta permite el crecimiento de *H. pylori*. A medida que se llena el barril, se desencadena una gastritis sintomática.
- El tiempo de llenado del barril es particular de cada individuo; otros factores también pueden participar para modular este evento.
- El inicio de las lesiones precursoras de cáncer gástrico parte con la saturación de la barrica hasta distorsionar el conjunto de duelas, lo que cambia las características del medio gástrico.
- La proporción de la duela más corta que mantiene la relación de equilibrio puede ser particular para cada relación ancestral asociada al origen étnico y la cepa de *H. pylori*.

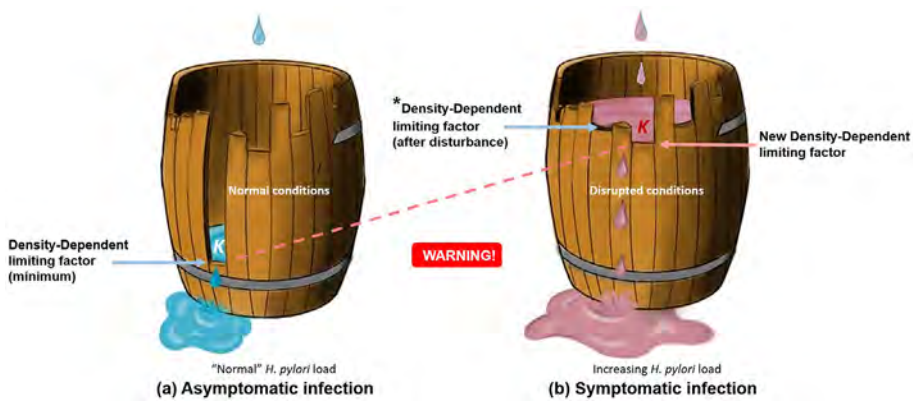


Figura 1. Aplicación de la Ley del mínimo de Liebig para la explicación de la enfermedad gástrica asociada a *Helicobacter pylori*

El barril de Liebig postula que el crecimiento ocurre solo a la tasa permitida por el factor más limitante. Las duelas de la barrica son el conjunto de condiciones que constituyen el hábitat del patobionte en el estómago; mientras que la duela más corta representa el nivel del factor limitante X denso-dependiente*. La gota superior es el elemento o factor mínimo que permite el crecimiento de *H. pylori*. Además, la duela más corta determina la abundancia de *H. pylori* que puede sostener el ambiente gástrico sin que se altere (equilibrio): este es el estado de infección asintomática (a). Cuando por alguna razón se altera el factor limitante X denso-dependiente y la duela más corta se alarga, el crecimiento de *H. pylori* puede superar la carga inicial y su aumento en abundancia rompe el equilibrio; ahora, otra duela se convierte en el nuevo factor limitante denso-dependiente y la disbiosis comienza (b). ¡Advertencia! El barril se está llenando de *H. pylori*. Ante este evento se activan mecanismos de presión que intentan recuperar en cierta medida el equilibrio preestablecido, lo que desencadena la sintomatología de la infección. Como *H. pylori* es un constructor de nichos, en este proceso la bacteria podría modificar otras condiciones; luego, otras duelas se pueden modificar. Se debe aclarar que la resistencia del barril también tiene un límite. Si el barril se rompe, las condiciones cambiarán y difícilmente serán reparables. Las nuevas condiciones no serán adecuadas para *H. pylori*.

En la situación de destrucción de *K*, el microambiente local tiene nuevas limitaciones (X denso-dependiente). En un momento determinado, la población de *H. pylori* puede disminuir. El espacio limitado, la falta de nutrientes, la competencia potencial con

bacterias emergentes que son capaces de proliferar en el microambiente alterado (19), o los mismos cambios irreversibles en el medio ambiente que no están dentro del curva de tolerancia de *H. pylori* podrían ser la causa. Estos pueden promover que la bacteria migrese y colonizara diferentes regiones topográficas del estómago (20, 21).

El evento de migración altera la capacidad de carga del medio gástrico para cada componente de la microbiota, lo que afecta su estructura y composición por el cambio de los factores limitantes, la generación de un nuevo espacio para la aparición de bacterias oportunistas y la configuración de nuevas redes microbianas que restablecerán un equilibrio bajo la condición hipoclorhídrica en el estómago. Este nuevo escenario puede jugar un papel adicional en la progresión de las lesiones precursoras, hasta cáncer gástrico (22-24). En este estado, la fisiología gástrica puede dejar de ser un obstáculo o una limitación para las bacterias externas y su curva de tolerancia puede ajustarse al espacio recién generado (Ley de Tolerancia de Shelford) (15, 25).

Con base en estas descripciones y desde el punto de vista de un modelo ecológico en la etiología del cáncer gástrico asociado a la infección por *H. pylori*, se propone un modelo de disbiosis de la microbiota gástrica durante el proceso de carcinogénesis (Tabla 3, Figura 2).

Tabla 3. Puntos claves Figura 2

- En el estómago, hay un gradiente de pH que varía de ácido en el lumen a neutro en la superficie celular. *H. pylori* se encuentra en la capa de moco gástrico y utiliza el gradiente de pH para su orientación espacial (26, 27).
- Una vez que se rompe el equilibrio (*), el comportamiento de *H. pylori* se altera y activa su crecimiento acelerado. Mediante la producción de ureasa, el patobionte neutraliza la acidez gástrica a través del gradiente, y progresivamente se esparce y genera su propio microambiente. *H. pylori* es un constructor de su propio nicho (28).
- El crecimiento acelerado de *H. pylori* daña progresivamente el medio gástrico hasta la atrofia de las glándulas secretoras de ácido; entonces, se produce hipoclorhidria. Este evento aumenta la susceptibilidad a la infección por *H. pylori* y la colonización de nuevos grupos bacterianos que podrían promover el desarrollo de malignidad (22, 23). Por lo tanto, la acidez gástrica puede clasificarse como un factor biolimitante densamente independiente, ya que opera como un filtro ecológico.
- La acidez gástrica como factor biolimitante denso-independiente no detiene a *H. pylori* (28), y su fluctuación poblacional se asociaría a factores denso-dependientes.
- Como componente de la microbiota, la población de *H. pylori* puede superar la capacidad de carga (*K*) establecida en un equilibrio inicial y, en esa eventualidad, la población no es sostenible y, en consecuencia, degradará el medio gástrico.

7.2 DISBIOSIS DE LA MICROBIOTA GÁSTRICA: UN MODELO DE CARCINOGENESIS GÁSTRICA

El cáncer gástrico se produce por un evento inicial que implica la ruptura del equilibrio entre *H. pylori* y el medio gástrico, lo que desencadena cambios malignos en el biotopo gástrico y disbiosis del estadio (B al F (*), Figura 2)

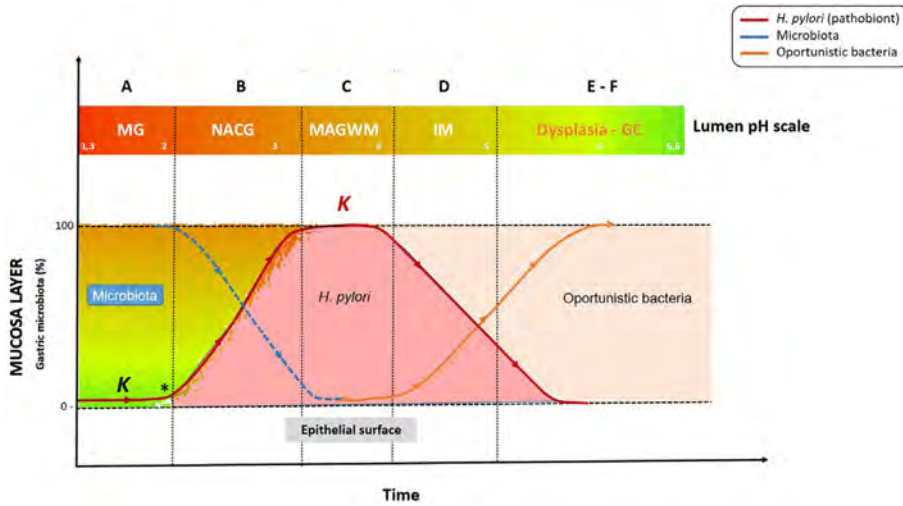


Figura 2. Modelo de disbiosis de la microbiota gástrica asociado a la infección por *Helicobacter pylori* y variaciones de pH (escala colorimétrica) en el proceso de carcinogénesis

Las lesiones se describen según la cascada precancerosa de Correa. Etapa A, Gastritis leve (MG) (asintomática). Etapa B, Gastritis crónica no atrófica (NACG). Etapa C, Gastritis atrófica multifocal sin metaplasia intestinal (MAGWM). Etapa D, Metaplasia intestinal (IM). Etapas E-F, Displasia - Cáncer gástrico (GC). La línea continua representa las fases del crecimiento bacteriano según el caso de *H. pylori*, microbiota y bacterias oportunistas. La línea punteada representa la abundancia relativa de la microbiota y su variación en función de *H. pylori* y el pH gástrico en la progresión de Lesiones precursoras de cáncer gástrico. (*) Representa el punto de alteración de un factor limitante X densodependiente para *H. pylori* que activa su crecimiento y altera el equilibrio inicialmente establecido. El patobionte excede la capacidad de carga *K*, lo que representa la abundancia máxima que el ambiente gástrico puede sostener en la etapa asintomática (A) hasta alcanzar un nuevo límite en la etapa sintomática (C), como en el barril de Liebig.

Etapa A: Individuos infectados por *H. pylori* en un estado asintomático. A pesar de la inflamación leve, las funciones gástricas no se ven afectadas. La relación entre la microbiota, el patobionte y el huésped se mantiene en equilibrio. Existe un gradiente de pH desde el lumen hasta la capa mucosa (2, 27) (gradiente colorimétrico). *H. pylori* utiliza el gradiente de pH para una orientación espacial precisa que le permite evitar la acidez del lumen (2, 26, 28).

Etapa B: Desarrollo de síntomas de gastritis como consecuencia del crecimiento exponencial de *H. pylori* y su influencia negativa sobre la microbiota. Esta etapa se desencadena por un evento X desconocido que genera el desequilibrio en el ambiente del estómago, y se altera el factor limitante desconocido para *H. pylori* (*). Después de que comienza el crecimiento exponencial, la relación de equilibrio se rompe.

Estadio C: Se pasa a un estado patológico en el que el tamaño poblacional de *H. pylori* alcanza un límite ambiental (*K*) en el foco de infección y la microbiota se minimiza. *H. pylori* migra en un sentido multidireccional y, como consecuencia, el patrón de transición A-B ocurre en diferentes sitios gástricos. Posteriormente se genera una gastritis atrófica multifocal.

Etapas D: Un estado patológico avanzado en el que las glándulas secretoras de ácido se han atrofiado. Como resultado, no hay producción de ácido y el valor del pH tiende a aumentar. Ahora las bacterias generalistas pueden resistir el ambiente gástrico alterado y competir con *H. pylori* o aprovechar el nuevo espacio generado.

Etapas E-F: Un estado patológico de neoplasia en que la infección por *H. pylori* puede persistir en tejidos no malignos. Ahora las bacterias oportunistas pueden formar una nueva comunidad microbiana que busca establecer un equilibrio en el ambiente gástrico alterado caracterizado por un pH menos ácido.

Tiempo: El período de la etapa asintomática asociada con el equilibrio (A) y cada etapa sintomática asociada al desequilibrio (B-F) son particulares para cada individuo. El tiempo de progresión depende de la virulencia de *H. pylori* y otros cofactores de riesgo descritos en la carcinogénesis gástrica. Esta parte de la figura mantiene el concepto de CG como una enfermedad multifactorial.

Microbiota gástrica (%): En la microbiota (estadio A), la proporción de cada grupo bacteriano depende del equilibrio que se establezca entre la comunidad y el medio gástrico. En la disbiosis (B-EF), la proporción de cada grupo bacteriano se relaciona con la plasticidad fenotípica de cada especie microbiana, que se asocia al estado fisiológico del medio gástrico (tipo de lesión) y al *H. pylori*. La abundancia de algunas especies puede disminuir o aumentar.

Escala de pH del lumen: con base en los resultados de estudios previos, se asignó el papel de los valores de pH en cada etapa (29, 30). El equilibrio de la etapa A está en condiciones ácidas. Sin embargo, la acidez puede ser variable entre los individuos. Por lo tanto, se asignó un rango de pH de 1,3 a 2. Por otro lado, en los estadios de la enfermedad (B-F) se considera un modelo progresivo de disminución de la acidez de la luz gástrica.

La **cascada precancerosa de Correa** describe los cambios histológicos de la mucosa gástrica previos al desarrollo de cáncer gástrico (31). Con la progresión de la lesión, se alteran las características fisiológicas del estómago, principalmente por la disminución de la secreción ácida, lo que lleva a afectar las condiciones normales a las que se adapta la microbiota y se genera un espacio potencial para la colonización de bacterias oportunistas. Esto indica la disbiosis de la microbiota gástrica (23, 28, 32).

7.3 RESULTADOS CAPITULO 7. DISBIOSIS DE LA MICROBIOTA GÁSTRICA

7.3.1 Interpretación del modelo de disbiosis en la carcinogénesis gástrica

Hay dos formas de interpretar el modelo: la primera consiste en observar el modelo logarítmico de crecimiento de *H. pylori* y las bacterias oportunistas (línea continua Figura 2). En el estadio A, *H. pylori* infecta al individuo con una carga baja, desconocida y estable. Sin embargo, la fase de crecimiento del patobionte se activa tras este evento (*), hasta llegar a la fase estacionaria. El crecimiento exponencial de bacterias oportunistas es posible después de que *H. pylori* daña el ecosistema gástrico y la acidez

del ambiente gástrico disminuye. La segunda forma consiste en observar la variación de la abundancia relativa de cada componente microbiano durante la progresión de las lesiones gástricas. Tras el aumento de la abundancia relativa de *H. pylori* (*), la abundancia de la microbiota, en consecuencia, se reduce. El pH gástrico aumenta debido al daño de las glándulas secretoras de ácido, que se acompaña de la colonización de bacterias oportunistas (Figuras 2 y 3).

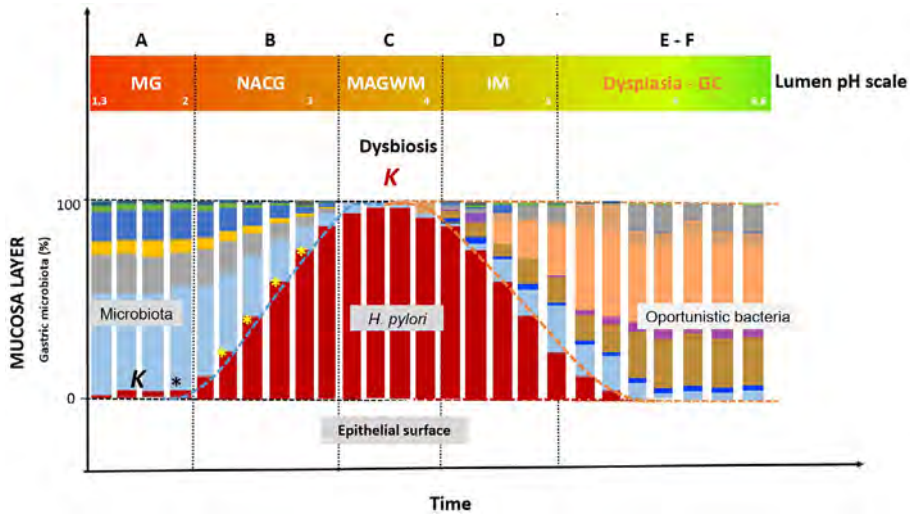


Figura 3. El modelo de disbiosis predice que, si tomamos biopsias de un individuo en las diferentes etapas de la cascada precancerosa de Correa, y evaluamos la composición de la microbiota, observaremos diferentes patrones de composición

En el estadio asintomático A de la gastritis leve (MG), observaremos un perfil de microbiota gástrica estable con una baja proporción de *H. pylori*, mientras que en el estadio B y C, gastritis crónica no atrófica (NACG) y gastritis atrófica multifocal sin metaplasia intestinal (MAGWM), tras la ruptura del equilibrio (*) se puede observar un perfil más variable, desde una baja proporción a una tendencia de dominancia de *H. pylori* (>95%). En los estadios D-EF, metaplasia intestinal (IM), displasia y cáncer gástrico (GC), también se pudieron observar perfiles de la microbiota gástrica de composición variable, desde la dominancia de *H. pylori* hasta su disminución, con la aparición de otros grupos bacterianos, incluidas bacterias oportunistas. En el estadio B (asteriscos amarillos *), representa la resistencia y resiliencia del ambiente gástrico al incremento de *H. pylori*.

En la etapa temprana A, hay un proceso inicial de transmisión de microbiota en los bebés, fuertemente relacionado con la madre. Esto se asocia principalmente a eventos clave, como el tipo de parto, hasta la inclusión de alimentos sólidos en la dieta (32, 33). Luego, el modelo comienza con la **etapa A**, que corresponde a los individuos que ya han pasado por este proceso. La microbiota coloniza de forma estable y, en algún momento, el individuo adquiere la infección por *H. pylori*. A pesar de la inflamación leve inducida por el patobionte, no hay trastornos gástricos y la condición es asintomática (4).

En las etapas B-C, los resultados metagenómicos de la microbiota gástrica pueden ser muy variables (fig. 3). La abundancia de cada grupo bacteriano puede fluctuar de diferentes formas en respuesta al crecimiento exponencial de *H. pylori* tras la alteración del factor limitante (*). Por otro lado, algunos grupos bacterianos podrían actuar

como elementos que participan en el ambiente gástrico como co-factores limitantes, al ejercer presión sobre el patobionte o la inflamación (34). Los factores fisiológicos pueden participar en el mantenimiento de la capacidad de retorno de la mucosa al estado normal. Así, el progreso de la infección y la severidad de la gastritis se modulan en el tiempo (**resistencia y resiliencia** ✨) (17).

Los resultados metagenómicos también pueden ser muy variables en las **etapas C-D**, al considerar que el nivel de colonización por *H. pylori* tiende a disminuir y puede aparecer la “disbiosis” donde muchos otros grupos bacterianos comienzan a incorporarse a la microbiota (22). Algunos reportes proponen que la **etapa D** (metaplasia intestinal) actúa como un “punto de no retorno” en el que la erradicación de *H. pylori* no contribuye a la regresión del daño de la mucosa gástrica (6, 35).

En las **etapas E-F**, el modelo mantiene una proporción de *H. pylori*. Con métodos altamente sensibles, como la hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, se posibilitó detectar la bacteria en células epiteliales metaplásicas, displásicas y adenocarcinómicas (36).

El tiempo de cada etapa hasta el cáncer gástrico es particular para cada individuo. En esta magnitud, se consideran factores complementarios que pueden modular la enfermedad, como el estilo de vida, la dieta, la ubicación geográfica, aspectos genéticos, ancestrales, etc. Este Capítulo mantiene el concepto de cáncer gástrico de etiología multifactorial (37).

7.3.2 Modelo de disbiosis contrastado con estudios de referencia

Con base en los conceptos ecológicos, se resume cada etapa del modelo basado en disbiosis de la microbiota gástrica (figs. 2 y 3) en relación con el desarrollo de lesiones precursoras hasta cáncer gástrico. En la **etapa A**, los individuos asintomáticos tienen una composición de microbiota gástrica relativamente estable asociada con el equilibrio de los factores limitantes del biotopo gástrico, tanto dependientes como independientes de la densidad. Las especies microbianas están en equilibrio con la capacidad de carga de su hábitat, así como con *H. pylori*. Durante la transición en las **etapas A a B**, se observa un crecimiento exponencial de *H. pylori*, a la par del declive de la microbiota. Puede ocurrir un evento (*) que altere un factor limitante X denso dependiente para *H. pylori* (patobionte) en el ambiente gástrico, que causa cambios en el comportamiento de la bacteria.

Se identificaron los perfiles de microbiota de individuos con histología gástrica normal (NGM) y gastritis crónica no atrófica (NACG). La comparación mostró una mayor abundancia de *H. pylori*; la bacteria tuvo la mayor influencia en la estructura y composición de la microbiota (Li *et al.* (38), Parsons *et al.* (39), Ferreira *et al.* (40)). Luego, la diversidad de los grupos bacterianos se vio afectada. La gastritis crónica activa como efector de la transición **A-B** y el papel defensivo del sistema inmune (**etapa B**) muestran asociación.

En la transición de la **etapa B** a la **C**, el crecimiento de *H. pylori* alcanza la fase estacionaria. Esto ocurre cuando la capacidad de carga (*K*) del sitio focal de la infección

alcanza su límite. A la vez, la microbiota también decae (17). Estudios de Li *et al.* (38), Caguazango *et al.* (41), y Hsieh *et al.* (42) demostraron que los perfiles de microbiota de individuos infectados por *H. pylori* con diagnóstico de gastritis no atrófica (NAG) se componen mayormente por la clase *Epsilonproteobacteria* (>95 %), en la región topográfica del estómago donde se encuentra *H. pylori*. Las bacterias tienen escasez de recursos, lo que se considera la causa de migración de la bacteria en un sentido multidireccional (incluso con llegada a las células epiteliales) (16). Esto promueve el desarrollo de inflamación y lesiones en diferentes regiones del estómago.

Desde el inicio de la NACG (**etapa B**) hasta las etapas de transición **C-D**, el ambiente gástrico tiende a ser menos ácido (aumento del valor del pH) como consecuencia del daño progresivo de las glándulas secretoras de ácido que conducen a la atrofia celular (23). El fenómeno de la hipoclorhidria genera un nuevo espacio que puede ser ocupado por bacterias distintas a la microbiota gástrica. Las bacterias de otros lugares (oportunistas) se trasladan al estómago y comienzan a colonizar el ambiente gástrico alterado. Estas bacterias pueden actuar como posibles competidores de *H. pylori* y provocar la disminución focal de la población (fase de muerte), lo que también influye en la migración de la bacteria (17) (Figs. 2 y 3).

En las etapas de transición **D-**, **E-**, a **F**, las bacterias involucradas en la disbiosis tienden a alcanzar un equilibrio en el ambiente gástrico alterado. El grupo metaplasia intestinal (MI) se posiciona como un intermedio entre la gastritis atrófica y el cáncer gástrico (43). Los perfiles de microbiota en MI se presentaron incluso cuando la abundancia de *H. pylori* es mínima, lo que indica su disminución progresiva hasta el desarrollo de cáncer gástrico, concordante con nuestro modelo de disbiosis (Li *et al.* (38), Parsons *et al.* (39), Ferreira *et al.* (40), Caguazango *et al.* (41), Hsieh *et al.* (42), y Eun *et al.* (44)).

Yu *et al.* (45) evaluó la microbiota gástrica de pacientes con cáncer gástrico de México y China, con énfasis en comparar la microbiota entre tejidos no malignos y tumorales. Observaron que el género *Helicobacter* domina en tejidos no malignos, mientras que en tejidos tumorales su abundancia disminuye considerablemente. Estos resultados sugirieron que el cambio local en el ambiente del tumor se relaciona con la reducción de la secreción ácida (hipoclorhidria) y se asocia con la disbiosis sectorizada. Por esta razón, *H. pylori*, al participar en las **etapas E-F** bajo este estado fisiológico, amerita considerarse.

7.3.3 BIOMARCADORES MICROBIANOS EN EL MODELO DE DISBIOSIS DE LA CARCINOGENÉISIS GÁSTRICA

Según estimaciones globales, la mayoría de la población infectada por *H. pylori* se encuentra en la **etapa A**, en equilibrio con la microbiota gástrica. Dado que *H. pylori* es un patobionte exclusivo de los humanos, en verdad la bacteria no se adaptaría al factor limitante denso-dependiente del ecosistema gástrico en otros animales como el murino. Por esta razón, la infección asintomática (**etapa A**) no puede estudiarse en modelos animales, mientras que el efecto descrito en ratones INS-GAS explicaría el estado sintomático de la disbiosis y la progresión de la enfermedad observada en humanos (Figuras 2 y 3).

Logfren *et al.* (46) encontró que la monoinfección por *H. pylori* fue suficiente para inducir patología gástrica en ratones gnotobióticos INS-GAS (**etapa * B-E**); pero en ratones SPF INS-GAS asociados con una microbiota compleja y ratones INS-GAS infectados con rASF *H. pylori* con una combinación de 3 especies bacterianas comensales, la carcinogénesis se promovió marcadamente y en un tiempo más corto (SPF: composición de microbiota de Specific Pathogen-Free ; rASF: flora de Schaedler alterada restringida) (46, 47) (**etapas D-E-F**).

Estudios en modelos murinos muestran el comportamiento patogénico de *H. pylori* luego de inducir (inocular) la bacteria en un ecosistema gástrico diferente al de su huésped natural (los humanos). En este caso, las posibilidades de establecer un balance serían menores.

Algunos estudios indicaron que los cambios en la microbiota gástrica se asocian con la malignidad del cáncer gástrico, pero el papel de las bacterias distintas de *H. pylori* aún no está claro (25, 38–45). En poblaciones con alto riesgo de cáncer gástrico, las especies con potencial patogénico que participan en disbiosis podrían establecer una comunidad bacteriana inflamatoria que promueve la carcinogénesis. Esto constituiría un factor de riesgo adicional que podría explicar el contraste en la incidencia de cáncer gástrico entre poblaciones de alto y bajo riesgo (48). Así, la comparación de la **etapa D** entre poblaciones con el riesgo opuesto de cáncer gástrico puede revelar diferencias contrastantes en la composición microbiana o biomarcadores microbianos que podrían modular el tiempo de las etapas en la carcinogénesis gástrica.

Informes sobre el aumento o disminución de la diversidad de la microbiota gástrica en el desarrollo de cáncer gástrico siguen siendo controvertidos. Sin embargo, es común encontrar especies bacterianas de la cavidad bucal (24, 43, 44). Si se prueba que también participan en la inducción de la carcinogénesis gástrica, entonces el desarrollo de programas especiales de buenas prácticas de higiene oral (principalmente en poblaciones de alto riesgo) puede ayudar a prevenir el desarrollo de lesiones gástricas premalignas y cáncer.

7.3.4 Aplicación del modelo de disbiosis en la carcinogénesis gástrica

El modelo que se muestra en la Figura 2 se puede utilizar como una herramienta didáctica para la explicación del desarrollo de cáncer gástrico. Cada estadio se complementa con descripciones de la enfermedad, que incluyen cambios de tipos celulares, producción de mucinas..., etc., o presentación de datos epidemiológicos durante la progresión de la lesión (por ejemplo, en las **etapas E y F**, el 1 a 3% de los pacientes infectados con *H. pylori* desarrolla cáncer gástrico).

El modelo de disbiosis que sigue la cascada precancerosa de Correa (31) podría complementarse con especies microbianas que subsisten o desaparecen durante la progresión del cáncer gástrico. La información proporcionada puede ser muy valiosa, porque evidencia el potencial patógeno de las bacterias y su plasticidad fenotípica. Las especies microbianas capaces de resistir las transiciones histopatológicas podrían

formar consorcios bacterianos con influencias en la inflamación por la producción de factores extracelulares y la producción de biopelículas (49, 50). Estos son algunos mecanismos del comportamiento cooperativo bacteriano descritos dentro de la plasticidad que podría ocurrir durante el cambio del ambiente gástrico (49, 50).

La interpretación del modelo que se muestra en la Figura 2 también se puede lograr con base en la teoría coevolutiva descrita entre el humano y *H. pylori* en la modulación del riesgo de cáncer gástrico (51). La asintomática **etapa A** puede representar el mantenimiento de la coevolución entre humanos y *H. pylori* en el tiempo. Mantener la relación mutualista *H. pylori*-Humano en el ecosistema gástrico puede resultar en una infección benigna (51, 52).

H. pylori ha prevalecido a lo largo de la Historia humana (8, 51–53). Sin embargo, se observó una alta incidencia de enfermedades gástricas probablemente en participación con el patobionte a fines del siglo XIX y principios del XX (período que incluye la revolución industrial) en países que formaron parte de esta transición tecnológica (53). Entonces, la probabilidad de alterar el factor limitante X denso-dependiente de *H. pylori* pudo haber aumentado debido a los cambios marcados hacia la modernidad, asociado con nuevos hábitos de vida, exposición a contaminación tóxica, etc. (54). La perturbación (*) puede desencadenar la situación de desequilibrio de relaciones preestablecidas, lo que lleva a las consecuencias del desarrollo de la enfermedad (**etapa B-EF**) (8, 51, 52). En la actualidad, esta tendencia se observa en los países en vías de desarrollo y aquellos que se encuentran en su transición a desarrollados (53, 55).

Los alcances y limitaciones que se derivan del modelo de disbiosis de la microbiota gástrica en la carcinogénesis gástrica se explicitan a continuación.

El modelo propuesto indica que la disbiosis de la microbiota que ocurre durante el desarrollo de cáncer gástrico se asocia con el patobionte *H. pylori*, y puede, en ciertas circunstancias, promover la atrofia glandular y el desarrollo de lesiones precursoras relacionadas con la hipoclorhidria. Estos eventos podrían considerarse como factores clave que favorecen gradualmente la invasión de otras bacterias y la progresión a cáncer gástrico (8, 23). Por el contrario, el modelo no explica la disbiosis en términos de riqueza (número de especies), al considerar que, durante la progresión de la lesión, la composición microbiana en cada individuo puede estar determinada por la ubicación geográfica, dieta, estilo de vida, etc. (56, 57). Sin embargo, de acuerdo con la Ley de tolerancia de Shelford, la variación de la acidez gástrica como filtro ecológico permitirá el crecimiento de muchas especies extragástricas, lo que promueve una mayor riqueza asociada a la severidad del daño epitelial.

El modelo no explica el fenómeno de disbiosis asociado con la terapia supresora de ácido en pacientes infectados con *H. pylori*.

Se supone que, independientemente de la composición, la microbiota gástrica en la (**etapa A**) funciona como un todo y representa el 100% de una comunidad estable que

beneficia la salud del huésped. Su alteración afecta a la composición de la microbiota, y provoca disbiosis y progresión de la enfermedad (etapas B-EF).

La aplicación del concepto ecológico de microbiota en el ambiente gástrico como un ecosistema y el establecimiento del modelo pueden facilitar la comprensión de los mecanismos subyacentes involucrados en el mantenimiento de un estómago fisiológicamente saludable o que conducen patológicamente a una enfermedad gástrica. Esto estimulará el inicio de nuevas preguntas de investigación y generará estrategias alternativas de prevención o tratamiento del cáncer gástrico.

7.3.5 Conclusiones capítulo 7. Disbiosis de la microbiota gástrica

1. Desde un punto de vista ecológico, las investigaciones sobre la microbiota gástrica nos animarán a resaltar el papel de la disbiosis de la microbiota en el desarrollo de cáncer gástrico. Durante el proceso de desarrollo, es importante concentrarse en bloquear el punto de activación (*) en el desarrollo temprano de la malignidad.
2. Hasta el momento, aún no existe una estrategia general para garantizar la prevención del cáncer gástrico. Con la comprensión mecanicista del papel de la infección por *H. pylori* en individuos asintomáticos, pueden surgir nuevas estrategias de manejo. Por ejemplo, para evitar el uso de antibióticos para reducir los efectos secundarios y, al mismo tiempo, la prevención de otras enfermedades relacionadas con el estómago.
3. El modelo enfatiza en que la disbiosis de la microbiota y la hipoclorhidria se asocian con la infección por *H. pylori*. Identificar las especies bacterianas involucradas en la disbiosis e implicadas en la progresión de las lesiones precursoras es objeto de estudio intensivo.
4. Teóricamente, con la identificación del factor limitante denso dependiente para *H. pylori*, el patobionte podría controlarse en primeras etapas (AB). Es pertinente comenzar a definir las ventajas y desventajas de esta posibilidad.
5. La aplicación de conceptos ecológicos en la comprensión de la enfermedad estomacal y gástrica podría contribuir a la generación de diferentes estrategias para la prevención y tratamiento del cáncer gástrico.

7.4 MICROBIOTA SEGÚN TOPOGRAFÍA GÁSTRICA

La inflamación en antro gástrico causada por *Helicobacter pylori* aumenta el riesgo de úlcera duodenal; sin embargo, la inflamación en el cuerpo gástrico genera una gastritis atrófica y mayor riesgo de cáncer gástrico. Estas respuestas inflamatorias según topografía del estómago podría explicarse por la composición de la microbiota gástrica asociada a *H. pylori*

Estudios dirigidos a entender las alteraciones celulares e histogénicas que ocurren en el estómago durante la inflamación crónica de la mucosa gástrica asociada a la infección por *H. pylori*, permitieron identificar respuestas fisiológicas diferenciales en la topografía del estómago y el riesgo de desarrollar cáncer (58-61). Cuando la gastritis predomina en la región antral, la producción de ácido gástrico se incrementa (hipoclorhidria), lo

que aumenta el riesgo de desarrollo de úlcera duodenal, que se considera un efecto que protege contra el desarrollo de cáncer; en contraste, cuando la gastritis predomina en el cuerpo del estómago, la producción de ácido gástrico disminuye (hipoclorhidria) y puede generar una gastritis atrófica como un estado de mayor riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico (60, 61).

Asimismo, este desequilibrio gástrico facilita la colonización sectorizada de bacterias extrañas a un estómago normal (62). La influencia de bacterias nitrosantes y otras especies en la disbiosis (alteración del equilibrio microbial) contribuye a la producción de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de oxígeno (ROS) que, asociadas a la infección por *H. pylori*, podrían dirigir la patogenia (63-65). Con el desarrollo de métodos moleculares de secuenciación, interesa, en esta sección del Capítulo, entender, desde un enfoque ecológico, la dinámica de la comunidad bacteriana según cada evento secuencial de carcinogénesis gástrica de tipo intestinal, descritos en el modelo general de Correa (64-67).

Nuestra hipótesis de trabajo propone que, independientemente del lugar de origen y riesgo poblacional a cáncer gástrico, individuos con enfermedad gástrica presentan un patrón de composición diferente y sectorizado de microbiota asociado al sitio anatómico y a las respuestas fisiológicas diferenciales durante la inflamación.

En este estudio, se comparó la microbiota gástrica de la región del antro y de cuerpo gástrico de individuos con gastritis no atrófica (GNA) y gastritis atrófica con metaplasia (GAM) provenientes de dos poblaciones de Nariño-Colombia con contraste de riesgo de cáncer gástrico y prevalencia similar de la infección por *H. pylori*; Túquerres (alto riesgo) es un municipio ubicado a 3070 msnm en las montañas de la Cordillera de los Andes, con una tasa de incidencia de cáncer gástrico de 150/100000 habitantes, y Tumaco (bajo riesgo) es un municipio ubicado en la Costa Pacífica de Nariño, donde la incidencia de cáncer gástrico es de 6/100000 habitantes (68). Las condiciones disímiles de estas zonas en relación con la geografía, ecología, aspectos económicos y culturales, permiten identificar tendencias generales de variación de la microbiota gástrica frente a las lesiones precursoras de cáncer gástrico.

7.4.1 Síntesis técnica para caracterización de las microbiotas según topografía gástrica

Se incluyeron en total 16 pacientes de Túquerres ($n = 8$) y Tumaco ($n = 8$), adultos mayores de 40 años con síntomas de dispepsia, que asistieron a una endoscopia estándar para detectar lesiones premalignas o malignas en la mucosa gástrica (Tabla 4).

De cada paciente se obtuvieron ocho biopsias de mucosa gástrica, cuatro (2 de antro / 2 de cuerpo) para realizar el diagnóstico histopatológico de acuerdo al sistema de clasificación de Sydney (69) y la detección histológica de *H. pylori* mediante tinción de Giemsa modificado, y cuatro biopsias (2 de antro / 2 de cuerpo) para el aislamiento de *H. pylori* (70), y la extracción de ADN total para la determinación de la microbiota gástrica.

Tabla 4. Sujetos participantes según procedencia, tipo de lesión gástrica, sitio anatómico del estómago e infección por *Helicobacter pylori*

Población	Biopsia	Lesión	Sitio gástrico	Edad años	Genero	Infección <i>H. pylori</i>
Tumaco	MB046	GNA	antro/cuerpo	59	F	(+)
Tumaco	MB090	GNA	antro/cuerpo	48	M	(+)
Tumaco	MB005	GNA	antro/cuerpo	50	M	(-)
Tumaco	MB080	GNA	antro/cuerpo	43	M	(-)
Tumaco	MB184	GAM	antro/cuerpo	44	F	(+)
Tumaco	MB196	GAM	antro/cuerpo	72	F	(+)
Tumaco	MB123	GAM	antro/cuerpo	61	M	(-)
Tumaco	MB191	GAM	antro/cuerpo	59	M	(-)
Túquerres	MB326	GNA	antro/cuerpo	51	F	(+)
Túquerres	MB442	GNA	antro/cuerpo	62	M	(+)
Túquerres	MB463	GNA	antro/cuerpo	58	F	(-)
Túquerres	MB428	GNA	antro/cuerpo	53	M	(-)
Túquerres	MB307	GAM	antro/cuerpo	59	M	(+)
Túquerres	MB376	GAM	antro/cuerpo	60	M	(+)
Túquerres	MB371	GAM	antro/cuerpo	61	M	(-)
Túquerres	MB448	GAM	antro/cuerpo	58	F	(-)

Las biopsias para determinación de microbiota gástrica procedentes de antro curvatura menor se codificaron como (Bx1) y las procedentes de cuerpo, pared anterior media, como (Bx10). Las biopsias gástricas utilizadas en esta investigación se obtuvieron en un estudio financiado por Colciencias, Contrato RC No1106-408-20549.

7.4.1.1 Extracción de ADN

Biopsias gástricas preservadas a -70°C se sometieron a un proceso de descongelación según protocolos de cadena de frío y, a partir de la maceración, se siguió el protocolo de extracción de ADN genómico del kit QIAamp DNA Mini kit, Qiagen®. La calidad y pureza del ADN se verificó por espectrofotometría (NanoDrop ND 2000-Thermo Scientific®).

7.4.1.2 Secuenciación del gen 16S rRNA y procesamiento de datos

La región V3-V4 del gen 16S rRNA se amplificó por PCR usando los primers 349 F (5'-CCTAGCGGNBGCASCAG-3') y 805 R (5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3') (71). Los productos purificados de PCR se secuenciaron en la plataforma Illumina Miseq usando el kit de reactivos MiSeq (2X300 pb) para lecturas emparejadas de acuerdo con las pautas del fabricante. Este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Investigación Molecular MR DNA, usando un pipeline estándar, disponible en <www.mrdnalab.com> (Shallowater, TX, EE.UU). De las lecturas de secuencias, se removieron códigos de barras y cebadores, luego se eliminaron las secuencias cortas < 200 pb, se eliminaron las secuencias con bases ambiguas y se eliminaron las secuencias con ejecuciones de homopolímeros superiores a 6 pb. Las lecturas tamizadas se agruparon en unidades taxonómicas operacionales (OTU) con una divergencia del 3% (97% de similitud) seguidas por la eliminación de secuencias singleton y quimeras (72, 73). Las OTU finales

se clasificaron taxonómicamente utilizando BLASTn frente a una base de datos curada derivada de RDPII (74) y NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov. Los datos se compilaron en cada nivel taxonómico, que describe la abundancia absoluta (recuentos) y la abundancia relativa bacteriana (porcentajes).

7.4.1.3 Análisis de la diversidad metagenómica

La riqueza y abundancia de las comunidades microbianas se evaluó al calcular las métricas de diversidad alfa, especies observadas, índice de Shannon, Simpson y Chao1, en el *software* Qiime v 1.8.0 (72, 73, 75).

Los perfiles de la microbiota gástrica se representaron en histogramas con los datos de abundancia relativa a nivel taxonómico de clase. Se elaboraron perfiles generales de la microbiota al calcular la abundancia promedio para cada sitio anatómico (cuerpo y antro gástrico) según diagnóstico histopatológico de lesión (GNA/GAM) y estatus de *H. pylori* (Hp-/Hp+). Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante análisis multivariante de permutación de varianza (Permanova) con 10000 permutaciones (76). Las OTU's compartidas entre grupos se visualizaron mediante diagramas de Venn a nivel de género.

Se generaron gráficos de cajas y bigotes para comparar los índices de Shannon, al evaluar diferencias en la transición de diversidad según lesión e infección por sitio anatómico con la prueba U de Mann-Whitney. La tendencia general de agrupamiento según composición de microbiota se evaluó con el método de grupo de pares no ponderado con media aritmética (UPGMA) y un análisis de componentes principales (PCA) (77). Para todos los análisis, se consideró un *P*-valor < 0,05 como significativo. Los análisis estadísticos se desarrollaron en el programa PAST3 (78).

7.4.1.4 Accesibilidad de datos

El set de datos de secuenciación de esta investigación se encuentra disponible en la plataforma BaseSpace de Illumina con la denominación de SAM1-51: URL: <https://basespace.illumina.com/s/NiYmU5ZGwDEB>

7.4.2 Resultados de la investigación microbiota según topografía gástrica

7.4.2.1 Análisis de secuencias de la microbiota gástrica

Este estudio reporta 32 microbiotas de antro y cuerpo gástrico de 16 individuos mayores de 40 años, de la población de Túquerres: alto riesgo de cáncer gástrico, y Tumaco: bajo riesgo, con el set de primers 341F/805R para análisis de secuencias del gen *16S ARNr* dominio V3-V4 por Illumina MiSeq.

Se analizó un total de 1890135 lecturas; después del estudio de calidad, 1655195 secuencias se identificaron dentro del dominio bacteria. Para el cálculo de los estimadores de diversidad Shannon, Simpson y Chao 1, las muestras se rarefactaron a 15658 secuencias y se iniciaron en 13702 secuencias al tomar como punto de corte la muestra más baja (Tabla 5).

Tabla 5. Datos de secuenciación y estimadores de diversidad

Código ID	No. reads bacterianos	No. OTU's observadas	Índice Shannon	Índice Simpson	Índice Chao1
MB005.Bx1	15161	532	3,03	0,63	1223
MB005.Bx10	25718	1074	5,31	0,91	2704
MB031.Bx1	36944	505	4,20	0,80	1110
MB031.Bx10	60754	1077	4,44	0,74	2952
MB046.Bx1	14954	447	4,71	0,84	625
MB046.Bx10	13216	469	5,62	0,88	655
MB123.Bx1	21644	877	4,85	0,89	2377
MB123.Bx10	36235	975	4,40	0,82	2561
MB134.Bx1	45976	222	1,33	0,27	516
MB134.Bx10	77676	190	1,00	0,22	390
MB184.Bx1	55920	223	1,68	0,35	534
MB184.Bx10	75414	269	1,83	0,39	648
MB191.Bx1	19839	439	4,45	0,87	914
MB191.Bx10	113780	341	3,67	0,79	834
MB196.Bx1	45731	210	1,57	0,28	353
MB196.Bx10	38343	182	0,86	0,24	416
MB307.Bx1	131429	190	1,11	0,26	553
MB307.Bx10	13277	324	3,05	0,77	591
MB326.Bx1	39999	211	1,71	0,45	776
MB326.Bx10	144562	166	1,06	0,26	499
MB371.Bx1	17893	413	3,92	0,81	802
MB371.Bx10	18844	592	4,54	0,85	1343
MB376.Bx1	154389	270	3,79	0,84	633
MB376.Bx10	34124	297	2,33	0,54	821
MB428.Bx1	24360	694	4,87	0,86	1706
MB428.Bx10	123816	410	4,41	0,87	988
MB442.Bx1	145479	195	1,29	0,30	487
MB442.Bx10	15030	1866	9,26	0,94	3084
MB448.Bx1	20805	822	5,17	0,92	2190
MB448.Bx10	16668	484	5,44	0,88	590
MB463.Bx1	31333	721	5,44	0,95	1484
MB463.Bx10	25882	579	3,41	0,73	1827

Las unidades taxonómicas operacionales (OTU's) se definieron con una divergencia del 3% (97% de similitud). Para calcular los estimadores de diversidad, las muestras se rarefactaron a 15658 secuencias y se iniciaron en 13.702 secuencias. Bx1: Biopsia de antro curvatura menor; Bx10: Biopsia de cuerpo, pared anterior media.

7.4.2.2 Diversidad metagenómica de la microbiota gástrica según población en riesgo de cáncer gástrico

El análisis taxonómico de la microbiota del antro y cuerpo gástrico de individuos de Túquerres mostro una representación de 14 phyla, 25 clases, 34 órdenes, 56 familias y 160 géneros, mientras el análisis en individuos de Tumaco 12 phyla, 23 clases, 34 órdenes, 57 familias y 171 géneros. Se reportan en total 14 phyla, 26 clases, 35 órdenes, 59 familias y 182 géneros, de los cuales 36 tuvieron una abundancia mayor a 0,1%.

En la composición de la microbiota de los individuos positivos para *H. pylori*, dominó la clase *Epsilonproteobacteria* en el antro y en el cuerpo gástrico, y en los individuos de Túquerres negativos para *H. pylori* y con diagnóstico de gastritis no atrófica dominó la clase *Gammaproteobacteria*. En los individuos de Tumaco con diagnóstico de gastritis no atrófica y negativos para *H. pylori*, la clase *Bacilli* dominó en los perfiles microbianos del cuerpo gástrico (>60%), mientras en el antro gástrico predominó la clase *Betaproteobacteria* (>70%) (Figura 1). Se encontraron diferencias significativas en el perfil de la microbiota acompañante de *H. pylori* según la población en riesgo de cáncer gástrico, independientemente del sitio topográfico del estómago ($P < 0,0001$).

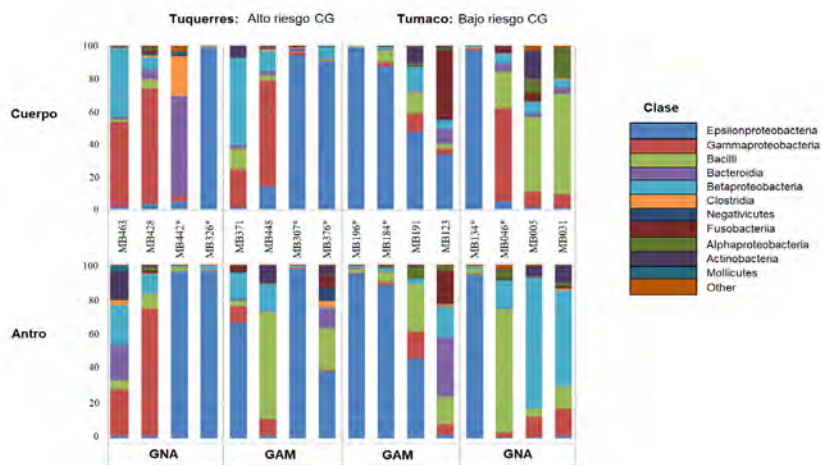


Figura 1. Abundancia relativa de unidades taxonómicas operativas a nivel de clase de la microbiota gástrica según sitio anatómico (cuerpo o antro gástrico) de pacientes con alto y bajo riesgo de cáncer gástrico

Túquerres: alto riesgo de cáncer gástrico. Tumaco: bajo riesgo de cáncer gástrico. Se observó una mayor composición de clases en el cuerpo y el antro gástrico de los individuos libres de la infección por *Helicobacter pylori*. Por el contrario, la clase *Epsilonproteobacteria* predominó en las dos regiones gástricas de los individuos infectados (*), dependiendo del tipo de lesión.

CG: cáncer gástrico; GNA: gastritis no atrófica; GAM: gastritis atrófica con metaplasia

7.4.2.3 Diversidad metagenómica según diagnóstico histopatológico y sitio anatómico

Los patrones de composición de los perfiles microbianos generales de las clases halladas en el antro y en el cuerpo gástrico de los individuos con diagnóstico de gastritis no atrófica de las dos poblaciones de estudio variaron. En el cuerpo gástrico de los individuos de Tumaco predominó la clase *Bacilli*, mientras que en el antro gástrico

hubo una mayor proporción de la clase *Betaproteobacteria*, aunque sin diferencias significativas de composición entre las dos regiones anatómicas ($P = 0,56$). En el cuerpo gástrico de los individuos de Túquerres predominó la clase *Gammaproteobacteria*, mientras en el antro predominó *Epsilonproteobacteria*; la comparación de los perfiles de la microbiota gástrica no evidenció diferencias significativas ($P = 0,91$). En general, los perfiles microbianos del cuerpo y del antro gástrico en los individuos con gastritis no atrófica no fueron significativamente diferentes ($P = 0,62$); sin embargo, la clase *Epsilonproteobacteria*, en la que se clasifica *H. pylori*, solo se presentó en todos los perfiles en una proporción del 20% (Figura 1).

Los patrones de composición de los perfiles microbianos generales en el antro y en el cuerpo gástrico de los individuos con diagnóstico de gastritis no atrófica de las dos poblaciones de estudio fueron similares. La clase *Epsilonproteobacteria*, que incluye a *H. pylori*, se observó en ambos sitios anatómicos en una proporción de menos del 50% en todos los perfiles, y los análisis comparativos de Tumaco, Túquerres y a nivel general no evidenciaron diferencias significativas (Permanova: A $P = 0,91$; B $P = 0,68$; C $P = 0,66$) (Figura 1). Con respecto a los resultados globales, según el tipo de gastritis, se encontraron diferencias en la composición de la microbiota acompañante de *H. pylori* entre los individuos con gastritis no atrófica y aquellos con metaplasia intestinal ($P \leq 0,05$).

7.4.2.4 Diversidad metagenómica de la microbiota según infección por *Helicobacter pylori* y sitio anatómico

Los perfiles del cuerpo y del antro de los individuos sin la infección por *H. pylori* (*H. pylori*-) evidenciaron un patrón de composición variable representado por las clases *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Bacilli*; en los análisis, no se encontraron diferencias significativas entre los sitios anatómicos en cada población ni a nivel general (Permanova A $P = 0,4$; B $P = 0,34$; C $P = 0,84$) (Figura 1).

Los perfiles microbianos de clase representativos para el antro y el cuerpo gástrico de individuos positivos para *H. pylori* de las dos poblaciones, presentaron patrones más homogéneos, con una alta proporción de *Epsilonproteobacteria* (>70%). La comparación del cuerpo y del antro gástrico no evidenció diferencias significativas entre la composición microbiana del sitio anatómico, lo mismo que a nivel general (Permanova A $P = 0,58$; B $P = 0,48$; C $P = 0,75$) (Figura 1).

7.4.2.5 Análisis comparativo de biopsias de la mucosa gástrica según la composición microbiana

El análisis de los componentes principales se efectuó con los datos de abundancia relativa a nivel de familia. El 80% de la varianza de los datos se explicó con base en los dos primeros componentes, lo que generó dos grupos principales. La tendencia del agrupamiento A se definió por la presencia de las familias *Streptococcaceae* y *Pseudomonadaceae*, con una carga del 70% (PC2, componente principal 2), mientras el grupo B se definió por la presencia de la familia *Helicobacteraceae* con la infección por *H. pylori* en un 94% (PC1, componente principal 1), independientemente del lugar de procedencia, del sitio anatómico y del tipo de lesión gástrica (Figura 2).

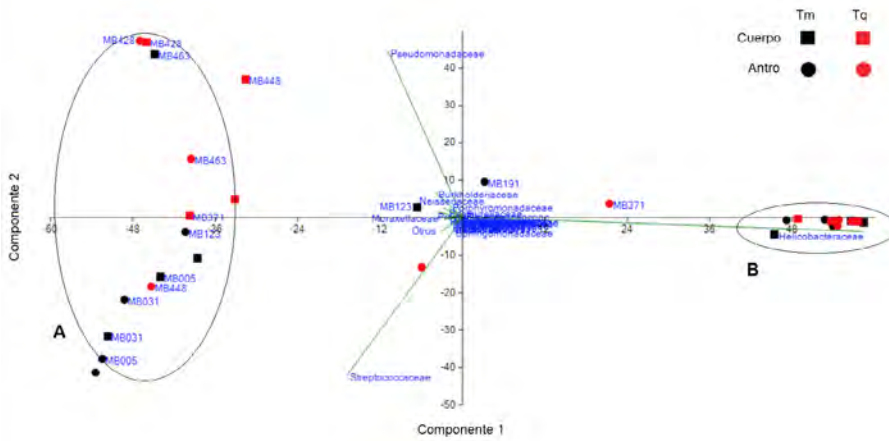


Figura 2. Análisis de componentes principales en función de la abundancia relativa de familias según sitio anatómico y población en riesgo de cáncer gástrico

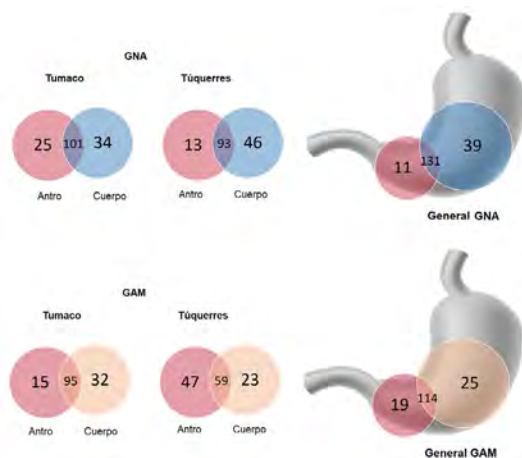
Túquerres, alto riesgo de cáncer gástrico, en color rojo. Tumaco, bajo riesgo de cáncer gástrico, en color negro. Solamente los individuos negativos para *Helicobacter pylori*, según la tinción de Giemsa, se etiquetaron con el código de la muestra. En el cuerpo gástrico: microbiota marcada con cuadros; en el antro: microbiota marcada con círculos. En el análisis de componentes principales se diferenciaron dos grupos, con independencia del tipo de lesión gástrica. La variable que influyó para separar el primer grupo correspondió a la familia *Helicobacteraceae*, con una carga del 94 %, mientras la separación del grupo dos se efectuó por la presencia de las familias *Streptococcaceae* y *Pseudomonadaceae*, presentes, sobre todo, en individuos sin la infección.

7.4.3 Sinopsis de la discusión de microbiota según topografía gástrica

En este estudio, se determinó la diversidad metagenómica de la microbiota gástrica de individuos de dos poblaciones de Colombia, ya conocidas por su riesgo opuesto para cáncer gástrico (62): Túquerres, con alto riesgo, y Tumaco, con bajo riesgo. La hipótesis de trabajo propuso que las respuestas fisiológicas frente a la gastritis diferenciada, según la región topográfica o sitio anatómico del estómago, se deben a una disbacteriosis particularmente diferente. Se comparó la microbiota gástrica del antro (Bx1) y del cuerpo (Bx10) del estómago para determinar los patrones de composición asociados con el estado de la mucosa gástrica según el diagnóstico histológico y el estatus de infección por *H. pylori*.

La gastritis no atrófica es una reacción inflamatoria de la mucosa gástrica que se presenta con acumulación de linfocitos y células plasmáticas, y cuyo predominio según la región topográfica del estómago lleva a resultados clínicos y patológicos diferentes (79). Cuando la gastritis se presenta en el antro, la producción de ácido y la predisposición al desarrollo de úlcera duodenal aumenta, y se reduce así el riesgo de cáncer gástrico, mientras que la gastritis en el cuerpo del estómago disminuye la secreción de ácido y predispone al desarrollo del cáncer gástrico (80-83). Al atender a dicho planteamiento, se compararon estos sitios anatómicos en individuos de Túquerres y de Tumaco. Se observaron patrones de composición microbiana variables y sin diferencias significativas. Se considera que *H. pylori* es la principal causa de la gastritis no atrófica (79) y, en el

análisis general, la proporción de la clase *Epsilonproteobacteria* fue similar a la de otras unidades taxonómicas operativas. En Tumaco, *Lactococcus lactis* fue más representativa en el antro y *Burkholderia mana*, en el cuerpo gástrico, mientras que en Túquerres las unidades taxonómicas operativas representativas del antro y del cuerpo correspondieron a *Pseudomonas putida* (Figura 1). Más del 60 % de los géneros identificados se encontró tanto en el antro como en el cuerpo gástrico (Figura 3).



GNA: gastritis no atrófica; GAM: gastritis atrófica con metaplasia.

Figura 3. Diagramas de Venn. Unidades taxonómicas operativas a nivel de género y según sitio anatómico y tipo de lesión gástrica en las dos poblaciones opuestas en cuanto al riesgo de cáncer gástrico

Las unidades taxonómicas operativas compartidas se pueden ver en las intersecciones de los círculos. Parte superior: diagrama en la población de Túquerres y en la de Tumaco, y general de unidades taxonómicas operativas del antro y del cuerpo gástrico de individuos con gastritis no atrófica. Parte inferior: diagrama de las poblaciones de Túquerres y de Tumaco y general de las unidades taxonómicas operativas del antro y del cuerpo gástrico de individuos con gastritis atrófica con metaplasia. Los diagramas de Venn se construyeron con las unidades taxonómicas operativas que presentaron 97% de similitud.

Si bien no se encontraron diferencias en la composición de la microbiota gástrica entre el cuerpo y el antro gástrico de los individuos de las dos poblaciones estudiadas, se observaron diferencias significativas en el perfil de la microbiota acompañante de *H. pylori* según la población en riesgo de cáncer gástrico, independientemente del sitio topográfico del estómago ($P < 0,0001$), resultados que concuerdan con lo encontrado por Yang, *et al.*, en poblaciones similares (66). El efecto de la infección en la composición de la microbiota gástrica, según la población en riesgo de cáncer gástrico, sugiere que las unidades taxonómicas operativas que conforman los perfiles de la microbiota acompañante se asocian con el riesgo de la enfermedad.

Lactococcus lactis es una bacteria de uso en la industria láctea cuya presencia en individuos con cáncer gástrico incrementa (84) y que se asocia con otros tipos de malignidad en pacientes inmunocomprometidos (85). El papel del lactato potencia la inflamación y su producción aumenta en el metabolismo de las células cancerígenas (86, 87). Si bien las bacterias ácido lácticas son beneficiosas para el intestino (88), debe

estudiarse más la relación del metabolismo fermentativo y el ácido láctico bacteriano exógeno con el proceso de digestión en los casos de gastritis o lesiones precursoras de cáncer gástrico. No hay reportes de asociación de *B. mana* y *P. putida* con las enfermedades gástricas.

La microbiota de los individuos con gastritis atrófica y metaplasia de las dos poblaciones no evidenció diferencias entre el cuerpo y el antro del estómago. En este tipo de lesión precancerosa, el remplazo de las glándulas gástricas por criptas tubulares rectas y células absorbentes y caliciformes (79) es un cambio que homogeniza las condiciones fisiológicas del ambiente gástrico en ambas regiones debido a la atrofia de las glándulas secretoras de ácido, lo que incrementa progresivamente el espectro de bacterias externas que pueden formar colonias (89, 90). La alta proporción de *Epsilonproteobacteria* (>50%) evidencia su influencia en la malignidad (Figura 1). Más del 40% de los géneros identificados se presentaban en el cuerpo y en el antro (Figura 3).

En Tumaco, las unidades taxonómicas operativas representativas halladas en el antro y en el cuerpo gástrico fueron *Fusobacterium periodonticum*, *Haemophilus parainfluenzae* y *L. lactis*, mientras que en Túquerres, en el antro lo fueron *Streptococcus salivarius* y *Prevotella spp.*, y en el cuerpo gástrico, *Neisseria sicca* y *Haemophilus parainfluenzae*. Estas bacterias se describen como microbiota normal oral y de las vías respiratorias con potencial patogénico en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos, y su presencia se asociaría con el aumento del pH como consecuencia de la hipoclorhidria (67, 81, 89-91).

A pesar de que los métodos de diagnóstico de la infección por *H. pylori* empleados (tinción de Giemsa y cultivo) no detectaron la bacteria en individuos negativos para *H. pylori*, mediante secuenciación metagenómica se registraron lecturas en un rango que abarcó desde muy poca abundancia de *H. pylori* hasta una considerable, especialmente en las muestras MB123 y MB191, lo que concuerda con lo reportado en otras investigaciones (67, 92, 93).

Debido a este fenómeno, se efectuaron los análisis de la microbiota en individuos negativos para *H. pylori*, pues factores como la baja carga bacteriana, la distribución heterogénea de *H. pylori* en el estómago y otros asociados con el huésped (gastritis activa, consumo de alcohol, uso de antagonistas de los receptores H_2 , inhibidores de la bomba de protones, antibióticos, etc.), serían elementos comunes que influyeron en los resultados (94, 95). En este caso, se observaron patrones microbianos heterogéneos de composición similar tanto en el antro como en el cuerpo gástrico, lo cual se evidenció por la diversidad metagenómica en ambos sitios anatómicos. En los perfiles microbianos, la proporción de la clase *Epsilonproteobacteria* fue de <20%, pero en Tumaco las unidades taxonómicas operativas representativas del antro y del cuerpo fueron *L. lactis* y *F. periodonticum*, mientras que en Túquerres fueron *P. putida* y *B. mana*. Este análisis sugiere que, aunque la proporción de la infección por *H. pylori* fue baja, la actividad de la ureasa, que neutraliza el ácido del estómago, puede generar un ambiente más favorable para la colonización progresiva de bacterias externas (62, 89, 90). El papel de otras bacterias

diferentes a *H. pylori* en el proceso inflamatorio y la enfermedad gástrica es un tema de debate; sin embargo, los subproductos de distintos tipos de metabolismo bacteriano podrían incrementar la producción de compuestos dañinos para el ADN, como los N-nitroso, que influyen en la metilación de las células epiteliales (65, 96), y constituir un factor complementario en la malignidad. Más del 50% de los géneros identificados se presentaban tanto en el cuerpo como en el antro (Figura 4).

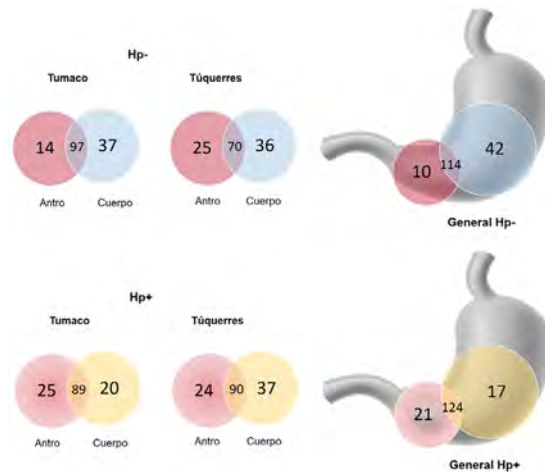


Figura 4. Diagramas de Venn. Unidades taxonómicas operativas a nivel de género y según sitio anatómico y estatus de infección por *Helicobacter pylori* en las dos poblaciones con riesgo opuesto de cáncer gástrico

Las unidades taxonómicas operativas compartidas se pueden ver en las intersecciones de los círculos. Parte superior: diagrama poblacional de Túquerres y de Tumaco y general de unidades taxonómicas operativas del antro y del cuerpo gástrico de individuos libres de la infección por *H. pylori* (Hp-). Parte inferior: diagrama poblacional de Túquerres y de Tumaco y general de unidades taxonómicas operativas del antro y del cuerpo gástrico de individuos infectados con *H. pylori* (Hp+). Los diagramas de Venn se construyeron con las unidades taxonómicas operativas que presentaron un 97% de similitud.

Los perfiles de microbiota del antro y del cuerpo gástrico de individuos positivos para *H. pylori* evidenciaron patrones de composición homogénea con un predominio de la clase *Epsilonproteobacteria* de más del 70%. Rolig, *et al.* (82), estudió, en modelos en ratón, la capacidad proliferativa de *H. pylori* y describieron el receptor quimiotáctico TlpD como responsable de que la bacteria proliferara en el antro, así como su capacidad quimiotáctica para guiar la bacteria hacia el cuerpo gástrico. Conjuntamente con la motilidad flagelar, la actividad de la ureasa y el sistema de secreción de tipo IV (T4SS) (83), estos elementos se consideran básicos para la persistencia inflamatoria en distintas regiones de la mucosa del estómago (96, 97).

A pesar de que *H. pylori* fue la especie más abundante (Figura 1), en Tumaco *L. lactis* se encontró en el antro y en el cuerpo gástrico, mientras que en Túquerres las unidades taxonómicas operativas representativas en el antro fueron *S. salivaris* y *Prevotella spp.*, y en el cuerpo gástrico, *L. lactis*. Además, más del 60% de los géneros identificados se presentaban tanto en el cuerpo como en el antro (Figura 4).

Con la intención de establecer las tendencias de la microbiota según la presencia de las condiciones estudiadas, se comparó la transición de la gastritis no atrófica a la atrófica metaplásica y el estatus de *H. pylori*, y se observó que la lesión no influyó en la diversidad de la microbiota en el antro y en el cuerpo, donde unas especies microbianas se remplazarían por otras manteniendo la diversidad ($P > 0,05$; no se presentan los datos), mientras que la infección por *H. pylori* reduce la diversidad metagenómica en el antro ($P = 0,005$) y tiende a limitarla en el cuerpo, aunque no de forma significativa (Figura 5).

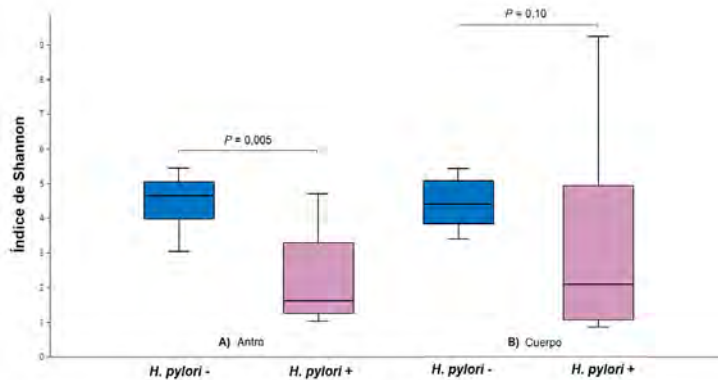


Figura 5. Diversidad metagenómica de la microbiota gástrica: índices de Shannon según infección por *Helicobacter pylori* y sitio anatómico del estómago A) Antro gástrico. B) Cuerpo gástrico. En el antro gástrico de individuos positivos para *H. pylori* (*H. pylori* +) la diversidad metagenómica disminuyó significativamente con respecto al grupo de individuos libres de la infección (*H. pylori* -) ($P = 0,005$). Aunque se observó una tendencia a la diferenciación de la microbiota en el cuerpo gástrico, los análisis no revelaron diferencias estadísticas en la transición del estatus de *H. pylori* ($P = 0,10$; prueba U de Mann-Whitney).

La progresión de la gastritis a lesión precancerosa se asocia con el incremento de la abundancia de *H. pylori*, y dada la aparición de nuevos grupos bacterianos en la carcinogénesis (84, 98-100), el mantenimiento del agente patógeno se vería limitado por la posible competencia interespecífica debida a la escasez de recursos (100), por lo cual también depende del estado focal del tejido tumoral o del no maligno (93).

Este estudio permitió identificar microorganismos taxonómicamente comunes o no, participantes en el desarrollo de la enfermedad gástrica según la región topográfica. Aunque contar con una muestra de mayor tamaño e incluir pacientes con diagnóstico de cáncer complementarían los análisis, se pudo establecer que *H. pylori* es un factor común en la malignidad y en el proceso de disbacteriosis gástrica en individuos con alto y bajo riesgo de cáncer gástrico.

Se resalta la importancia de implementar los métodos de alta sensibilidad para la detección de *H. pylori*, pues, independientemente de la carga bacteriana u otros elementos inhibitorios, es necesario tener un diagnóstico certero, con el fin de evitar problemas de responsabilidad médica debido a los falsos negativos (94). Cada vez hay más información que sustenta que la erradicación de *H. pylori*, en individuos que lo

ameritan bajo un sustento genético, podría restaurar el equilibrio gástrico (93, 98-100), por lo que el diagnóstico temprano y el tratamiento adecuado son elementos muy valiosos en la prevención del cáncer gástrico (101, 102).

7.4.4 Conclusiones capítulo 7. Microbiota según topografía gástrica

Independientemente de las respuestas fisiológicas sectorizadas en la inflamación gástrica, los grupos bacterianos involucrados en la disbacteriosis pueden colonizar tanto el antro como el cuerpo gástrico.

La microbiota acompañante de *H. pylori* se asocia con el riesgo poblacional de cáncer gástrico (bajo en Tumaco y alto en Túquerres), independientemente del sitio del estómago afectado.

El incremento de la abundancia de *H. pylori* podría ser un elemento usualmente presente en la progresión de la gastritis no atrófica a la de tipo atrófica con metaplasia intestinal; por lo tanto, es posible establecer que la disbacteriosis de la microbiota gástrica precedida por el agente patógeno favorece dicha progresión.

La infección por *H. pylori* asociada con la microbiota gástrica se relaciona con las regiones topográficas del estómago y con el tipo de lesión gástrica, lo que sugiere su importancia en la disbacteriosis microbiana y en la enfermedad gástrica.

Si bien la disminución de la eficacia del tratamiento contra *H. pylori* es un tema de actual inquietud (70, 89, 98), la modulación de la microbiota gástrica plantea retos alternativos de investigación para prevenir la carcinogénesis gástrica en individuos infectados con *H. pylori*.

7.5 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 7

1. IARC Helicobacter pylori Working Group. Helicobacter pylori eradication as strategy for preventing gastric cancer. IARC. 2014 Dec 6;8:1-143. Disponible en: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Working-Group-Reports/-Em-Helicobacter-Pylori-Em-Eradication-As-A-Strategy-For-Preventing-Gastric-Cancer-2014>
2. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet. 1983 Jun 4;1(8336):1273-5. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)92719-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)92719-8).
3. Martin ME, Solnick JV. The gastric microbial community, Helicobacter pylori colonization, and disease. Gut Microb. 2014 May-Jun;5(3):345-50. doi: 10.4161/gmic.28573
4. Moyat M, Velin D. Immune responses to Helicobacter pylori infection. World J Gastroenterol. 2014;20(19):5583-93. doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5583
5. Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF. ACG clinical guideline: treatment of Helicobacter pylori infection. Am J Gastroenterol. 2017 Jan 10;112:212-39. doi: 10.1038/ajg.2016.563
6. O'Connor A, O'Morain CA, Ford AC. Population screening and treatment of Helicobacter pylori infection. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2017. Apr;14:230-40. doi: 10.1038/nrgastro.2016.195.
7. Gravina AG, Zagari RM, De Musis C, Romano L, Loguercio C, Romano M, et al. Helicobacter pylori and extragastric diseases: a review. World J Gastroenterol. 2018 Aug 7;24(29):3204-21. doi: 10.3748/wjg.v24.i29.3204.
8. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of Helicobacter pylori and humans: ancient history, modern implications. J Clin Invest. 2009 Sep;119(9):2475-87. doi: <https://doi.org/10.1172/jci38605>
9. Megraud F. The challenge of Helicobacter pylori resistance to antibiotics: the comeback of bismuth-based quadruple therapy. Ther Adv Gastroenterol. 2012 Mar;5(2):103-9. doi: <https://doi.org/10.1177/1756283x11432492>
10. Edwards, W, Edwards C. Population limiting factors. Nat Educ Knowl. 2011; 3(10):1. Disponible en: <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/population-limiting-factors-17059572/>
11. Murray J. Mathematical biology, vol. 18. New York: Springer-Verlag. 1993. Disponible en: <http://poleon.if.ufrgs.br/pub/listas-sistdin/MurrayI.pdf>
12. Dornelas M. Disturbance and change in biodiversity. Phil Trans R. Soc B. 2010 Nov 27;365:3719-27. doi: <https://doi.org/10.1098%2Frstb.2010.0295>
13. de Baar HJW. von Liebig's law of the minimum and plankton ecology (1899-1991). Prog Oceanogr. 1994;33(4):347-86. doi: [https://doi.org/10.1016/0079-6611\(94\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0079-6611(94)90022-1)
14. Warsi OM, Dykhuizen DE. Evolutionary implications of Liebig's law of the minimum: selection under low concentrations of two nonsubstitutable nutrients. Ecol Evol. 2017 Jun 8;7(14):5296-309. doi: 10.1002/ece3.3096
15. Wilson M. Bacteriology of humans: an ecological perspective. Malden: Blackwell; 2008 Jan 26. Disponible en: <https://es.scribd.com/book/142414721/Bacteriology-of-Humans-An-Ecological-Perspective>

16. Warren HS, Fitting C, Hoff E, Adib-Conquy M, Beasley-Topliffe L, Tesini B, et al. Resilience to bacterial infection: difference between species could be due to proteins in serum. *J Infect Dis.* 2010 Jan 15;201(2):223-32. doi: 10.1086/649557
17. Shade A, Peter H, Allison SD, Baho DL, Berga M, Bürgmann H, et al. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front Microbiol.* 2012 Oct 14;3:417. doi: 10.3389/fmicb.2012.00417
18. Rad R, Brenner L, Bauer S, Schwendy S, Layland L, da Costa CP, et al. CD25^{fl}/Foxp3^{fl} T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonization in vivo. *Gastroenterology.* 2006 Aug;131(2):525-37. doi: 10.1053/j.gastro.2006.05.001
19. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jan;8(1):15-25. doi: [https://doi:10.1038/nrmicro2259](https://doi.org/10.1038/nrmicro2259).
20. Keilberg D, Zavros Y, Shepherd B, Salama NR, Ottemann KM. Spatial and temporal shifts in bacterial biogeography and gland occupation during the development of a chronic infection. *mBio.* 2016 Oct 11;7:1-13. doi: 10.1128/mBio.01705-16
21. Kirschner DE, Blaser MJ. The dynamics of *Helicobacter pylori* infection of the human stomach. *J Theor Biol.* 1995 Sep 21; 176(2):281-90. doi: 10.1006/jtbi.1995.0198
22. Remus-Emsermann MN, Tecon R, Kowalchuk GA, Leveau JH. Variation in local-carrying capacity and the individual fate of bacterial colonizers in the phyllosphere. *ISME J.* 2012 Apr; 6(4):756-65. doi: 10.1038/ismej.2011.209
23. Noto JM, Peek RM. The gastric microbiome, its interaction with *Helicobacter pylori*, and its potential role in the progression to stomach cancer. *PLoS Pathog.* 2017 Oct 5;13(10):e1006573. doi: 10.1371/journal.ppat.1006573
24. Sheflin AM, Whitney AK, Weir TL. Cancer-promoting effects of microbial dysbiosis. *Curr Oncol Rep.* 2014 Oct;16(10):406. doi: 10.1007/s11912-014-0406-0
25. Odum EP, Barrett GW. *Fundamentals of ecology.* 7th ed. Belmont, CA. Thomson Brooks/Cole; 2016. Disponible en: <https://search.worldcat.org/es/title/1265043496>
26. Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling HO, et al. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 6;101(14):5024-9. doi: 10.1073/pnas.0308386101
27. Bücker R, Azevedo-Vethacke M, Groll C, Garten D, Josenhans C, Suerbaum S, et al. *Helicobacter pylori* colonization critically depends on postprandial gastric conditions. *Sci Rep.* 2012 Dec;2:994. doi: 10.1038/srep00994
28. Khan S, Karim A, Iqbal S. *Helicobacter urease*: niche construction at the single molecule level. *J Bioci.* 2009 Oct; 34(4):503-11. doi: 10.1007/s12038-009-0069-4
29. Beasley DE, Koltz AM, Lambert JE, Fierer N, Dunn RR. The evolution of stomach acidity and its relevance to the human microbiome. *PLoS One.* 2015 Jul 29;10(7): e0134116. doi: 10.1371/journal.pone.0134116
30. Lu PJ, Hsu PI, Chen CH, Hsiao M, Chang WC, Tseng HH, et al. Gastric juice acidity in upper gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol.* 2010 Nov;16(43):5496-501. doi: 10.3748/wjg.v16.i43.5496
31. Correa P, Piazuelo M. The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis.* 2012 Jan;13(1):2-9. doi: 10.1111/j.1751-2980.2011.00550.x
32. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* 2012 Mar 13;13(4):260-70. doi: 10.1038/nrg3182

33. Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med*. 2014 Feb;21(2):109-17. doi: 10.1016/j.molmed.2014.12.002
34. Rieu A, Aoudia N, Jego G, Chluba J, Yousfi N, Briandet R, et al. The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*. *Cell Microbiol*. 2014 Dec; 16(12):1836-53. doi: 10.1111/cmi.12331
35. Chen HN, Wang Z, Li X, Zhou ZG. *Helicobacter pylori* eradication cannot reduce the risk of gastric cancer in patients with intestinal metaplasia and dysplasia: evidence from a meta-analysis. *Gastric Cancer*. 2016 Jan;19(1):166-75. doi: 10.1007/s10120-015-0462-7
36. Semino-Mora C, Doi SQ, Marty A, Simko V, Carlstedt I, Dubois A. Intracellular and interstitial expression of *Helicobacter pylori* virulence genes in gastric precancerous intestinal metaplasia and adenocarcinoma. *J Infect Dis*. 2003 Apr 15;187(8):1165-77. doi: 10.1086/368133
37. Zabaleta J. Multifactorial etiology of gastric cancer. *Methods Mol Biol*. 2012 Jan 1;863:411-35. doi: 10.1007/978-1-61779-612-8_26
38. Li TH, Qin Y, Sham PC, Lau KS, Chu KM, Leung WK. Alterations in gastric microbiota after *H. pylori* eradication and in different histological stages of gastric carcinogenesis. *Sci Rep*. 2017 Mar 21;7:44935. doi: 10.1038/srep44935
39. Parsons BN, Ijaz UZ, D'Amore R, Burkitt MD, Eccles R, Lenzi L, et al. Comparison of the human gastric microbiota in hypochlorhydric states arising as a result of *Helicobacter pylori*-induced atrophic gastritis, autoimmune atrophic gastritis and proton pump inhibitor use. *PLoS Pathog*. 2017 Nov 2;13(11):e1006653. doi:10.1371/journal.ppat.1006653
40. Ferreira RM, Pereira-Marques J, Pinto-Ribeiro I, Costa JL, Carneiro F, Machado JC, et al. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut*. 2017;67(2):226-36. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314205
41. Caguazango JC, Pazos AJ. Microbiota according to gastric topography in patients with low or high risk of gastric cancer in Nariño, Colombia. *Biomedica*. 2019 Aug 1;39 (Supl. 2):157-71. doi: 10.7705/biomedica.v39i4.4520
42. Hsieh YY, Tung SY, Pan HY, Yen CW, Xu HW, Lin Y, et al. Increased abundance of *Clostridium* and *Fusobacterium* in gastric microbiota of patients with gastric cancer in taiwan. *Sci Rep*. 2018 Jan 9;8(1):158. doi: 10.1038/s41598-017-18596-0
43. Aviles-Jimenez F, Vazquez-Jimenez F, Medrano-Guzman R, Mantilla A, Torres J. Stomach microbiota composition varies between patients with non-atrophic gastritis and patients with intestinal type of gastric cancer. *Sci Rep*. 2014 Feb;4:4202. doi: 10.1038/srep04202
44. Eun CS, Kim BK, Han DS, Kim SY, Kim KM, Choi BY, et al. Differences in gastric mucosal microbiota profiling in patients with chronic gastritis, intestinal metaplasia, and gastric cancer using pyrosequencing methods. *Helicobacter*. 2014 Dec;19(6):407-16. doi: 10.1111/hel.12145
45. Yu G, Hu N, Wang L, Wang C, Han XY, Humphry M, et al. Gastric microbiota features associated with cancer risk factors and clinical outcomes: A pilot study in gastric cardia cancer patients from Shanxi, China. *Int J Canc*. 2017 Jul 1;141(1):45-51. doi: 10.1002/ijc.30700

46. Lofgren JL, Whary MT, Ge Z, Muthupalani S, Taylor NS, Mobley M, et al. Lack of commensal flora in *Helicobacter pylori*-infected INS-GAS mice reduces gastritis and delays intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*. 2011 Jan;140(1):210-20. doi: 10.1053/j.gastro.2010.09.048
47. Lertpiriyapong K, Whary MT, Muthupalani S, Lofgren JL, Gamazon ER, Feng Y, et al. Gastric colonisation with a restricted commensal microbiota replicates the promotion of neoplastic lesions by diverse intestinal microbiota in the *Helicobacter pylori* INS-GAS mouse model of gastric carcinogenesis. *Gut*. 2013 Jun;63(1):54-63. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305178
48. Yang I, Woltemate S, Piazuolo MB, Bravo LE, Yopez MC, Romero-Gallo J, et al. Different gastric microbiota compositions in two human populations with high and low gastric cancer risk in Colombia. *Sci Rep*. 2016 Jan;6:18594. doi: 10.1038/srep18594
49. Kuemmerli R, Jiricny N, Clarke LS, West SA, Griffin AS. Phenotypic plasticity of a cooperative behaviour in bacteria. *J Evol Biol*. 2009 Feb 19;22(3):589-98. doi: 10.1111/j.1420-9101.2008.01666.x
50. Bridier A, Piard JC, Pandin C, Labarthe S, Dubois-Brissonnet F, Briandet R. Spatial organization plasticity as an adaptive driver of surface microbial communities. *Front Microbiol*. 2017 Jul 20;8:1364. doi: 10.3389/fmicb.2017.01364
51. De Sablet T, Piazuolo MB, Shaffer CL, Schneider BG, Asim M, Chaturvedi R, et al. Phylogeographic origin of *Helicobacter pylori* is a determinant of gastric cancer risk. *Gut*. 2011 Sep; 60(9):1189-95. doi: 10.1136/gut.2010.234468
52. Kodaman N, Pazos A, Schneider BG, Piazuolo MB, Mera R, Sobota RS, et al. Human and *Helicobacter pylori* coevolution shapes the risk of gastric disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2014;111(4):1455-60. doi: 10.1073/pnas.1318093111
53. Graham DY. History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 May 14;20(18):5191-204. doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5191
54. Yuan W, Yang N, Li X. Advances in understanding how heavy metal pollution triggers gastric cancer. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:7825432. doi: 10.1155/2016/7825432
55. Global Cancer Observatory. IARC. Cancer fact sheets: stomach cancer. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/data/pdf/factsheets/cancers/cancer-fact-sheets-5.pdf>; 2016.
56. Wang L, Zhou J, Xin Y, Geng C, Tian Z, Yu X, et al. Bacterial overgrowth and diversification of microbiota in gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2016 Mar;28(3):261-6. doi: 10.1097/MEG.0000000000000542
57. Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases?. *U Eur Gastroenterol J*. 2015 Jun;3(3):255-60. doi: 10.1177/2050640614566846
58. Sipponen P, Kekki M, Seppala K, Siurala M. The relationships between chronic gastritis and gastric acid secretion. *Aliment Pharmacol Ther*. 1996 Apr;10(Sup 1):103-18. doi: 10.1046/j.1365-2036.1996.22164011.x
59. Kong YJ, Yi HG, Dai JC, Wei MX. Histological changes of gastric mucosa after *Helicobacter pylori* eradication: A systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2014 May 21;20:5903-11. doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5903
60. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*. 2001 Sep 13;345(11):784-9. doi: 10.1056/NEJMoa001999

61. Camargo MC, Anderson WF, King JB, Correa P, Thomas C, Rosenberg P, et al. Divergent trends for gastric cancer incidence by anatomical subsite in US adults. *Gut*. 2011 Dec;60(12):1644-9. doi: 10.1136/gut.2010.236737
62. Sheh A, Fox J. The role of the gastrointestinal microbiome in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Gut Microbes*. 2013 Nov ;4(6):505-31. doi: 10.4161/gmic.26205
63. Correa P. Human gastric carcinogenesis: A multistep and multifactorial process—first American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res*. 1992 Dec 15;52(24):6735-40. Disponible <https://aacrjournals.org/cancerres/article/52/24/6735/498347/Human-Gastric-Carcinogenesis-A-Multistep-and>
64. Brawner KM, Morrow CD, Smith PD. Gastric microbiome and gastric cancer. *Cancer J*. 2014 May; 20(3):211-6. doi: 10.1097/PPO.0000000000000043
65. Liatsos C, Papaefthymiou A, Kyriakos N, Galanopoulos M, Doulberis M, Giakoumis M, et al. *Helicobacter pylori*, gastric microbiota and gastric cancer relationship: Unrolling the tangle. *World J Gastrointest Oncol*. 2022 May 15;14(5):959-72. doi: 10.4251/wjgo.v14.i5.959.
66. Mannion A, Sheh A, Shen Z, Dzink-Fox J, Piazuelo MB, Wilson KT, et al. Shotgun metagenomics of gastric biopsies reveals compositional and functional microbiome shifts in high and low gastric cancer risk populations from Colombia, South America. *Gut Microbes*. 2023 Jan-Dec;15(1):2186677. doi: 10.1080/19490976.2023.2186677
67. Avilés F, Vázquez F, Medrano R, Mantilla A, Torres J. Stomach microbiota composition varies between patients with non-atrophic gastritis and patients with intestinal type of gastric cancer. *Sci Rep*. 2014 Feb 26;4:4202. doi: 10.1038/srep04202
68. Correa P, Cuello C, Duque E, Burbano LC, García FT, Bolaños O, et al. Gastric cancer in Colombia. III. Natural history of precursor lesions. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Nov;57(5):1027-35. doi: 10.1093/jnci/57.5.1027
69. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system. International workshop on the histopathology of gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol*. 1996 Oct;20(10):1161-81. doi: 10.1097/00000478-199610000-00001
70. Figueroa M, Cortés A, Pazos A, Bravo L. Sensibilidad in vitro a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. *Biomédica*. 2012 Jan;32(1):32-42. doi: 10.1590/S0120-41572012000100005
71. Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing. *PLoS One*. 2014 Aug 21;9(8):e105592. doi: 10.1371/journal.pone.0105592
72. Dowd SE, Callaway TR, Wolcott RD, Sun Y, McKeenan T, Hagevoort RG, et al. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol*. 2008 Jul 24;8:125. doi: 10.1186/1471-2180-8-125
73. Rodríguez TM, Fornaciari G, Luciani S, Dowd SE, Toranzos GA, Marota I, et al. Gut microbiome of an 11th Century A.D. Pre-Columbian Andean mummy. *PLoS One*. 2015 Sep 30;10(9):e0138135. doi: 10.1371/journal.pone.0138135

74. Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker CT, Saxman PR, Farris RJ, et al. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 2001 Jan 1;29:73-4. doi: 10.1093/nar/29.1.173
75. Caporaso J, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F, Costello E, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010 May;7(5):335-6. doi: 10.1038/nmeth.f.303
76. Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 2001 Jun 28;26(1):32-46. doi: 10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x
77. Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 2007 Nov;62(2):142-60. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x
78. Hammer Ø, Harper D, Ryan PD. Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* 2001 Feb 28;4:9-18. Disponible en: https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf
79. Correa P, Piazuelo MB. *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. *US Gastroenterol Hepatol Rev.* 2011 Jun;7(1):59-64. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3158605/>
80. Koskenpato J, Färkkilä M, Sipponen P. *Helicobacter pylori* and different topographic types of gastritis: Treatment response after successful eradication therapy in functional dyspepsia. *Scand J Gastroenterol.* 2002 Jul;37(7):778-84. doi: 10.1080/gas.37.7.778.784
81. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117:60-9. doi: 10.1172/JCI30111
82. Rolig AS, Shanks J, Carter JE, Ottemann KM. *Helicobacter pylori* requires TlpD-driven chemotaxis to proliferate in the antrum. *Infect Immun.* 2012 Sep 11;80(10):3713-20. doi: 10.1128/IAI.00407-12
83. Rieder G, Merchant JL, Haas R. *Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils. *Gastroenterology.* 2005 May;128(5):1229-42. doi: 10.1053/j.gastro.2005.02.064
84. Castaño N, Goh KL, Fock KM, Mitchell HM, Kaakoush NO. Dysbiosis of the microbiome in gastric carcinogenesis. *Sci Rep.* 2017 Nov 21;7(1):15957. doi: 10.1038/s41598-017-16289-2
85. Fragkiadakis K, Ioannou P, Barbounakis E, Samonis G. Intra-abdominal abscesses by *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* in an immunocompetent adult with severe periodontitis and pernicious anemia. *IDCases.* 2016 Dec 11;7:27-9. doi: 10.1016/j.idcr.2016.12.001
86. Haas R, Smith J, Rocher V, Nadkarni S, Montero T, D'Acquisto, F, et al. Lactate regulates metabolic and pro-inflammatory circuits in control of T cell migration and effector functions. *PLoS Biol.* 2015 Jul 16;13(7):e1002202. doi: 10.1371/journal.pbio.1002202
87. Romero S, Moreno M, Prado H, Sánchez F. Lactate contribution to the tumor microenvironment: Mechanisms, effects on immune cells and therapeutic relevance. *Front Immunol.* 2016 Feb 16;7:52. doi: 10.3389/fimmu.2016.00052
88. Vitetta L, Coulson S, Thomsen M, Nguyen T, Hall S. Probiotics, D-Lactic acidosis, oxidative stress and strain specificity. *Gut Microbes.* 2017 Jul 4;8(4):311-22. doi: 10.1080/19490976.2017.1279379.gjh

89. Engstrand L, Lindberg M. *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2013 Feb;27(1):39-45. doi: 10.1016/j.bpg.2013.03.016
90. Li XX, Wong GL, To KF, Wong VW, Lai LH, Chow DK, et al. Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* Infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use. *PLoS One*. 2009 Nov 24;4(11):e7985. doi: 10.1371/journal.pone.0007985
91. Maughan H, Redfield RJ. Tracing the evolution of competence in *Haemophilus influenzae*. *PLoS One*. 2009 Jun;4(6):e5854. doi: 10.1371/journal.pone.0005854
92. Alarcón T, Llorca L, Pérez G. Impact of the microbiota and gastric disease development by *Helicobacter pylori*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017;400:253-75. doi: 10.1007/978-3-319-50520-6_11
93. Yu G, Torres J, Hu N, Medrano R, Herrera R, Humphrys MS, et al. Molecular characterization of the human stomach microbiota in gastric cancer patients. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Jul 6;7:302. doi:10.3389/fcimb.2017.00302
94. Kocsmár É, Szirtes I, Kramer Z, Szijártó A, Bene L, Buzás GM, et al. Sensitivity of *Helicobacter pylori* detection by Giemsa staining is poor in comparison with immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization and strongly depends on inflammatory activity. *Helicobacter*. 2017 Aug;22(4):e12387. doi: 10.1111/hel.12387
95. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, Wu MC, Shih HY, Wang SS, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol*. 2015 Oct 28;21(40):11221-35. doi: 10.3748/wjg.v21.i40.11221
96. Wang LL, Yu XJ, Zhan SH, Jia SJ, Tian ZB, Dong QJ. Participation of microbiota in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 May 7;20(17):4948-52. doi: 10.3748/wjg.v20.i17.4948
97. Croxen MA, Sisson G, Melano R, Hoffman PS. The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor TlpB (HP0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa. *J Bacteriol*. 2006 Apr;188(7):2656-65. doi: 10.1128/JB.188.7.2656-2665.2006
98. Wang Y, Han W, Wang N, Han M, Ban M, Dai J. The role of microbiota in the development and treatment of gastric cancer. *Front Oncol*. 2023 Sep 29;13:1224669. doi: 10.3389/fonc.2023.1224669
99. Ferreira RM, Pereira J, Pinto I, Costa JL, Carneiro F, Machado JC, et al. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut*. 2018 Feb;67(2):226-36. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314205.
100. Das A, Pereira V, Saxena S, Ghosh TS, Anbumani D, Bag S, et al. Gastric microbiome of Indian patients with *Helicobacter pylori* infection, and their interaction networks. *Sci Rep*. 2017 Nov 13;7:15438. doi: 10.1038/s41598-017-15510-6
101. Yoon K, Kim N. Reversibility of atrophic gastritis and intestinal metaplasia by eradication of *Helicobacter pylori*. *Korean J Gastroenterol*. 2018 Sep 25;72(3):104-15. Korean. doi: 10.4166/kjg.2018.72.3.104.
102. Dore MP, Cipolli A, Ruggiu MW, Manca A, Bassotti G, Pes GM. *Helicobacter pylori* eradication may influence timing of endoscopic surveillance for gastric cancer in patients with gastric precancerous lesions: A retrospective study. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Jan;97(4):e9734. doi: 10.1097/MD.0000000000009734

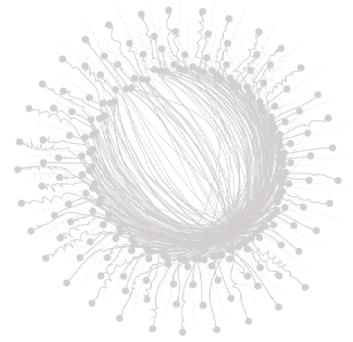
Sobre el autor

Alvaro Pazos-Moncayo, PhD.



Es Profesor Titular de la Universidad de Nariño hace más de 30 años. En la Universidad de Antioquia, cursó estudios en Ingeniería Química. En la Universidad del Valle-Cali-Colombia, obtuvo el título de Bacteriólogo y Laboratorista Clínico y una Maestría en Microbiología. Cursó estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas y en Vanderbilt University-Nashville, USA, desarrolló su Tesis Doctoral bajo la orientación del ilustre científico colombiano Dr. Pelayo Correa, PhD. Tiene un Postdoctoral Position en Metagenómica Clínica de Georgia Institute of Technology-Atlanta, USA. Es Director del Grupo de Investigación Salud Pública de la Universidad de Nariño, clasificado en la categoría A1, convocatoria 894 de 2022 de MinCiencias (1). En la misma convocatoria, obtuvo la categoría de Investigador Emérito con vigencia vitalicia (2). Su producción intelectual, de más de 50 artículos científicos publicados en revistas extranjeras, su reconocimiento nacional e internacional, con 8 premios y su trayectoria académica se plasman en su CVLac (1); en el Google Scholar (3); en el Research Gate (4) y en el (ORCID) (5).

1. <https://scienti.minciencias.gov.co/gruplac/jsp/visualiza/visualizagr.jsp?nro=00000000008168>
2. https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000194972
3. <https://scholar.google.com/citations?user=n4ZJz4cAAAAJ&hl=es>
4. <https://www.researchgate.net/profile/Alvaro-Pazos>
5. <https://orcid.org/0000-0001-5603-7898>



Lista de tablas

Capítulo 1. Aislamiento de *Helicobacter pylori* de mucosa gástrica

Tabla 1. Características demográficas según procedencia _____	19
Tabla 2. Exposición y antecedentes según procedencia _____	19
Tabla 3. Frecuencia de detección de <i>Helicobacter pylori</i> según método diagnóstico y sitio anatómico de obtención de la biopsia de mucosa gástrica	20
Tabla 4. Características sociodemográficas según infección por <i>Helicobacter pylori</i> _____	22
Tabla 5. Tumaco-Túquerres. Prevalencia de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> según tipo de gastritis _____	22

Capítulo 2. Biomarcadores de virulencia de *Helicobacter pylori*

Tabla 1. Prevalencia de genotipos de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i> según el tipo de gastritis para Tumaco y Túquerres. _____	32
Tabla 2. Prevalencia de genotipos <i>cagA</i> y <i>vacA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> según procedencia _____	33

Capítulo 3. Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*

Tabla 1. Eficacia terapéutica de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> según procedencia _____	46
Tabla 2. Respuesta al tratamiento de <i>Helicobacter pylori</i> según virulencia _	46
Tabla 3. Efecto del tratamiento en los genotipos <i>cagA</i> y <i>vacA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> de pacientes de Tumaco y Túquerres _____	46
Tabla 4. Prevalencia de resistencia antibiótica según procedencia, tipo de gastritis y genotipo de <i>H. pylori</i> _____	47
Tabla 5. Respuesta al tratamiento de <i>Helicobacter pylori</i> según susceptibilidad	48

Capítulo 4. Ancestros filogeográficos de *Helicobacter pylori*

Tabla 1. Distribución de <i>Helicobacter pylori</i> en ancestros filogeográficos según poblaciones de Nariño _____	63
---	----

Tabla 2. Ancestros filogeográficos según procedencia, género y tipo de gastritis _	64
Tabla 3. Ancestros filogeográficos según susceptibilidad y virulencia de <i>Helicobacter pylori</i> _____	65
Tabla 4. Ancestros filogeográficos de <i>Helicobacter pylori</i> según gen <i>cagA</i> __	65

Capítulo 5. Biomarcadores de susceptibilidad humana a cáncer gástrico

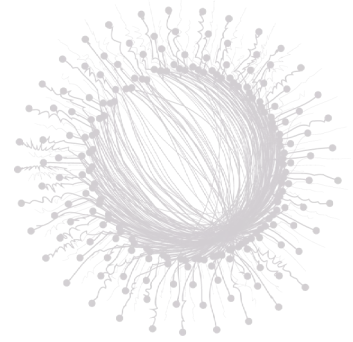
Tabla 1. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de <i>IL-1B-511</i> , <i>FNT-α-308</i> , <i>IL-10-1082</i> e <i>IL-1RN</i> en los pacientes de Túquerres _____	85
Tabla 2. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de <i>IL-1B-511</i> , <i>IL-1082</i> , <i>FNT-α-308</i> e <i>IL-1RN</i> en los pacientes de Tumaco _____	85
Tabla 3. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos de <i>IL-1β-511</i> , <i>FNT-α-308</i> , <i>IL-10-1082</i> e <i>IL-1RN*2</i> , según lugar de procedencia ____	86
Tabla 4. Estimación de X^2 para determinar equilibrio Hardy-Weinberg en las dos poblaciones de estudio _____	86

Capítulo 6. Biomarcadores evolutivos de cáncer gástrico

Tabla 1. Correlaciones entre ancestría humana y <i>Helicobacter pylori</i> en poblaciones de montaña y costera de Nariño-Colombia _____	114
--	-----

Capítulo 7. Disbiosis de la microbiota gástrica

Tabla 1. Glosario de términos _____	126
Tabla 2. Puntos claves Figura 1 _____	128
Tabla 3. Puntos claves Figura 2 _____	129
Tabla 4. Sujetos participantes según procedencia, tipo de lesión gástrica, sitio anatómico del estómago e infección por <i>Helicobacter pylori</i> . _____	139
Tabla 5. Datos de secuenciación y estimadores de diversidad _____	141



Lista de figuras y fotos

Capítulo 1. Aislamiento de *Helicobacter pylori* de mucosa gástrica

Figura 1. Topografía de los sitios anatómicos de toma de biopsias gástricas.	15
Foto 1. Prueba de oxidasa para <i>Helicobacter pylori</i>	17
Foto 2. Prueba de catalasa para <i>Helicobacter pylori</i>	17
Foto 3. Prueba de detección de ureasa de <i>Helicobacter pylori</i>	17
Foto 4. Gram de un aislado de <i>Helicobacter pylori</i>	18
Foto 5. Patrón electroforético de productos de amplificación por PCR del gen estructural <i>ureA</i> de <i>Helicobacter pylori</i>	18
Foto 6. Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> en agar sangre de cordero.	20

Capítulo 2. Biomarcadores de virulencia de *Helicobacter pylori*

Figura 1. Organización del PAI- <i>cag</i> en cepas <i>cagA</i> (+) de <i>Helicobacter pylori</i> .	27
Figura 2. Tipos y número de motivos EPIYA de CagA de <i>Helicobacter pylori</i>	28
Foto 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen <i>cagA</i> .	33
Foto 2. Detección por PCR del marcador <i>cagA</i> (-) (<i>Empty site</i>).	33
Foto 3. Patrón electroforético de productos de amplificación por PCR de los alelos m1/m2 del gen <i>vacA</i> .	34
Foto 4. Patrón electroforético de productos de amplificación por PCR de los alelos s1/s2 del gen <i>vacA</i> .	34

Capítulo 3. Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*

Foto 1. Alteraciones histopatológicas de la mucosa gástrica.	43
Foto 2. Diagnóstico histopatológico de <i>Helicobacter pylori</i>	43

Capítulo 4. Ancestros filogeográficos de *Helicobacter pylori*

Foto 1. Patrón electroforético de productos de amplificación por PCR de siete genes estructurales (<i>housekeeping</i>) de <i>Helicobacter pylori</i> para el análisis MLST.	62
---	----

Figura 1. Arquitectura del árbol filogeográfico de <i>Helicobacter pylori</i> realizado por MLST de muestras provenientes de regiones de alto y bajo riesgo de cáncer gástrico de Colombia. _____	64
--	----

Capítulo 5. Biomarcadores de susceptibilidad humana a cáncer gástrico

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los polimorfismos del intrón variable <i>IL-1RN</i> . _____	82
Figura 2. Electroforesis en agarosa al 1,5% del gen <i>IL-1B</i> y genotipificación del polimorfismo -511C/T. A). _____	83
Figura 3. Electroforesis en agarosa al 1,5% del gen <i>IL-10</i> y genotipificación del polimorfismo <i>1082A/G</i> . _____	83
Figura 4. Electroforesis en agarosa al 1,5% del gen <i>FNT-α</i> y genotipificación del polimorfismo -308G/A. _____	84
Figura 5. Proporción de ancestros humanos y de <i>Helicobacter. pylori</i> en las dos poblaciones de estudio. _____	89
Figura 6. Perfil de proporciones de ancestros humanos según genotipos de interleuquinas <i>IL-1B-511</i> , <i>IL-10-1082</i> en la población de Tumaco. _____	90
Figura 7. Proporción general promedio de genotipos de interleuquinas <i>IL-1B-511</i> , <i>IL-10-1082</i> según las proporciones de ancestros humanos en la población de Tumaco. _____	90
Figura 8. Perfil de proporciones de ancestros humanos según genotipos de interleuquinas <i>IL-1B-511</i> , <i>IL-10-1082</i> en la población de Túquerres. _____	91
Figura 9. Proporción general promedio de genotipos de interleuquinas <i>IL-1B-511</i> , <i>IL-10-1082</i> según ancestros humanos en las poblaciones de Tumaco y Túquerres. _____	91
Figura 10. Perfil de proporciones de ancestros filogeográficos de <i>Helicobacter pylori</i> según genotipos de interleuquinas <i>IL-1B-511</i> , <i>IL-10-1082</i> en la población de Tumaco. _____	92
Figura 11. Proporción general promedio de genotipos de interleuquinas <i>IL-1B-511</i> , <i>IL-10-1082</i> según las proporciones de ancestros filogeográficos de <i>Helicobacter pylori</i> en la población de Tumaco. _____	93
Figura 12. Perfil de proporciones de ancestros filogeográficos de <i>Helicobacter pylori</i> según genotipos de interleuquinas <i>IL-1B-511</i> , <i>IL-10-1082</i> en la población de Túquerres. _____	93
Figura 13. Proporción general promedio de genotipos de interleuquinas <i>IL-1B-511</i> , <i>IL-10-1082</i> según ancestros filogeográficos de <i>Helicobacter pylori</i> en la población de Túquerres. _____	94
Figura 14. Proporción general promedio de genotipos de interleuquinas <i>IL-1B-511</i> , <i>IL-10-1082</i> según ancestros filogeográficos de <i>Helicobacter pylori</i> en las poblaciones de Tumaco y Túquerres. _____	94
Figura 15. Efecto de la evolución Humano- <i>Helicobacter pylori</i> sobre la susceptibilidad genética al cáncer gástrico y sobre enfermedad gástrica. _____	95

Capítulo 6. Biomarcadores evolutivos de cáncer gástrico

Figura 1. Ancestría humana y de *Helicobacter pylori* _____ 103
Figura 2. Relación entre la Ancestría de *Helicobacter pylori* y la Ancestría Amerindia humana. _____ 114
Figura 3. Todos los sujetos con proporciones bajas de ancestría africana del huésped (<17,6%, el decil más bajo en la Costa) y que portaban una cepa de *H. pylori* con >19,8% de ancestría AA1 (línea punteada) _____ 116

Capítulo 7. Disbiosis de la microbiota gástrica

Figura 1. Aplicación de la Ley del mínimo de Liebig para la explicación de la enfermedad gástrica asociada a *Helicobacter pylori* _____ 128
Figura 2. Modelo de disbiosis de la microbiota gástrica asociado a la infección por *Helicobacter pylori* y variaciones de pH (escala colorimétrica) en el proceso de carcinogénesis. _____ 130
Figura 3. El modelo de disbiosis predice que, si tomamos biopsias de un individuo en las diferentes etapas de la cascada precancerosa de Correa, y evaluamos la composición de la microbiota, observaremos diferentes patrones de composición. _____ 132

Figura 1. Abundancia relativa de unidades taxonómicas operativas a nivel de clase de la microbiota gástrica según sitio anatómico (cuerpo o antro gástrico) de pacientes con alto y bajo riesgo de cáncer gástrico. _____ 142
Figura 2. Análisis de componentes principales en función de la abundancia relativa de familias según sitio anatómico y población en riesgo de cáncer gástrico. _____ 144
Figura 3. Diagramas de Venn. Unidades taxonómicas operativas a nivel de género y según sitio anatómico y tipo de lesión gástrica en las dos poblaciones opuestas en cuanto al riesgo de cáncer gástrico. _____ 145
Figura 4. Diagramas de Venn. Unidades taxonómicas operativas a nivel de género y según sitio anatómico y estatus de infección por *Helicobacter pylori* en las dos poblaciones con riesgo opuesto de cáncer gástrico. _____ 147
Figura 5. Diversidad metagenómica de la microbiota gástrica: índices de Shannon según infección por *Helicobacter pylori* y sitio anatómico del estómago. _____ 148



Editorial

Universidad de **Nariño**

Fecha de publicación: abril 8 de 2024
San Juan de Pasto - Nariño - Colombia

Biomarcadores de Cáncer Gástrico es un libro derivado de nuestras investigaciones, que recopila los principales hallazgos básicos y poblacionales tendientes a dilucidar las causas de cáncer gástrico y los determinantes para la prevención de la enfermedad. La determinación de biomarcadores de la enfermedad en población de Nariño-Colombia, será de su interés, ya que esta enfermedad tiene una de las tasas de incidencia más altas del mundo en la población andina y/o se convierte en uno de los referentes teóricos o metodológicos para investigadores de las Ciencias Biomédicas y Ciencias de la Salud. Las razones fundamentales para leerlo: Que parte del libro sirva a nuestros estudiantes de pregrado y posgrado como referencia básica para el entendimiento de los factores que exponen a un individuo al desarrollo de cáncer gástrico y el aprendizaje de las técnicas de biología molecular y genómicas que se aplican para identificar biomarcadores humanos y de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) para cáncer. Por otra parte se describen temas que se consideran necesarios para formular marcos teóricos y estados del arte acompañados de metodologías de punta, que posibilitan el uso de información en la estructuración de proyectos de investigación en su campo de actuación.

La amplia gama de biomarcadores de cáncer gástrico que se ilustran en el libro recopilan una historia académica de trabajo de investigación de más de 25 años y posibilitarán resolver la ausencia de buenos textos sobre la temática en castellano y que, a la vez, se constituya en material de consulta bibliográfica en los procesos de investigación científica en las áreas del conocimiento.

La documentación del aislamiento e identificación del oncopatógeno *H. pylori* de mucosa gástrica humana permitirá al lector tener un referente respecto a cómo superar las dificultades del cultivo in vitro del microorganismo que, en mi experiencia, es el más “fastidioso” en cuanto a su manejo-conservación y activación en el laboratorio. Es importante divulgar los avances que nos permitieron determinar biomarcadores de virulencia y de patogenicidad de *H. pylori*; los de susceptibilidad humana a cáncer gástrico y que, igual, bajo el uso de las ciencias ómicas o genómicas, los biomarcadores ancestrales y evolutivos *H. pylori*-humanos, de aplicación clínica personalizada y de investigación traslacional en el perfilamiento de pacientes de Nariño con alto riesgo de cáncer gástrico y su adecuado tratamiento de prevención de la enfermedad. El texto incluye la idea referida a que el cáncer gástrico surge del colapso de la relación de equilibrio entre el ecosistema gástrico y la bacteria *H. pylori*, junto con los principales cambios fisiopatológicos en la cascada precancerosa de Correa. Comprender el origen del cáncer gástrico desde el punto de vista de sistema ecológico y conocer las características evolutivas huésped-*H. pylori* trae perspectivas sobre el desarrollo de nuevas estrategias para la prevención del cáncer gástrico.

ISBN: 978-628-7679-51-1



9 786287 679511



CESUN
CENTRO DE ESTUDIOS EN SALUD
DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO



Universidad de Nariño
FUNDADA EN 1994



Asociación de Instituciones de Alta Calidad
RESOLUCIÓN MEN 000022 - FEBRO 11 DE 2023



120 años
Universidad de Nariño

Editorial
Universidad de Nariño