UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

EXPRESIÓN LOCAL DE CITOCINAS, GRADO DE LESIÓN DE LA MUCOSA GÁSTRICA E INFLUENCIA DE LAS HELMINTIASIS INTESTINALES EN ADULTOS VENEZOLANOS INFECTADOS POR *HELICOBACTER PYLORI*

TESIS DOCTORAL

Alisbeth Diamelis Fuenmayor Boscán

ALCALÁ DE HENARES, 2012

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

EXPRESIÓN LOCAL DE CITOCINAS, GRADO DE LESIÓN DE LA MUCOSA GÁSTRICA E INFLUENCIA DE LAS HELMINTIASIS INTESTINALES EN ADULTOS VENEZOLANOS INFECTADOS POR *HELICOBACTER PYLORI*

TESIS DOCTORAL

Alisbeth Diamelis Fuenmayor Boscán

DIRECTORES DE TESIS

Melchor Álvarez de Mon Soto
Catedrático de Medicina,
Universidad de Alcalá.

Ileana Margarita Hernández Rincón
Catedrática de Medicina,
Universidad del Zulia-Venezuela.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas e instituciones que contribuyeron, de alguna manera, a la realización de estos estudios doctorales y a la ejecución del presente trabajo de investigación.

A quienes me ofrecieron su apoyo incondicional, su mano amiga, sus palabras de estímulo, sus orientaciones y sugerencias, sus oraciones...

...Mi más profundo y sincero agradecimiento.

Alisbeth

DEDICATORIA

A Dios...

...porque sus manos amorosas y seguras me han guiado hasta el día de hoy

A mis padres y hermanos...

...por su cariño, aliento y por acompañarme siempre en el camino de la vida

A mi querido esposo...

...por ser un compañero comprensivo, amoroso y paciente.

A mis amados hijos, Daniel y Miguel...

...por ser una maravillosa evidencia del amor y la bendición de Dios.

ÍNDICE

CONTENIDO **Página**

Abreviaturas

Summary

I.- Introducción..... 1

I.1.- Aspectos generales de la infección por *Helicobacter pylori*..... 1

I.2.- Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*..... 2

I.3.- *Helicobacter pylori* y patología gastroduodenal 4

I.3.1.- Infección aguda por *Helicobacter pylori*..... *5*

I.3.2.- Infección crónica por *Helicobacter pylori* 6

I.3.3.- Cascada precancerosa gástrica 9

I.4.- Colonización por *H. pylori* y patogénesis ..... .11

I.4.1.- Factores dependientes del microorganismo ..... .11

I.4.1.1.- Enzima ureasa 13

I.4.1.2.- Proteína activadora de neutrófilos de *H. pylori*:..... 14
HP-NAP

I.4.1.3.- Citotoxina vacuolizante: VacA..... 16

I.4.1.4.- Isla de patogenicidad *cag*-PAI 17

I.4.1.5.- Proteínas de membrana externa: OMP..... 19

I.4.1.6.- Lipopolisacárido bacteriano 20

I.4.1.7.- Proteínas de reacción cruzada con ATPasas H^+,K^+..... 22

I.4.2.- Factores dependientes del hospedador..... 22

I.4.2.1.- Respuesta inmunitaria contra patógenos bacterianos:
aspectos generales 22

I.4.2.2.- Respuesta inmunitaria contra *H. pylori* 23

I.4.2.2.1.- Inmunidad innata..... 23

I.4.2.2.2.- Inmunidad adaptativa..... 24

I.4.2.2.2.1.- Respuesta celular..... 24

I.4.2.2.2.2.- Respuesta humoral 30

I.4.2.4.- Polimorfismos genéticos para citocinas 31

I.4.3.- Factores ambientales: el papel de los helmintos intestinales 32

II.- Hipótesis y Objetivos..... 35

III.- Materiales y Métodos 40

III.1.- Tipo de investigación 41
III.2.- Población objeto de estudio 41
III.3.- Criterios de inclusión 41
III.3.1.- Diagnóstico endoscópico de gastropatía 41
III.3.2.- Infección activa por *H. pylori*..... 41
III.3.3.- Infección parasitaria por helmintos intestinales 42
III.4.- Criterios de exclusión 42
III.4.1.- Criterios generales de exclusión 42
III.4.2.- Criterios de exclusión específicos para los grupos 2 y 3 43
III.4.3.- Criterios de exclusión específicos para los grupos 1 y 2 43
III.5.- Grupos de estudio 43
III.5.1.- Grupo 1: *H. pylori*+/helmintos+ 43
III.5.2.- Grupo 2: *H. pylori*+/helmintos- 43
III.5.3.- Grupo 3: *H. pylori-*/helmintos- 44
III.6.- Tipo de muestreo y estrategias para la selección de los pacientes 44
III.7.- Aspectos bioéticos 44
III.8.- Descripción de procedimientos 45
III.8.1.- Historia clínica 45
III.8.2.- Pruebas rutinarias de laboratorio 46
III.8.2.1.- Pruebas realizadas en muestras sanguíneas 46
III.8.2.2.- Examen coproparasitológico 46
III.8.3.- Endoscopia del tracto digestivo superior 46
III.8.4.- Cultivo microbiológico para *H. pylori* 48
III.8.5.- Prueba rápida de ureasa en biopsias 48
III.8.6.- Estudio histopatológico con coloración de hematoxilina.eosina 49
III.8.7.- Cálculo del índice de riesgo para cáncer gástrico 49
III.8.8.- Detección y cuantificación de citocinas en la mucosa gástrica antral 50
III.8.9.- Análisis estadístico 53
IV.- Resultados 55
IV.1.-Características sociodemográficas de la muestra poblacional 56
IV.2.- Parámetros biométricos generales 58

IV.3.- Hallazgos endoscópicos en el tracto digestivo superior 59
IV.4.- Hallazgos histopatológicos en la mucosa gástrica 61
IV.4.1.- Hallazgos histopatológicos en la mucosa gástrica antral 62
IV.4.2.- Hallazgos histopatológicos en la mucosa del corpus gástrico..... 64
IV.4.3.- Frecuencia de gastritis crónica y activa predominante en el corpus gástrico, e índice de riesgo para cáncer gástrico..... 66
IV.4.4.- Correlación entre los hallazgos histopatológicos y los hallazgos endoscópicos..... 68
IV.5.-Expresión de las citocinas en la mucosa gástrica antral 69
IV.5.1.- Análisis descriptivo y semicuantitativo 69
IV.5.1.1.- Localización de la inmunorreactividad para las citocinas 69
IV.5.1.2.- Patrón de distribución de la expresión de las citocinas 73
IV.5.1.3.- Porcentaje de positividad para las citocinas por grupos de pacientes..... 77
IV.5.1.4.- Grado de expresión para las citocinas por grupos de pacientes, de acuerdo al análisis semicuantitativo..... 80
IV.5.2.- Análisis cuantitativo de la inmunorreactividad para las citocinas 82
IV.5.3.- Correlación entre la expresión de las citocinas y los hallazgos histopatológicos..... 90
V.- Discusión 93
V.1.- Hallazgos endoscópicos en el tracto digestivo superior 94
V.2.- Hallazgos histopatológicos en la mucosa gástrica 99
V.3.- Expresión de las citocinas en la mucosa gástrica antral 101
VI.- Conclusiones 113
VII.-Bibliografía..... 115
VIII.-Anexos..... 134

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AIPC: actividad inflamatoria predominante en el corpus

ATPasa-H,K: enzima trifosfatasa de adenosina H,K

BabA: adhesina de *H. pylori*

CagA: proteína A del gen asociado a citotoxina

***Cag*-PAI:** isla de patogenicidad Cag de *H. pylori*

CMH: complejo principal de histocompatibilidad

CMN: célula mononuclear

CO_2: dióxido de carbono

Cox2: ciclooxigenasa 2

CPA: células presentadoras de antígenos

DC SIGN: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

dL: decilitros

E: epitelio de la mucosa gástrica

ETDS: endoscopia del tracto digestivo superior

FN-κβ: factor de transcripción nuclear κβ

g: gramos

GAI: gastritis autoinmune

GC: gastritis crónica

GCPC: gastritis crónica predominante en el corpus

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

GIMN: grado de infiltración mononuclear

GIPMN: grado de infiltración polimorfonuclear

Helm: helmintos

HKα: subunidad alfa de la ATPasa H,K

***HP*-NAP:** proteína activadora de neutrófilos de *H. pylori*

H. pylori* o *Hp: *Helicobacter pylori*

IFN-γ: interferón gamma

Ig: inmunoglobulina

IgAs: inmunoglobulina A secretora

IHQ: inmunohistoquímica

IL: interleucina

KDa: kilodalton

L: lámina propia del epitelio

LPS: lipopolisacárido bacteriano

MALT: tejido linfoide asociado a la mucosa

MAPKs: proteíncinasas activadas por mitógenos

MIP: proteína inflamatoria liberada por los macrófagos

mg: miligragos

NADPH (PHOX)

NK: células natural killer

OipA: proteína inflamatoria externa de *H. pylori*

OMP: proteína de membrana externa de *H. pylori*

ON: óxido nítrico

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PMN: polimorfonuclear

SabA: adhesina de unión al ácido siálico

sLe^{a}: antígeno Lewis a sialilado

sLe^{x}: antígeno Lewis x sialilado

STAT4: transductor de señal y activador de transcripción 4

TGF-β: factor de crecimiento transformante beta

TNF-α: factor de necrosis tumoral α

TLR: receptores tipo Toll

Treg: células T reguladoras

µL: microlitros

UreA: subunidad A de la enzima ureasa de *H. pylori*

UreB: subunidad B de la enzima ureasa de *H. pylori*

VacA: citotoxina vacuolizante de *H. pylori*

VCAM-I: molécula de adhesión celular vascular de tipo I

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

SUMMARY

CYTOKINES LOCAL EXPRESSION, GASTRIC MUCOSA INJURY DEGREE AND INTESTINAL HELMINTHS INFLUENCE IN *HELICOBACTER PYLORI*-INFECTED VENEZUELAN ADULTS

Helicobacter pylori *infection is associated to a variety of benign and malignant gastroduodenal features, in which the host immune response plays a crucial pathogenic role. During the last years, experimental and epidemiological evidences have been presented in favor of a possible role of intestinal helminths as modifiers of the Th1-predominant immune response triggered by* ***H. pylori*** *infection. However, this immunomodulatory effect has not been studied in humans, in regard to cytokines-dependant local immune response. The aim of the present research was to determine if helminths intestinal coinfection is associated to changes in proinflammatory and/or antiinflammatory cytokines local expression and the gastric mucosa injury degree, in individuals with gastritis associated to* ***H. pylori*** *infection. After applying strict inclusion and exclusion criteria, forty-six symptomatic adults from the Zulia State, northwest Venezuela, were selected, provided endoscopic evidences of gastropathy. They were classified into three groups, according to the status of* ***H. pylori*** *and helminths infections: Hp-/helm- (17), Hp+/helm- (18) and Hp+/helm+ (11). Each patient underwent an upper gastrointestinal endoscopy, histopathological analysis of gastric mucosal biopsies, and descriptive-semiquantitative and quantitative immunohistochemistry with peroxidasa staining, for detecting cytokines IL-1β, TNF-α, IFN-γ and IL-4, in paraffin sections of the antral gastric mucosa. The statistics Chi Square or Fisher Exact Test, Kruskal-Wallis Test, Mann-Whitney U and Spearman Correlation Coefficient were applied to determine the significance of findings ($p<0,05$). The expression of the 4 cytokines was identified in all the groups, predominantly in the epithelium and upper third of the mucosal lamina propria. In the control group (HP-) were evident: a low expression of all the cytokines, mild mucosal injuries and a scarce lymphoplasmacytic infiltration. In the group Hp+/helm-, a significant increase in the proinflammatory cytokines expression was evident, mainly IL-1β, without changes in the IL-4 expression degree, indicating a Th1-predominant immune response associated to* ***H. pylori*** *infection. Accordingly, a high percentage of such individuals presented active atrophic chronic gastritis and a risk index of gastric cancer relatively low, but significantly higher than the control*

group. In the helminths-coinfected group, IL-4 expression increased significantly, in conjunction with a negative regulation of the 3 proinflammatory cytokines, thus exhibiting the characteristic pattern of a Th2-predominant immune response. In the histopathological evaluation, mild changes were detected, more evident in the gastric corpus, tending to a minor grade of mononuclear cells infiltration, lower frequency of mucosal atrophy and decreased risk index of gastric cancer. In conclusion, intestinal helminths coinfection modulates the local cytokines response characteristically Th1-predominant in the gastric mucosa of humans ***H. pylori*** *infected, favoring the balance towards a Th2-predominant response. Possible favorable consequences of this immunomodulatory effect might be more evident in populations with a high risk of gastric carcinogenesis.*

Key Words: H. pylori*, intestinal helminths, cytokines, gastric mucosa, immunomodulation*

I. INTRODUCCIÓN

I.1.- Aspectos generales de la infección por *H. pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria Gram negativa, microaerofílica estricta, flagelada, con morfología de bacilo curvo o espiral, que coloniza en forma persistente la mucosa gástrica de más del 50% de la población humana a nivel mundial, causando una gastritis crónica tipo B en todos los individuos infectados **(Amieva et al., 2008).** En la mayoría de los pacientes la infección por *H. pylori* cursa asintomática, sin consecuencias clínicas adversas aparentes. Sin embargo, en ciertos grupos de individuos, la presencia de la bacteria en el ambiente gástrico se asocia al desarrollo de enfermedades más severas, como las úlceras pépticas gástricas o duodenales y los linfomas gástricos primarios tipo MALT (tejido linfoide asociado a la mucosa) **(Goodwin et al., 1986; Du e Isaccson, 2002; Atherton y Blaser, 2009).** En 1994, un grupo de trabajo internacional liderizado por la Organización Mundial de la Salud, clasificó a *H. pylori* como un carcinógeno tipo 1, es decir, un agente con capacidad definida para desencadenar cáncer en el humano, basándose en las evidencias que asocian a este patógeno con un riesgo incrementado de carcinogénesis gástrica **(IARC, 1994).** A este respecto, se ha estimado que la presencia del microorganismo se vincula con un aumento de 4 a 6 veces en el riesgo de adenocarcinoma gástrico y linfoma tipo MALT **(Kato et al., 2004)**.

Los estudios genéticos revelan que *H. pylori* ha coexistido con los humanos, al menos desde que tuvieron lugar las migraciones tempranas procedentes de África, hace más de 58.000 años **(Linz et al., 2007)**. Debido a la larga coexistencia del microorganismo con los humanos, se ha propuesto que la colonización bacteriana podría reportarle algún beneficio a su hospedador, proporcionándole algunas ventajas selectivas **(Atherton y Blaser, 2009).** Sin embargo, en el siglo actual, las infecciones por *H. pylori* son responsables por altas tasas de morbilidad y mortalidad, como consecuencia de las enfermedades úlcero-pépticas, los linfomas gástricos tipo MALT y los adenocarcinomas gástricos. A pesar de la tendencia a la disminución de la incidencia de cáncer gástrico observada durante los últimos años, éste se sitúa como el cuarto tipo de cáncer

más común, y representa la segunda causa de muerte por cáncer, con más de 700.000 fallecimientos anuales reportados a nivel mundial **(Polk et al., 2010).**

Además de su importante papel en la etiología de las enfermedades gastroduodenales benignas y malignas, la infección por *H pylori* ha sido vinculada, desde el punto de vista epidemiológico, con el desarrollo de patologías extradigestivas, como cardiopatía isquémica, enfermedades dermatológicas tipo rosácea y urticaria crónica. Aunque las evidencias presentadas hasta ahora al respecto no son concluyentes, algunos reportes sugieren que la erradicación de la bacteria del ambiente gástrico condiciona una mejoría evidente de estas enfermedades **(Yuan et al., 2010; Pellicano et al., 2009; Hergueta et al., 1998; Kolibasova et al., 1996)**. Del mismo modo, algunas investigaciones señalan que, en la población pediátrica, el microorganismo se comporta no solo como un patógeno gástrico, sino que puede desencadenar manifestaciones clínicas adicionales, tales como, anemia por deficiencia de hierro, déficit pondo-estatural, retardo del crecimiento, diarrea crónica y desnutrición **(Roma-Giannikou y Shchrbakov, 2002; Merino et al., 2002; Milman et al., 1998)**.

I.2.- Epidemiología de la infección por *H. pylori*

La prevalencia de la infección por *H. pylori* varía en forma acentuada entre los diferentes países, e inclusive, entre grupos poblaciones dentro de un mismo país. En líneas generales, tiende a ser mucho más alta en los países en desarrollo que en los países desarrollados, probablemente como una consecuencia de las diferencias en las condiciones de vida e higiene predominantes en cada uno de ellos **(Suerbaum y Michetti., 2002; Torres et al., 2003; Rothenbacher y Brenner, 2003; Frenck y Clemens, 2003).** La tasa de infección se incrementa con la edad, pero varía según la región estudiada. En los países en desarrollo, suele adquirirse durante la infancia temprana y su frecuencia es elevada en todos los grupos etarios. Las tasas elevadas de infección en la infancia en los países en desarrollo pueden explicar, al menos parcialmente, la elevada prevalencia de cáncer gástrico en esas localidades. En los países desarrollados, por el contrario, la prevalencia en niños es generalmente baja y se incrementa con la edad, alcanzando una tasa del 50-60% en las personas

mayores de 50 años **(Bruce y Maaroos, 2008; Merino et al., 2002)**.

Aunque los factores sociales o ambientales que predisponen a los individuos a contraer la infección no han sido suficientemente caracterizados, se ha propuesto que en las comunidades tropicales pueden combinarse factores demográficos y ambientales para contribuir a la propagación del microorganismo. De acuerdo al consenso de la mayoría de los autores, entre los factores relacionados con un mayor riesgo de adquisición de la infección se encuentran: el bajo estrato socioeconómico, el bajo nivel educativo, el hacinamiento, la convivencia con padres infectados, el estado nutricional deficiente, el consumo de agua no potable, la disposición inadecuada de excretas y la ingestión de alimentos crudos, entre otros **(Sabbi et al., 2012, Dore et al., 2001)**.

En Venezuela, las cifras de prevalencia de infección por *H. pylori* reportadas, presentan variaciones dependientes de la región, la edad, el nivel socioeconómico, el tipo de muestra, la técnica diagnóstica y la condición clínica del paciente. Sin embargo, la prevalencia general es alta, especialmente entre los grupos poblacionales pertenecientes a los estratos socioeconómicos bajos, independientemente de la edad **(Ortiz et al., 2001; Piñero et al., 2000)**. En la región andina, donde se registra la tasa de mortalidad por cáncer gástrico más alta del país (17,86 x 100.000 habitantes para el año 2009), se ha reportado una prevalencia de infección superior al 95% **(Muñoz et al., 2001; Muñoz et al., 1996)**. En un estudio nacional sobre infección por *H. pylori* realizado entre los años 1998 y 2000, que incluyó muestras de varias poblaciones venezolanas, se reportó una seroprevalencia promedio del 76% en individuos adultos no sintomáticos y del 82% en los sintomáticos, con cifras similares de infección activa. En niños, la seroprevalencia osciló entre el 50 y el 97%, dependiendo de la región **(Berroterán et al., 2001)**. En el año 2002, una investigación realizada en pacientes adultos sintomáticos del área urbana del Estado Zulia, reportó una seroprevalencia del 71,3%, y una prevalencia de infección activa del 53,8% **(Fuenmayor et al., 2002)**.

Un aspecto que parece estar claro en la epidemiología de la infección, es que las comunidades humanas representan el mayor foco para su diseminación ya que, hasta ahora, no se han detectado reservorios ambientales significativos

para el microorganismo. La distribución mundial de *H. pylori* y la elevada prevalencia que se reporta en la mayoría de las investigaciones, han despertado un intenso interés en el mundo científico por dilucidar los mecanismos implicados en la adquisición y diseminación de esta infección. Sin embargo, aun hoy es limitado el conocimiento referente a su modo de transmisión, lo que impide la aplicación exitosa de medidas preventivas **(Mohammed et al, 2010; Dowsett et al., 1999)**. Los datos disponibles sugieren que la transmisión ocurre de persona a persona y que ésta tiene lugar por la vía oral-oral o fecal-oral, probablemente a través del agua o los alimentos contaminados **(Hassan et al., 2012; Parsonnet 1999).** La hipótesis de la transmisión fecal-oral ha sido sustentada por el aislamiento de *H. pylori* a partir de heces humanas **(Hassan et al., 2012, Sathar et al., 1997)** y la detección, mediante PCR, de secuencias de ADN específicas de la bacteria en el agua de consumo **(Bellack et al., 2006, Makristathis et al., 2000; Glynn et al., 2002; Goodman y Correa., 1995)**. Por otra parte, la detección del microorganismo en la placa dental y la saliva de los pacientes infectados, constituye una evidencia a favor de la ruta de transmisión oral-oral **(Perrone et al., 2007; Perrone et al., 2006; Goodman y Correa, 1995)**. La identificación de cepas de *H. pylori* genéticamente similares entre los miembros de una misma familia sugiere la existencia de una fuente de infección común **(Tindberg et al., 2001; Wizla-Derambure et al., 2001)**. Algunas investigaciones han aportado evidencias a favor de la diseminación intrafamiliar del microorganismo, destacando la posibilidad de una transmisión de madre a hijo o entre hermanos **(Weyermann et al., 2006; Rothenbacher et al., 2002; Goodman y Correa, 2000, Miyaji et al., 2000**).

I.3.- *Helicobacter pylori* y Patología Gastroduodenal

En el ambiente gástrico, *H. pylori* suele encontrarse debajo de la capa de mucus que recubre el epitelio de la mucosa del estómago, en estrecha relación con el epitelio subyacente. Ocasionalmente, puede llegar a colonizar el duodeno o el esófago, en áreas de metaplasia gástrica epitelial. El microorganismo coloniza principalmente la mucosa no secretora de ácido y no suele encontrarse en aquellas regiones donde las células parietales sean numerosas, por lo tanto, se ubica con mayor frecuencia a nivel del antro y del cardias gástrico **(Hardin y Wright, 2002)**. Desde esa localización, desencadena un proceso inflamatorio agudo

difuso, que por lo general evoluciona hacia la cronicidad; cuya severidad y secuelas patológicas son determinadas por la combinación de los factores de virulencia de la bacteria, los factores genéticos del hospedador y una variedad de factores exógenos o ambientales.

I.3.1.- Infección aguda por *H. pylori*

Como se mencionó previamente, la colonización inicial por *H. pylori* generalmente ocurre durante la infancia, teniendo lugar solo ocasionalmente en individuos adultos. Por tal razón la información concerniente a la infección aguda es escasa, y está sustentada principalmente en los hallazgos procedentes de casos infectados experimentalmente. Las evidencias sobre este particular sugieren que, inmediatamente después de la infección, *H. pylori* desencadena una gastritis aguda, que al menos en los individuos adultos, puede estar acompañada de una sintomatología variable, que incluye dolor epigástrico, náuseas, malestar, eruptos, sensación de distensión abdominal y halitosis **(Robinson et al., 2007**).

Histológicamente, la gastritis se caracteriza por una fuerte infiltración de neutrófilos en la superficie del epitelio y en las glándulas, acompañada de cambios degenerativos epiteliales; la cual es seguida de una infiltración gradual por toda clase de células inflamatorias, especialmente linfocitos, que tiende a hacerse crónica o persistente **(Robinson et al., 2007)**. La fase inflamatoria aguda dura de 1 a 4 semanas y por lo general se acompaña de una hipoclorhidria aguda, debido a la reducción severa de la secreción ácida gástrica, cuyos niveles normales se restablecen en unas pocas semanas. Se ha demostrado que *H. pylori* interactúa con las células epiteliales mucosales productoras de ácido en el corpus gástrico, ejerciendo una inhibición significativa, pero de corto plazo, sobre la bomba de protones gástrica, un proceso que, indudablemente, facilita la colonización por el microorganismo **(Smolka y Backert, 2012)**.

Se ha demostrado que la inhibición aguda de la secreción ácida gástrica no es causada por ablación de las células epiteliales, las cuales suelen ser abundantes y funcionales en las biopsias gástricas de los pacientes con gastritis hipoclorhídrica epidémica. Tampoco es atribuible a la secreción neutrofílica de la

interleucina 1β (IL-1β), el inhibidor más potente de la secreción ácida gástrica conocido hasta ahora (cuya participación es importante en el desarrollo de la hipoclorhidria que acompaña, en algunos casos, a la infección crónica). La generación de la hipoclorhidria aguda transitoria parece tener lugar por la represión del promotor de la subunidad alfa (HKα) de la trifosfatasa de adenosina H,K (ATP-asa-H,K), la enzima de la célula parietal que media la secreción de ácido **(Smolka y Backert, 2012)**. En el mecanismo de represión del promotor de esa enzima, participa uno de los determinantes de patogenicidad más importante de *H. pylori*: el sistema de secreción tipo IV codificado por la isla de patogenicidad *cag*-PAI, y sus proteínas CagA y CagL.

La proteína CagL es reconocida por los receptores tipo integrinas presentes en las células epiteliales del hospedador, lo cual permite posicionar el pilus conformado por el sistema de secreción tipo IV para que tenga lugar la inyección de la proteína CagA y de un tripéptido glicosilado (GM3) derivado del peptidoglicano bacteriano, hacia el interior de la célula epitelial. Esto da lugar a la activación de rutas de señalización que conducen a la translocación nuclear del factor de transcripción κβ (FN-κβ), el cual se une al promotor del gen que codifica para HKα impidiendo su transcripción e inhibiendo así la síntesis de la enzima ATPasa-H,K. Adicionalmente, el FN-κβ activa en el núcleo la transcripción de algunos genes relacionados con inflamación, dando lugar a la síntesis de IL-8 y ciclooxigenasa 2 (Cox2) **(Smolka y Backert, 2012)**.

I.3.2.- Infección crónica por *H. pylori*

Una vez que se adquiere la infección y se establece la colonización por *H. pylori,* ésta suele persistir por décadas o durante toda la vida si no se administra un tratamiento específico para su erradicación **(Blaser y Atherton, 2004)**. La característica distintiva de esta infección persistente es una inflamación gástrica crónica, que involucra todos los tipos de células inflamatorias, pero particularmente linfocitos. En una proporción importante de los sujetos infectados, la gastritis suele ser activa, lo cual hace referencia a la presencia de neutrófilos entremezclados con las células mononucleares en la mucosa gástrica. Así, el patrón histológico predominante en la infección por *H. pylori* es una gastritis

crónica activa, caracterizada por una degeneración de la superficie epitelial, infiltración persistente de neutrófilos en el epitelio y en la lámina propia y una infiltración mononuclear (de linfocitos y células plasmáticas) en esta última **(Versalovic, 2003)**. El componente neutrofílico persistente puede ser importante en la patogénesis gástrica, por su contribución a la liberación de mediadores inflamatorios, como las especies reactivas del oxígeno **(Robinson et al., 2007)**.

La gastritis crónica resultante de la infección a largo plazo por *H. pylori* puede dar lugar a múltiples entidades patológicas, con diferentes fenotipos clínicamente importantes, los cuales parecen ser determinados principalmente por el patrón de inflamación que tenga lugar en el estómago **(Rubin, 1997; Faller y Kirchner, 2001)**. Así, en la mayoría de los individuos infectados por *H. pylori* (~80%), sin predisposición al desarrollo de enfermedad ulcero-péptica o atrofia gástrica, ocurre una pangastritis no atrófica, de grado leve. En estos pacientes *H. pylori* no causa síntomas y la infección puede persistir por largo tiempo sin mayores problemas. Sin embargo, en una proporción de los pacientes infectados (10-20%), la inflamación de la mucosa resulta más evidente y acentuada a nivel del antro gástrico (gastritis predominantemente antral), y suele acompañarse de hiperclorhidria gástrica, lo que predispone a la acidificación del duodeno y al desarrollo de úlceras en esa localización, que pueden curarse con tratamiento antimicrobiano **(El-Omar et al., 1995).** Finalmente, en un pequeño porcentaje de los individuos infectados (0,1-4%), se desencadena una pangastritis atrófica multifocal o una gastritis atrófica predominante en el cuerpo gástrico, que suele estar asociada con hipoclorhidria, metaplasia intestinal y escasas células inflamatorias **(El-Omar et al., 1997)**. Ambas formas de gastritis atrófica, así como la presencia de metaplasia intestinal, están asociadas con un riesgo mayor para el desarrollo de ulceración y adenocarcinoma gástricos, dependiendo de las circunstancias de la infección y de la respuesta inmunitaria individual frente a la bacteria **(Konturek et al, 2009; Uemura et al., 2001)**. También las gastritis granulomatosas y linfocíticas han sido relacionadas con la infección por *H. pylori* **(Cover y Blaser, 1992; Atherton et al., 1995).**

A pesar de que la úlcera duodenal y el cáncer gástrico comparten el principal agente etiológico (la infección por *H. pylori*), los fenotipos de ambas

enfermedades son marcadamente diferentes. Además, por lo general existe una relación inversa entre la incidencia de estas enfermedades, de manera tal que los pacientes con ulceración duodenal muy rara vez desarrollan adenocarcinoma gástrico, y viceversa. Una de las explicaciones más aceptadas hasta ahora, para el curso clínico divergente que puede tomar la infección por *H. pylori*, sugiere que la edad de adquisición de la atrofia gástrica, una lesión precursora del cáncer gástrico, constituye el factor más importante en determinar el riesgo de desarrollo de esta patología **(Graham, 2000)**. Ya con anterioridad se había sugerido que los individuos infectados durante la infancia temprana tienen un riesgo especial para el desarrollo de gastritis atrófica multifocal y adenocarcinoma gástrico subsiguiente **(Blaser et al., 1995)**. En este sentido, se ha planteado que cuando la infección por *H. pylori* se adquiere durante la infancia, pero la gastritis atrófica no se instala a una edad temprana, el individuo infectado secreta elevados niveles de ácido gástrico y, en consecuencia, puede desarrollar gastritis antral y úlcera duodenal durante la adolescencia o la juventud temprana. Entre los factores que parecen promover el desarrollo de úlcera duodenal se encuentran las drogas antiinflamatorias no esteroideas, el tabaco y la infección por cepas de *H. pylori* que portan el gen *dupA* (gen promotor de úlcera duodenal). Por el contrario, si la gastritis atrófica se instala a una edad temprana, disminuye la secreción ácida gástrica y puede llegar a instalarse un cáncer gástrico cuando el individuo alcanza una edad avanzada. Entre los factores que parecen promover el cáncer gástrico se han señalado el alto consumo de sal y de alimentos ahumados, la terapia supresora de ácido, los polimorfismos genéticos para las citocinas proinflamatorias y para el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la colonización por cepas de *H. pylori* portadoras del gen *homB* (que codifica para una proteína de membrana externa); mientras que los antiinflamatorios no esteroideos, y el consumo de frutas y vegetales frescos pueden inhibir el desarrollo de esta enfermedad. De esa manera, el cáncer gástrico y la úlcera duodenal pueden tener etiologías contrastantes y sus factores de riesgo pueden también ser contrastantes, a pesar de estar ambas enfermedades asociadas a la infección por *H. pylori*. Por tal razón, la coexistencia de esos desórdenes es inusual, ocurriendo sólo cuando interviene un factor no relacionado a la atrofia

mucosal, en cuyo caso, suele desarrollarse generalmente un cáncer gástrico de tipo difuso **(Ubukata et al., 2011)**.

I.3.3.- Cascada precancerosa gástrica

Como se mencionó anteriormente, en una pequeña proporción de individuos la infección gástrica por *H. pylori* se asocia al desarrollo de carcinoma gástrico de tipo intestinal. Desde 1975, Correa et al propusieron un modelo para explicar la patogénesis de este tipo de cáncer, considerado actualmente como el resultado final de una serie de cambios progresivos en la mucosa gástrica, cuyos pasos consecutivos son: mucosa gástrica normal → gastritis crónica no atrófica o superficial → gastritis atrófica multifocal sin metaplasia → metaplasia intestinal de tipo completa (intestino delgado) → metaplasia intestinal de tipo incompleta (colónica) → displasia de bajo grado (neoplasia no invasiva de bajo grado) → displasia de alto grado (neoplasia no invasiva de alto grado) → adenocarcinoma invasivo **(Correa y Piazuelo, 2012; Correa et al., 1975)**.

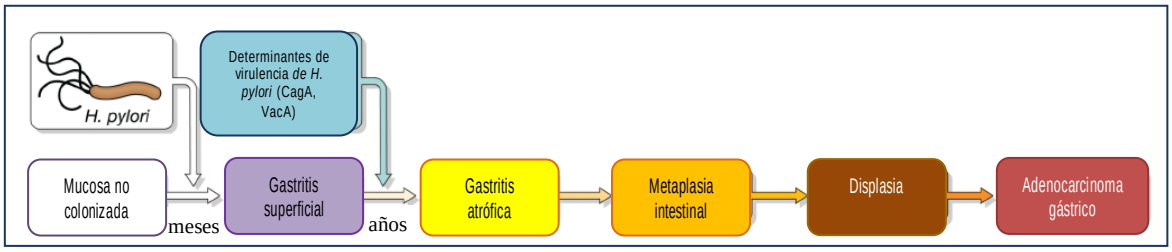


Figura 1: progresión a adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal. La colonización por *H. pylori* típicamente ocurre durante la infancia y conduce a una gastritis superficial. La presencia de genes como la isla de patogenicidad *cag y vac* que codifican factores de virulencia aumentan el riesgo de progresión de la atrofia gástrica al adenocarcinoma invasivo (Fuente: Peek et al., 2010).

La mucosa gástrica normalmente contiene sólo un pequeño número de células inflamatorias mononucleares dispersas. Como se mencionó anteriormente, la gastritis se caracteriza por la infiltración de la lámina propia con leucocitos mononucleares (inflamación crónica) y neutrófilos polimorfonucleares (inflamación aguda, también llamada actividad inflamatoria). La actividad inflamatoria usualmente se asocia a la infección por *H. pylori* en humanos. Tanto los leucocitos mononucleares como los polimorfonucleares pueden infiltrar el epitelio. Otra característica de la gastritis crónica asociada a *H. pylori* es la

presencia de agregados linfoides con centros germinales. Los cambios inflamatorios pueden persistir a través de todo el proceso precanceroso, pero su intensidad tiende a disminuir a medida que el proceso avanza. Dado que la infección inicial por *H. pylori* tiene lugar en una mucosa normal, con glándulas gástricas bien preservadas, por defnición tal gastritis es no atrófica y puede revertir con el tratamiento anti-*H. pylori*. De lo contrario, puede evolucionar en dos vías: permaneciendo como no atrófica o progresando en severidad hasta ocasionar daño a las glándulas gástricas. De esta dicotomía depende que la gastritis progrese a un proceso precanceroso o no, lo cual será determinado por la interrelación de tres grupos de factores etiológicos: los determinantes de virulencia del agente infeccioso, la susceptibilidad genética del hospedador y el ambiente externo. La gastritis no atrófica predominantemente antral se asocia al desarrollo de úlcera duodenal.

El progreso de la gastritis hacia la pérdida del tejido glandular normal, constituye el primer paso reconocible en la cascada precancerosa. Usualmente esto ocurre como resultado de un proceso inflamatorio prolongado. Los cambios atróficos tienden a ser multifocales, dando lugar a la también llamada gastritis atrófica multifocal, y pueden estar presentes en la mucosa del antro y el corpus gástrico. La pérdida de glándulas puede ir acompañada por fibrosis de la lámina propia. La atrofia gástrica predominante en el corpus gástrico se asocia al desarrollo de úlceras gástricas y cáncer gástrico.

Posteriormente, puede ocurrir un cambio fenotípico de las células epiteliales normales de la mucosa gástrica a un fenotipo intestinal, lo que recibe el nombre de metaplasia intestinal. Estas lesiones se consideran un estado avanzado de atrofia, debido a que las glándulas metaplásicas reemplazan a las glándulas originales. De acuerdo a la morfología de las células metaplásicas y a su perfil enzimático, la metaplasia intestinal puede ser de dos tipos: completa o de intestino delgado (en la que las células expresan el set completo de enzimas digestivas) e incompleta o de tipo colónica (en la que el set de enzimas digestivas desaparece parcial o totalmente). En general, la metaplasia intestinal se considera una condición que predispone a la malignidad, pero la presencia de metaplasia incompleta indica un mayor riesgo de cáncer.

El paso subsiguiente en la cascada precancerosa es la displasia, también llamada neoplasia intraepitelial o neoplasia no invasiva, la cual se caracteriza por un fenotipo neoplásico, tanto en términos de la morfología celular como de la arquitectura organizativa del tejido. Se observan núcleos hipercromáticos, agrandados, pero las células permanecen unidas a la membrana basal y las mitosis son frecuentes. Las glándulas adquieren una forma irregular, ocasionalmente bifurcada o ramificada y pueden desarrollar pseudopapilas. Esos cambios pueden mostrar una transformación gradual, desde un tejido bien diferenciado a uno pobremente diferenciado, lo cual se define como de bajo o alto grado, reflejando el riesgo de cáncer de cada fenotipo. Hasta este punto los estadios precancerosos pueden ser teóricamente explicados por mutaciones acumuladas en el ADN. Finalmente, se desarrolla el carcinoma invasivo, estadio en el cual ocurre la penetración de células neoplásicas en el estroma circundante, para lo cual las células adquieren la capacidad de degradar la matriz estromal que las rodea.

I.4.- Colonización por *H. pylori* y patogénesis

Como se mencionó anteriormente, la distribución intragástrica de la gastritis, y en consecuencia, el tipo de enfermedad gastroduodenal que se generará en respuesta a la infección por *H. pylori*, parecen depender de ciertos factores genéticos del hospedador, de los factores de virulencia bacterianos y de factores ambientales. Se ha demostrado que, tanto la acción bacteriana directa, como la respuesta inmunitaria del hospedador o su constitución genética, actúan en conjunto para desencadenar la inflamación crónica del estómago y para determinar el curso clínico que seguirá la infección **(Versalovic, 2003)**.

I.4.1.- Factores dependientes del microorganismo

Hasta ahora no se conocen con exactitud los detalles de los eventos tempranos que acompañan a la colonización por *H. pylori*, los cuales probablemente contribuyan a determinar el curso clínico de la infección. Sin embargo, gracias a las intensas y numerosas investigaciones realizadas sobre la patogenia de la infección (en casos de autoinfección; de infección accidental

durante labores profesionales; de infección experimental *in vivo* en voluntarios humanos y en modelos animales apropiados susceptibles a la infección, o *in vitro,* empleando células animales o humanas), se han dilucidado parcialmente algunos de los mecanismos por los cuales *H. pylori* es capaz de infectar crónicamente la mucosa gástrica humana **(Ruggiero, 2010)**.

Es indudable que el estómago constituye uno de los nichos más inhóspitos del cuerpo humano, debido a la acidez gástrica, que actúa como una primera línea de defensa, sumamente eficaz, contra los patógenos transmitidos por los alimentos. No obstante, *H. pylori* está bien equipado para adaptarse a ese ambiente hostil, gracias a un arreglo único de características que le permiten penetrar en el mucus gástrico, desplazarse y orientarse dentro de éste, adherirse a las células epiteliales, evadir la respuesta inmune del hospedador, y como resultado, colonizarlo en forma persistente y transmitirse a nuevos individuos susceptibles **(Suerbaum y Michetti, 2002)**.

Diversos factores parecen contribuir a la habilidad de *H. pylori* para sobrevivir y crecer en el estómago: i) su forma espiralada, que coadyuvada por su activa movilidad (debida a un penacho polar de flagelos adaptados al nicho gástrico) actúan como factores invasivos que facilitan su penetración en la capa de mucus hasta alcanzar la superficie epitelial; ii) su naturaleza microaerofílica, que le permite sobrevivir dentro del gel de mucus; iii) la alta producción de ureasa, una importante enzima que, a través de la generación de iones amonio, crea un microambiente alcalino alrededor del microorganismo que lo protege de la acidez gástrica, permitiendo su instauración y persistencia en la mucosa; iv) la producción de proteasas, lipasas, catalasa y superóxido dismutasa, así como la disponibilidad de factores de adherencia (hidrofobicidad, glicocálix y hemaglutininas) que contribuyen a la colonización **(Ruggiero, 2010; Fox y Wang, 2007)**.

Después de cruzar la capa de mucus, cierto número de adhesinas le permiten a *H. pylori* adherirse a las células epiteliales gástricas. Se ha propuesto que varias moléculas presentes en las células del hospedador actúan como receptores para la unión bacteriana, entre las que se incluyen los antígenos de grupo sanguíneo, las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de

clase II (CMH), los receptores tipo Toll (TLR) y el factor trébol gástrico TFF1 **(Ernst et al., 2006; Evans y Evans, 2000)**. Una parte de la población bacteriana permanece no adherida y en equilibrio con la población adherida, nadando en la capa de mucus, muy cerca de la superficie epitelial donde la acidez es menor. Para sobrevivir en el ambiente gástrico hostil y escapar a la respuesta inmune, *H. pylori* activa una serie de mecanismos que le permiten modificar el microambiente a favor de sus requerimientos, así como también afectar la actividad presentadora de antígeno y la actividad fagocítica **(Montecucco y Rappuoli, 2001)**. Una fase posterior de la estrategia de supervivencia de *H. pylori* puede estar representada por una posible localización intracelular, a nivel de la lámina propia gástrica, lo cual facilitaría su capacidad para ocasionar una infección persistente a lo largo de la vida del individuo, pues esta localización ofrecería protección a la bacteria contra el ataque del sistema inmunitario y contra la acción de los agentes antimicrobianos **(Dubois y Borén, 2007).**

Una vez que *H. pylori* se instala en la mucosa gástrica puede ocasionarle daño directamente, mediante la elaboración de una variedad de factores tóxicos capaces de provocar lesiones en el tejido al darle paso a importantes efectos inflamatorios; o indirectamente, desencadenando una respuesta inmunitaria que provoca efectos nocivos sobre la mucosa gástrica, y que a la vez resulta inapropiada para erradicar al microorganismo **(Ruggiero, 2010; Meyer et al., 2000).** A continuación se describen algunos de los principales factores dependientes del microorganismo, que participan en la colonización y que contribuyen a determinar la virulencia de la cepa infectante.

I.4.1.1.- Enzima Ureasa

Uno de los factores que más contribuye a la supervivencia de *H. pylori* en el nicho gástrico, es la secreción de la enzima ureasa, que constituye una fracción importante (mayor al 10%) del contenido proteico bacteriano total. La actividad enzimática de la ureasa de *H. pylori*, cataliza la conversión de urea a CO_2 y amonio, neutralizando así el ambiente ácido.

La enzima ureasa está formada por dos subunidades, UreA (27 KDa) y UreB (62 kDa). Se ha demostrado que en *H. pylori* y en *H. acinocychis* (un

patógeno gástrico felino), el heterodímero UreA+UreB de la ureasa se ensambla como una estructura dodecamérica, en la que los sitios activos convergen en un núcleo central, lo que le confiere una elevada estabilidad a valores de pH muy bajos; mientras que otras ureasas microbianas que se ensamblan en un trímero, suelen desnaturalizarse a niveles de pH inferiores a 5. Esto sugiere que la arquitectura de la enzima de *H. pylori* se ha adaptado para que el microorganismo pueda ajustarse a su nicho, desempeñando así un papel fundamental en la colonización **(Khan et al., 2009)**.

Además de esta función esencial para la bacteria, la ureasa actúa sobre las células del sistema inmunitario del hospedador, contribuyendo a las lesiones mucosales y al desarrollo de patología gástrica. Se ha demostrado que esta enzima estimula la activación y la adhesión de células inflamatorias a las lesiones gástricas y que además, activa a la sintetasa del óxido nítrico inducible por macrófagos, con la consecuente liberación de especies reactivas de oxígeno. La producción de amonio también contribuye al daño e inflamación del epitelio gástrico, interfiriendo con la retrodifusión normal de los hidrogeniones a través de la mucosa gástrica **(Ruggiero, 2010; Gobert et al., 2002)**. Se ha planteado que la ureasa de *H. pylori* podría también contribuir a la inflamación gástrica a través de la activación plaquetaria, sin embargo, esta hipótesis aún no ha sido demostrada *in vivo* **(Follmer C., 2010)**. Actualmente se reconoce que las plaquetas pueden modular la actividad de las células inflamatorias y actuar como un sitio de almacenamiento de sustancias vasoactivas y mediadores inflamatorios.

I.4.1.2.- Proteína activadora de neutrófilos de *H. pylori*: *HP*-NAP

La proteína *HP*-NAP consiste en monómeros de 17 KDa que se ensamblan para formar dodecámeros. *H. pylori* libera esta proteína, probablemente por autólisis, y luego ésta se une a la superficie bacteriana. La *HP*-NAP induce quimiotaxis y activación directa de neutrófilos y monocitos. De hecho, la infiltración de neutrófilos en la mucosa gástrica es una característica común en la infección por *H. pylori*. En los neutrófilos, la *HP*-NAP estimula la producción de intermediarios reactivos del oxígeno, promueve la adhesión a las células endoteliales, e induce la liberación de quimiocinas, incluyendo la interleucina 8

(IL-8), y las proteínas inflamatorias liberadas por los macrófagos 1α y 1β (MIP-1α y MIP-1β). La *HP*-NAP induce a los monocitos para liberar factor de necrosis tumoral α (TNF-α), IL-6 e IL-8, y promueve su maduración a células dendríticas. La *HP*-NAP estimula a los neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, para producir IL-12 e IL-23. *HP*-NAP ha sido identificada como el componente proteico de *H. pylori* con habilidad para estimular a los neutrófilos para liberar mieloperoxidasa, una enzima con potentes propiedades pro-inflamatorias, que puede contribuir directamente al daño tisular. La acción de *HP*-NAP sobre el reclutamiento de neutrófilos y monocitos es también indirecto, a través de la estimulación de células mastocitarias que producen IL-6 y TNF-α. Tales efectos, que pueden inducir inflamación gástrica local, son potenciados por el IFN-γ y el TNF-α, cuya producción está, de hecho, incrementada en la infección por *H. pylori.* Las actividades de *HP*-NAP, explican su papel preponderante en la respuesta Th1 que desarrolla el hospedador frente a la infección por *H. pylori* **(D´Elios et al., 2007; Windle et al., 2005).**

Los eventos que conducen a la actividad predominantemente TH1 inducida por *HP*-NAP pueden resumirse de la siguiente manera: la *HP*-NAP atrae y activa a los neutrófilos para producir IL-12 e IL-23, las cuales estimulan a los macrófagos y células dendríticas para que produzcan y liberen las mismas citocinas, dirigiendo las células T gástricas hacia la respuesta tipo Th1 **(D´Elios et al., 2007)**.

Una de las funciones fundamentales de la proteína *HP*-NAP podría ser contribuir a la supervivencia bacteriana, dando lugar a la liberación de nutrientes provenientes de los tejidos del hospedador, a través de todos los eventos inflamatorios que desencadena. Al mismo tiempo, los efectos inflamatorios ocasionados por *HP*-NAP pueden favorecer la degeneración de la mucosa del estómago **(Montecucco y De Bernard, 2003)**. Probablemente, *HP*-NAP juegue también un papel en la colonización por *H. pylori*, pues se ha demostrado que esta proteína es capaz de unir y condensar ADN a pH bajo, lo cual podría constituir un mecanismo reversible para proteger el ADN bacteriano del daño en el ambiente gástrico **(Ceci et al., 2007)**.

I.4.1.3.- Citotoxina vacuolizante: VacA

La toxina VacA es uno de los factores de *H. pylori* mejor caracterizados. Es una proteína altamente inmunogénica, secretada por todas las cepas de *H. pylori*, en mayor o menor grado. VacA consiste en oligómeros hexa o heptaméricos. Cada oligómero maduro de 88 KDa, consiste de dos motivos, originados por clivaje proteolítico, designados p33 y p55. Ambos dominios son necesarios para los efectos tóxicos de la proteína: el dominio p55 es necesario para la unión de la proteína a las células blanco, mientras que el dominio p33 desempeña un papel esencial en la internalización de la toxina **(Torres et al., 2005)**. La secuencia de VacA está bien conservada entre las diferentes cepas de *H. pylori*, sin embargo, algunos segmentos muestran variaciones alélicas: en el dominio p55, la región señal (s), puede presentar los alelos s1a, s1b, s1c y s2; en la región media (m), los alelos m1 y m2; mientras que en el dominio p33, la región intermedia (i), puede presentar los alelos i1 e i2. Los alelos m2 se asocian más frecuentemente con s2 y dan lugar a una secreción escasa de la toxina, por lo que las cepas que expresan estos alelos están limitadas en su capacidad para provocar daño mucosal inducido por VacA. Por otra parte, la forma s1m1 de VacA, que está presente en aproximadamente el 50% de las cepas de *H. pylori*, se asocia a un curso patológico más severo, siendo su frecuencia muy alta en los pacientes con úlcera duodenal, gastritis atrófica y cáncer gástrico **(Polk y Peek, 2010)**. Recientemente se ha reportado también una asociación entre el alelo VacA tipo i1 y adenocarcinoma gástrico **(Rhead et al., 2007)**.

La proteína VacA induce vacuolización masiva de las células epiteliales *in vitro*; alteraciones morfológicas y funcionales de los endosomas y lisosomas, formación de canales de membrana anión-selectivos permeables a la urea y difusión de esta última a través del epitelio (una función que podría ser ventajosa para la supervivencia de *H. pylori*, al garantizar el sustrato para la ureasa). VacA también podría contribuir a la supervivencia de *H. pylori* afectando la presentación y el procesamiento de antígenos **(Ruggiero, 2010)**. VacA también puede favorecer la supervivencia intracelular de *H. pylori*, contribuyendo con el mantenimiento de un reservorio intracelular de bacterias vivas, protegidas de la respuesta inmunitaria y de la acción de los antimicrobianos, a través del secuestro de las

formas activas de la pequeña GTPasa Rab7 en el compartimiento vacuolar, por mecanismos aun desconocidos, promoviendo la fusión posterior de los compartimientos endosomales **(Terebiznik et al., 2006)**.

Adicionalmente, VacA inhibe la activación y la proliferación de los linfocitos T, tiene actividad quimiotáctica sobre células mastocitarias, e induce la producción de varias citocinas, entre ellas TNFα, MIP-1α, IL-1β, IL-6, IL-10 e IL-13 **(Boncristiano et al., 2003)**. Se ha sugerido que la respuesta temprana del hospedador para intentar eliminar la bacteria, podría estar basada en la activación de las células mastocitarias atraídas por VacA, lo que a su vez contribuiría a la patogénesis de la gastritis inducida por *H. pylori. In vitro*, las células mastocitarias son capaces de fagocitar y destruir directamente a *H. pylori*, por lo que se ha propuesto, que la actividad de VacA sobre los linfocitos T y las células mastocitarias, podría ser parte de la estrategia bacteriana para mantener la reacción del sistema inmune dentro de límites que no amenacen la persistencia de la colonización **(Ruggiero, 2010).**

VacA también es capaz de inducir autofagia (autofagosomas) en algunas líneas celulares, y probablemente este sea uno de los mecanismos por los cuales las células infectadas limitan el daño celular inducido por la citotoxina **(Terebiznik et al., 2006)**. Se ha sugerido que las rutas autofágicas inhiben la activación de los inflamasomas, los cuales controlan la maduración y la secreción de citocinas inflamatorias potentes; por lo tanto, en el caso de la infección por *H. pylori*, la autofagia podría ser parte del mecanismo que intenta mantener bajo control el desarrollo de la inflamación **(Schroder y Tschopp, 2010).**

I.4.1.4.- Gen asociado a citotoxina de la isla de patogenicidad *cag*-PAI

Las cepas de *H. pylori* pueden ser divididas en dos categorías principales: cepas tipo I y cepas tipo II. Las cepas tipo I, que constituyen la mayoría de los aislamientos clínicos de *H. pylori*, contienen en su genoma la isla de patogenicidad *cag*-PAI asociada a citotoxina, y expresan la proteína CagA. Estas cepas generalmente portan el alelo s1 de VacA, y suelen asociarse a un curso clínico más severo, como úlcera péptica y cáncer gástrico **(Palli et al., 2007; Blaser y**

Atherton, 2004). Las cepas tipo II, *cag* negativas, generalmente portan el alelo s2m2 de VacA, inducen menor inflamación y menor daño tisular que las cepas tipo I, y suelen estar presentes en pacientes con gastritis asintomática **(Blaser y Atherton, 2004)**. La adquisición de la isla de patogenicidad *cag*-PAI por parte de *H. pylori*, durante su evolución, podría haber representado un paso muy importante en su transformación de un simple comensal o un huésped moderadamente peligroso, hacia un patógeno insidioso. La adquisición de *cag*-PAI podría también haberle conferido a las cepas de *H. pylori*, habilidad para provocar un estado inflamatorio que favorece la obtención de nutrientes a partir del tejido del hospedador **(Ruggiero, 2010)**.

La isla *cag*-PAI abarca un conjunto de genes (aproximadamente 31), incluyendo el gen asociado a citotoxina *cagA*, que codifica para la proteína CagA **(Censini et al., 1996)**. CagA es altamente inmunogénica, tanto a nivel celular como humoral, y debido a ese potencial se ha considerado como un marcador de infección severa. Otro grupo de genes en *cag*-PAI codifican para proteínas que constituyen un sistema de excreción tipo IV, que actúa como una especie de jeringa molecular especializada para exportar moléculas bacterianas efectoras hacia el citoplasma de las células del hospedador. Este sistema secretor es capaz de translocar la proteína CagA hacia el interior de las células eucariotas, donde es fosforilada (por enzimas Src cinasas) en motivos de fosforilación de tirosina repetitivos (EPIYA) localizados en su región C-terminal **(Stein et al., 2000)**. La translocación y fosforilación de CagA son seguidas por la inducción de la producción de grandes cantidades de la citocina proinflamatoria IL-8 por las células epiteliales, activación de NF-κB, cambios en el citoesqueleto y formación de pedestales celulares **(Stein et al., 2000)**. Al parecer, *H. pylori* utiliza a CagA para adherirse cerca de las uniones intercelulares y alterar la organización y el funcionamiento del complejo de unión apical de las células epiteliales, afectando la diferenciación y el comportamiento del epitelio **(Amieva et al., 2003)**. Las propiedades de CagA podrían explicar la asociación entre la infección por cepas CagA positivas y el desarrollo de patología gástrica severa, y proporciona algunas evidencias sobre los mecanismos tempranos de la carcinogénesis inducida por *H. pylori* **(Bagnoli et al., 2005)**.

Recientemente, se ha descrito que CagA media, junto con VacA, la autofagia de las células monocíticas inducida por *H. pylori* **(Wang et al., 2009)**. CagA muestra cierta variabilidad, particularmente en el número y posición de los sitios para la de fosforilación de tirosina, que están fuertemente asociados con la etnicidad del hospedador y con el curso patológico de la infección. La asociación con la etnicidad sugiere una fuerte selección positiva **(Atherton y Blaser, 2009)**. Varios estudios han demostrado que las cepas bacterianas que producen una CagA con mayor número de sitios de fosforilación, están más estrechamente relacionadas con atrofia y cáncer gástrico que las cepas que poseen una CagA con pocos sitios de fosforilación **(Robinson et al., 2007)**.

El sistema de secreción tipo IV de *H. pylori* es también capaz de translocar el peptidoglicano bacteriano al interior de las células del hospedador, iniciando una respuesta proinflamatoria, puesto que éste es reconocido por las moléculas de reconocimiento de patógenos intracelulares Nod1, las cuales estimulan señales en cascada que permiten la activación de factores de transcripción (como el NF-κB), que a su vez favorecen la síntesis y la secreción de mediadores de inflamación, entre ellos la IL-8. El efecto combinado de *cag*-PAI sobre la actina del citoesqueleto y la respuesta proinflamatoria de las células desempeñan un papel muy importante en la patogénesis asociada a la infección **(Romero-Adrián et al., 2010)**.

I.4.1.5.- Proteínas de membrana externa: OMP

Entre las proteínas de membrana externa de *H. pylori* que desempeñan funciones relevantes en su patogenicidad se encuentran las adhesinas. Una adhesina particularmente importante es BabA, la cual se une al antígeno Lewis b (Leb) y a los antígenos de grupo sanguíneo ABO fucosilados, que son expresados por las células epiteliales. La presencia del gen *bab*A2, que codifica la forma activa de BabA, generalmente se asocia a la presencia de *cag*-PAI, y por lo tanto, a un curso clínico más severo de la infección (ulceración duodenal y cáncer gástrico) **(Robinson et al., 2007)**. La asociación de *bab*A con *cag*-PAI hace difícil discriminar el papel que juega cada una de estas proteínas en la patogénesis de las lesiones inducidas por *H. pylori*.

Otra OMP interesante es la proteína inflamatoria externa (OipA), cuya expresión se ha correlacionado con la habilidad del microorganismo para inducir IL-8. Esta proteína también parece participar en la adherencia bacteriana y en la adaptación al microambiente del hospedador. Además de la inducción de IL-8 por mecanismos aun desconocidos, las cepas *oip*A positivas producen una colonización densa que puede conducir a respuestas inflamatorias gástricas incrementadas, que explicarían la asociación de OipA con enfermedades gástricas, especialmente ulceración duodenal y cáncer gástrico. Sin embargo, de manera similar a lo que ocurre con *bab*A, *oip*A está asociado con *cag*-PAI, lo que dificulta determinar la influencia de la proteína OipA en la respuesta inflamatoria gástrica **(Dossumbekova et al., 2006)**.

Se ha reportado que otra proteína, la OMP18, es capaz de activar células dendríticas, iniciando una respuesta inmunitaria de tipo Th1, caracterizada por la secreción de niveles importantes de IL-12. Las células dendríticas activadas por la OMP18 también inducen proliferación y liberación de IFN-γ por los esplenocitos singénicos **(Rathinavelu et al., 2005)**.

Por su parte, la adhesina de unión al ácido siálico (SabA), la cual media la unión a los antígenos Lewis x y a sialilados (sLe^x y sLe^a), es otro miembro de las OMP de *H. pylori* que se cree contribuye a la virulencia y la cronicidad de la infección, provocando una respuesta inflamatoria que se asocia a metaplasia intestinal, atrofia gástrica y cáncer gástrico **(Yamaoka, 2008)**. La habilidad de *H. pylori* para adherirse a los glicoconjugados sialilados que son expresados durante la inflamación crónica, podría contribuir a la virulencia y la cronicidad de la infección. La adherencia mediada por sLe^x es débil, y sufre procesos de encendido/apagado, lo cual puede beneficiar a *H. pylori* en los estadios tardíos de la infección, al permitirle escapar de aquellos sitios donde la respuesta bactericida defensiva del hospedador sea más vigorosa **(Yamaoka, 2008)**. La presencia de *sab*A está relacionada con *cag*-PAI y *bab*A.

I.4.1.6.- Lipopolisacárido bacteriano

El lipopolisacárido (LPS) de *H. pylori* posee una estructura peculiar, que le

confiere un efecto endotóxico y una actividad biológica relativamente baja, en comparación con el LPS de otras bacterias gramnegativas **(Moran et al., 1997).** La mayoría de las cepas de *H. pylori* presenta antígenos de grupos sanguíneos Lewis en sus moléculas de LPS, similares a los expresados por las células de la mucosa gástrica humana. La expresión bacteriana de estos antígenos presenta variaciones de fase; por lo tanto, suelen existir dos poblaciones diferentes dentro de una misma cepa infectante de *H. pylori.* Gracias a ello, el LPS es capaz de realizar una modulación inmune compleja, ejercida a través de la interacción de las variantes de fase con un receptor de superficie presente en las células dendríticas, una lectina no integrina, conocida como molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas (DC-SIGN). La unión a DC-SIGN depende de la presencia y estructura de unas moléculas que contienen fucosa, en el LPS bacteriano. Una población es capaz de unirse a DC-SIGN, conduciendo a un bloqueo en el desarrollo de las células T nativas hacia células Th1. Por el contrario, la otra población no es capaz de unirse a DC-SIGN, lo que conduce a la diferenciación de las células T nativas en células TH1. La coexistencia de esas dos variantes de fase, podría promover un balance particular entre células Th1 y Th2, de manera que, junto a otros factores de *H. pylori* que tienen propiedad inmunomoduladora, facilitarían la colonización persistente, limitando los daños causados al hospedador **(Bergman et al., 2006)**. En efecto, se ha demostrado que al desencadenarse una fuerte respuesta Th1, tiene lugar un daño severo en el tejido mucosal gástrico del hospedador, con la consecuente destrucción del nicho de *H. pylori*. De esta manera, la habilidad para modular la respuesta inmunitaria Th1/Th2, le confiere a *H. pylori* una ventaja selectiva para la coevolución con su hospedador **(Bergman et al., 2004)**. Se ha propuesto que, en estadios tempranos de la colonización, el hospedador podría seleccionar positivamente las variantes de fase de *H. pylori* que garanticen el balance Th1/Th2 adecuado, favoreciendo el crecimiento selectivo de una variante y, en consecuencia, la colonización persistente **(Bergman et al., 2006; Bergman et al., 2004).** Es evidente que, durante la colonización, *H. pylori* evoluciona continuamente y mantiene cierto grado de microdiversidad, con el fin de retener la habilidad para adaptarse rápidamente a los cambios ambientales que pueden tener lugar en el estómago de su hospedador **(Nilsson et al., 2008).**

I.4.1.7.- Proteínas de reacción cruzada con la ATPasa H^+, K^+

Después de la colonización crónica por *H. pylori*, pueden producirse autoanticuerpos que reaccionan en forma cruzada con la bomba de protones de las células gástricas secretoras de ácido (ATPasa H^+, K^+), contribuyendo a la destrucción glandular y a la exacerbación de la inflamación gástrica, lo que da lugar a características clínicas similares a las de la gastritis autoinmune (GAI). **(Bergman et al., 2006)**. De hecho, en la mucosa gástrica de algunos pacientes con GAI, infectados por *H. pylori*, se han detectado células T activadas, reactivas tanto a las ATPasas H^+, K^+ como a *H. pylori* **(Amedei et al., 2003)**. El hallazgo de que la infección por *H. pylori*, a través del mimetismo molecular, podría tener impacto sobre los mecanismos de inducción y mantenimiento de la GAI atrófica, aportaría nueva luz sobre la necesidad de tratar la infección por este microorganismo **(D´Elios et al., 2004).**

I.4.2.- Factores dependientes del hospedador

I.4.2.1.- Respuesta inmunitaria contra patógenos bacterianos: aspectos generales

La respuesta immunitaria frente a los patógenos bacterianos puede dividirse en respuesta innata y respuesta adquirida o adaptativa. La respuesta innata hacia la infección bacteriana generalmente es un proceso inicial inespecífico, que no requiere la exposición previa al estímulo inmune; en el cual el organismo reacciona rápidamente contra varias moléculas bacterianas para dar la señal de que existe un peligro infeccioso y activar los mecanismos para destruir la bacteria. El sistema inmunitario innato representa la primera línea de defensa en la respuesta frente a patógenos. En contraste, la respuesta inmunitaria adaptativa constituye la respuesta predeterminada a un estímulo inmunológico identificado previamente. Es una respuesta más retardada, es antígeno-específica, conduce a la activación de células T, B y de memoria, y es dirigida por la respuesta inmunitaria innata. Las líneas divisorias entre la inmunidad innata y la adaptativa son borrosas, por las estrechas interacciones entre sus rutas; de manera que la estimulación de las células dendríticas y los macrófagos presentadores de antígenos, conducen a la activación y el reclutamiento de linfocitos, y al desarrollo

de la respuesta específica de células T-helper (Th) **(Wilson y Crabtree, 2007).**

Clásicamente, la diferenciación de las células Th involucra una expansión clonal que compromete a los receptores de células T. Las células Th pueden diferenciarse en dos clases funcionales principales, conocidas como células Th1, productoras de un grupo de citocinas entre las que se incluye el IFN-γ y la IL-2; y células Th2, las cuales producen citocinas tales como IL-4, IL-5, IL-10, e IL13. Las células Th1 dan lugar a la inmunidad mediada por células, la cual es importante en la protección contra gérmenes intracelulares; mientras que la respuesta Th2 se asocia con inmunidad humoral y protección contra microbios extracelulares, como por ejemplo, los helmintos intestinales **(Wilson y Crabtree, 2007).**

I.4.2.2.- Respuesta immunitaria contra *H. pylori*

En el caso de la infección de la mucosa gástrica por *H. pylori,* la gastritis resultante es desencadenada por una variedad de factores bacterianos que estimulan la activación de las células epiteliales, los macrófagos y las células dendríticas, así como también por una respuesta de linfocitos Th1-predominante **(Portal-Celay y Pérez-pérez, 2006)**.

I.4.2.2.1.- Inmunidad innata

Los antígenos derivados de *H. pylori* son reconocidos por receptores tipo Toll (TLR) y Nod, expresados por las células presentadoras de antígenos (CPA) pertenecientes a la inmunidad innata, tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas y células epiteliales. La activación de tales receptores genera la respuesta inmunitaria adaptativa, tanto humoral como celular, puesto que los macrófagos y las células dendríticas activados, a su vez permiten la activación y el reclutamiento de linfocitos y el desarrollo de células T-helper **(Romero-Adrián et al, 2010).** El contacto de la bacteria con los monocitos y otras CPA conduce a la secreción de citocinas proinflamatorias, tales como TNF-α, IL-1β e IL-8. Tales citocinas actúan como quimiotácticos locales, induciendo la infiltración de granulocitos **(Portal-Celay y Pérez-Pérez, 2006; Crabtree (a), 1996)**.

Adicionalmente, varios estudios han demostrado que el contacto entre *H. pylori* y las células epiteliales gástricas da lugar a una activación rápida del factor de transcripción nuclear kappa-β (NF-κβ), lo cual es seguido por un incremento en la expresión de IL-8 en la mucosa colonizada **(Keates et al., 1997)**. A la expresión de esta citocina contribuyen también las proteincinasas activadas por mitógenos (MAPKs), a través de la vía de activación de MAPKs AP-1. La activación sinérgica de ambos factores dentro del promotor de IL-8, conduce a la producción máxima de la citocina IL-8 en respuesta a la infección **(Aihara et al., 1997)**. La producción de IL-8 por las células epiteliales conduce al reclutamiento de neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares), los cuales pueden fagocitar las bacterias opsonizadas y producir especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.

I.4.2.2.2.- Inmunidad adaptativa

Como respuesta a la infección se desencadena una vigorosa respuesta inmunitaria local y sistémica, tanto a nivel de células T como de células B, lo cual se manifiesta en la producción de citocinas/quimiocinas y anticuerpos. Sin embargo, esta respuesta suele ser ineficaz para erradicar al microorganismo. *H. pylori* parece haberse adaptado, al menos parcialmente, para evadir, e incluso manipular, la respuesta inmunitaria, con el fin de evitar, tanto su eliminación por parte del hospedador, como provocarle a éste un daño excesivo, promoviendo así una coexistencia relativamente pacífica. Esto contribuye a su supervivencia y a su extraordinaria persistencia a lo largo de la vida del individuo. Sin embargo, existen numerosas evidencias de que la respuesta inmunitaria adquirida, por sí misma, contribuye al proceso de la enfermedad gastroduodenal **(Robinson et al., 2007)**.

I.4.2.2.2.1.- Respuesta inmunitaria celular

La infección por *H. pylori* da lugar a una inflamación gástrica continua en casi todos los individuos afectados. En la fase aguda de la infección predomina la infiltración neutrofílica, mientras que en el estadio crónico la infiltración es linfocítica (células T y B), plasmática, macrofágica y eosinofílica, dando lugar a grados variables de lesión y degeneración de las células epiteliales **(Goodwin et al.,**

1986). Debido a que *H. pylori* rara vez invade la mucosa gástrica, la respuesta del hospedador se desencadena inicialmente por la unión de la bacteria a las células epiteliales. El microorganismo produce una variedad de sustancias antigénicas, tales como la proteína del shock térmico, la ureasa y el LPS, las cuales son captadas y procesadas por los macrófagos de la lámina propia para activar células T **(Di Tommaso et al., 1995)**. Las alteraciones celulares, especialmente en las adyacencias de las uniones estrechas entre las células epiteliales, incrementan la presentación de antígenos en la lámina propia y facilitan la estimulación del sistema inmunitario. El resultado neto es un incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias, tales como IL-1, IL-6, TNF-α y, más notablemente, IL-8 **(Crabtree (b), 1996; Fan et al., 1995)** (**Figura 1**).

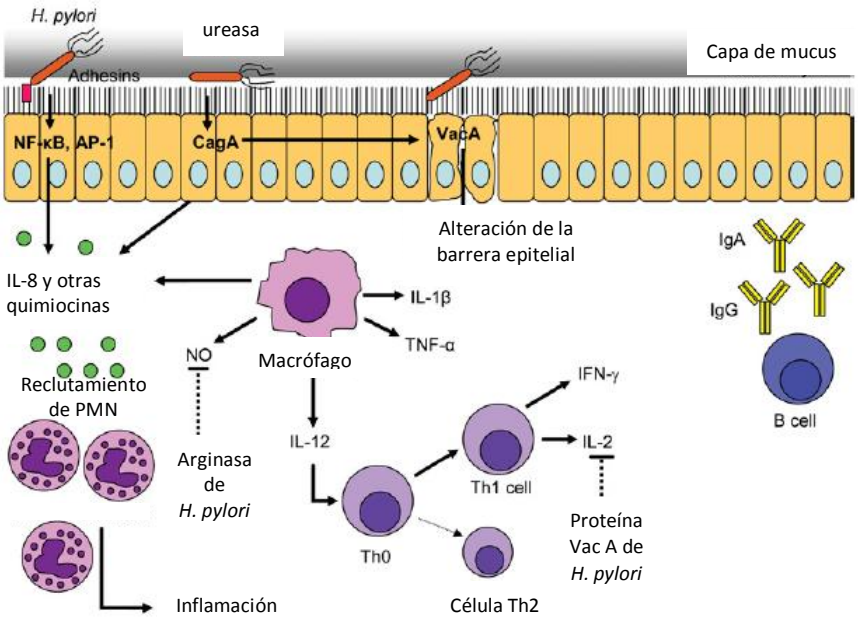


Figura 1: Patogénesis de *H. pylori* y respuesta inflamatoria. *H. pylori* reside fundamentalmente en el lumen gastrico y coloniza el epitelio gástrico ayudado por la ureasa. La unión del microorganismo a las células epiteliales y la inyección de CagA estimula la producción de IL-8 y otras quimiocinas, y la activación de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo. Tales respuestas contribuyen a la inflamación por el reclutamiento de neutrófilos y la activación de linfocitos TCD4+ hacia el fenotipo predominantemente Th1 con producción de IFN-γ. (Fuente: Portal-Celay y Pérez-Pérez, 2006).

La gastritis crónica activa está asociada con un radio de células T CD4/CD8 aumentado dentro de la mucosa gástrica, debido a la acumulación de linfocitos T cooperadores CD4+ en la lámina propia. Así, la infección por *H. pylori* da lugar a

una respuesta inmunitaria Th1- predominante en la mucosa gástrica, caracterizada por la inducción de IFN-γ, niveles elevados de las citocinas proinflamatorias IL-2, IL-12, IL-18 y TNF-α **(Tummala et al., 2004)**, y niveles muy bajos de IL-4 e IL-5 **(Portal-Celay y Pérez-Pérez, 2006; Karttunen et al, 1995)**.

Las células T tienen una amplia participación en la respuesta inmunitaria contra *H. pylori*. Además de su participación en la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica ante la infección, algunas investigaciones han sugerido que algunas células T reguladoras específicas (Treg) pueden ejercer un efecto supresor sobre las células T de memoria; de esta manera contribuyen a la persistencia del patógeno y participan en la patogénesis de la infección. Por otra parte, las células Treg que expresan CD25 y Foxp3 participan en la respuesta inmunitaria adaptativa contra *H. pylori*, suprimiendo la activación excesiva de CD4+ y CD8+ para controlar la inflamación gástrica y la colonización persistente por la bacteria **(Romero-Adrián et al, 2010).**

Las células T cooperadoras de tipo 17 son consideradas un nuevo grupo que contribuye a la defensa de la mucosa del hospedador, mediante la producción de IL-8 y del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), ambos con efecto quimiotáctico para los granulocitos. Las células Th17 también secretan las citocinas IL-22, TNF-α, IL17A, IL-17F, IL-6 e IL-26, las cuales actúan sobre células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales y macrófagos. Esto determina la secreción de otras citocinas, quimiocinas, sintetasa-2 de óxido nítrico, metaloproteinasa-3 y factor estimulante de colonias, que en conjunto dan lugar al reclutamiento de granulocitos, los cuales juegan un papel muy importante, no sólo en la protección contra las bacterias extracelulares, sino también en el reclutamiento de macrófagos y en el establecimiento de la inflamación crónica **(Romero-Adrián et al, 2010).**

Algunos investigadores atribuyen el predominio de un patrón de citocinas Th1, Th2, o Th0, a la existencia de una diversidad de factores, entre los cuales se incluyen: el agente etológico y su inmunogenicidad, el tipo de patología, la fase de la entidad clínica, las infecciones o infestaciones concurrentes, la condición genética del hospedador, y la suficiencia o insuficiencia de su sistema

inmunitario. A continuación se discuten las principales citocinas asociadas a la infección por *H. pylori*, las proteínas que regulan su actividad biológica y sus alteraciones debidas a la presencia de la infección bacteriana.

La IL-1 y el TNF-α se encuentran entre los inductores de respuesta más importantes en la fase aguda, en la cual los hepatocitos producen grandes cantidades de ciertas proteínas plasmáticas (proteína C reactiva, fijadores de manosa, entre otras) consideradas importantes para la defensa contra las infecciones. Sus efectos a este respecto son superados por la IL-6. Los macrófagos están involucrados en amplificar la respuesta inflamatoria debida a la producción de esas proteínas **(Barksby et al., 2007; Heinrich et al., 2003; Bossen et al., 2006)**. Esas citocinas están presentes en la inflamación gástrica inducida por *H. pylori*, con la participación de otras proteínas reguladoras como el IFN-γ y la IL-12, y tienen efecto sobre la secreción local de ácido y la distribución de la colonización bacteriana. Además, la sobreexpresión de IL-1β contribuye al desarrollo de cáncer gástrico. La IL-1β representa la citocina proinflamatoria más temprana e importante en el contexto de la infección por *H. pylori* y es también el más poderoso inhibidor de la secreción de ácido conocido hasta ahora **(El-Omar, 2001)**.

La IL-2 es producida por las células Th1 TCD4+, los linfocitos TCD8+ y las células NK. Es una de las citocinas inmunoreguladoras más importantes debido a sus efectos sobre la proliferación de células T, la activación de linfocitos B, de macrófagos y de células NK **(Ma et al., 2006)**. En la infección por *H. pylori*, el incremento continuo y significativo de la IL-2 podría activar neutrófilos, estimular la actividad antimicrobiana, la citotoxicidad de macrófagos y promover la secreción de citocinas de fase aguda tales como TNF-α e IL-6. Esos efectos biológicos podrían amplificar el proceso inflamatorio asociado a la infección **(Romero-Adrián et al., 2010)**.

Por otra parte, se ha propuesto que *H. pylori* puede inhibir la proliferación de linfocitos. Este efecto, así como también la inhibición de la secreción de IL-2 por las células T ha sido atribuido a una regulación negativa ejercida por la proteína VacA de *H. pylori* sobre la activación y la translocación del factor nuclear de

transcripción de las células T activadas (**Romero-Adrián et al., 2010**).

La IL-8 es una quimiocina CXC que atrae diferentes tipos celulares: neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos T, células NK, entre otros. Estimula la degranulación de células, los efectos antimicrobianos de los neutrófilos, y la angiogénesis. Esta citocina juega un papel muy importante en la activación y el reclutamiento de neutrófilos en respuesta a la infección por *H. pylori*. Es producida principalmente por las células epiteliales de la mucosa gástrica y su expresión es estimulada particularmente por las cepas *cag*-PAI positivas. La colonización produce estrés oxidativo local y las especies reactivas del oxígeno modulan la secreción de IL-8 por parte de las células epiteliales gástricas **(Chu et al., 2003; Crabtree et al., 1995)**.

La IL-10 es producida por los linfocitos Th0, Th1 y Th2, las células TCD8+, los monocitos, los queratinocitos y las células B activadas. Esta citocina puede inhibir el desarrollo de células Th1 actuando sobre las células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T productores de IL-10 son importantes en el control de la inflamación inducida por *H. pylori* y facilitan la persistencia de la bacteria en la mucosa gástrica **(Commins et al., 2008; Ismail et al., 2003)**.

La IL-12, anteriormente denominada factor de maduración de linfocitos citotóxicos o factor estimulante para células NK, es producida por las células presentadoras de antígenos, tales como los linfocitos B, los macrófagos y las células dendríticas. Promueve la proliferación de linfocitos T y de células NK activadas, incrementando la actividad lítica de estas últimas. Permite la diferenciación de células T CD4+ en células Th1, a la vez que suprime Th2. La IL-12 induce la producción de GM-CSF, TNF, IL-6, y en menor cantidad IL-2, con las cuales actúa sinérgicamente **(Brunda, 1994).**

El encuentro de la bacteria con los monocitos y las células dendríticas en la mucosa gástrica, estimula la liberación de IL-12, la cual puede activar otras células vecinas. La activación sinérgica de las células NK por ciertos componentes bacterianos y por concentraciones fisiológicas de IL-12 asegura una activación y secreción eficiente de IFN-γ por las células NK. El acoplamiento de la IL-12 con su receptor permite la fosforilación de STAT4 y la producción de

IFN-γ **(Bacon et al., 1995)**.

La *HP*-NAP de *H. pylori* contribuye a la polarización TH1 debido a la estimulación de la secreción de IL-12 e IL-23 por neutrófilos y monocitos. La IL-12 ha sido relacionada al desarrollo de úlceras pépticas en la infección por cepas de *H. pylori cag*A positivas, debido a la estimulación del fenotipo Th1 **(Amedei et al., 2006)**.

La IL-17, es producida por un nuevo grupo de células diferentes de las Th1 y Th2, descrito recientemente y designado como Th17. La diferenciación de las células Th17 parece ser promovida por la IL-23, mientras que la diferenciación Th1 y Th2 es promovida por la IL-12 y la IL-4, respectivamente. La IL-17A es el miembro prototipo de la familia de IL-17, la cual ejerce efectos proinflamatorios por la estimulación de citocinas y quimiocinas tales como IL-1, IL-6, proteína-1 quimioatractora de monocitos. Adicionalmente, provoca una regulación positiva de moléculas de adhesión (la molécula-1 de adhesión intercelular y la molécula-1 de adhesión a células vasculares, entre otras). IL-17A también parece jugar un rol patogénico importante en las enfermedades autoinmunes **(Gaffen, 2004)**.

Por otra parte, algunos autores atribuyen a la IL-17A efectos antiinflamatorios en la gastritis inducida por *H, pylori*, a través de la supresión de la diferenciación Th1. Otros sugieren que la producción de IL-8 y de GM-CSF por parte de las células Th17 contribuye a la defensa de la mucosa del hospedador frente al patógeno. Se ha detectado sobreexpresión de IL-17 en las células T infiltrantes de las biopsias gástricas infectadas por *H. pylori*. Se considera que el eje IL-23 - IL17, así como el eje IL-12 – IFN.γ, media la defensa de la mucosa del hospedador contra *H. pylori* **(O´Keeffe y Moran, 2008; Caruso et al., 2008).**

La IL-18 es una citocina secretada por las células fagocíticas, que actúa sinérgicamente con la IL-12 para provocar la diferenciación de los linfocitos Th0 en células Th1 productoras de IFN-γ. Aunque la IL-18 se incrementa en las células epiteliales y los monocitos infectados por *H. pylori*, el comportamiento de esas células a nivel gástrico varía en función de los genes de virulencia bacterianos *cag*-PAI y *oip*A, siendo innegable su participación en la gastritis

asociada a *H. pylori* **(Yamauchi et al., 2008)**.

El IFN-γ es secretado por casi todas las células T CD8+, por algunas células TCD4+ (particularmente la subpoblación Th1), y en menor grado, por las células Th0 y NK. Por otra parte, su producción es inhibida por IL-4, IL-10, TGF-β, glucocorticoides y ciclosporina A. El IFN-γ también activa células Th1, macrófagos, neutrófilos, células NK, células del endotelio vascular e inhibe la proliferación de las células Th2 **(Platanias, 2005)**. El IFN-γ y el TNF-α son inhibidores de la somatostatina, el principal inhibidor de la secreción ácida gástrica.

La IL-4 es secretada por los linfocitos Th2 y las células mastocitarias. Esta citocina estimula la expresión de IgG4 e IgE. Promueve la actividad de los linfocitos Th2, las células TCD8+, los eosinófilos, macrófagos y células mastocitarias, así como también la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-I en las células endoteliales. Suprime la síntesis de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF-α, y en general, las funciones de los linfocitos con fenotipo Th1 Por su parte, la IL-5 es producida por los linfocitos T CD4+ (Th2); esta citocina estimula la actividad de los basófilos, lo cual repercute en la secreción de histamina y leucotrienos **(Speiran et al., 2009)**.

Algunos autores han señalado que la citocina IL-4 no es expresada en la mucosa gástrica de los individuos infectados por *H. pylori*. Por otra parte, los resultados de algunos estudios realizados en murinos, revelan una disminución en la colonización bacteriana asociada al aumento en la producción de IL-4 por las células esplénicas CD4+ estimuladas *in vitro,* lo cual podría asociarse a un efecto protector de la citocina. Sin embargo, existen controversias sobre el posible papel beneficioso de esta citocina en la infección por *H. pylori* **(Saldinger et al., 1998).**

I.4.2.2.2.2.-Respuesta inmunitaria humoral

Como respuesta a la infección por *H. pylori*, los individuos desarrollan una fuerte respuesta de anticuerpos local y sistémica que, sin embargo, no es efectiva para erradicar al microorganismo. Se ha demostrado *in vitro*, que la unión de las

IgG a *H. pylori* promueven la fagocitosis y la destrucción del microorganismo por los leucocitos polimorfonucleares; además, las cepas de *H. pylori* son susceptibles al complemento, activado por la vía clásica o por la vía alternativa **(Berstad et al., 2001; González-Valencia et al., 1996)**. Esto sugiere que el mucus gástrico puede ser un nicho protector, en el cual *H. pylori* es relativamente inaccesible a los anticuerpos específicos o a sus funciones efectoras. Por otra parte, la respuesta humoral ineficiente que se genera hacia *H. pylori* y sus componentes, puede contribuir de manera importante a la patogénesis. En efecto, algunos de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra *H. pylori*, reaccionan en forma cruzada con el epitelio gástrico, tanto en ratones como en humanos, induciendo gastritis **(Israel y Peek, 2001)**.

El muestreo de las secreciones gástricas provenientes de individuos infectados por *H. pylori*, también revela una respuesta de anticuerpos activa en la mucosa, primariamente del isotipo IgA. Esta respuesta es consistente con el predominio de IgA secretora (IgAs) en las secreciones gástricas de individuos sanos. Los anticuerpos de tipo IgAs contra *H. pylori* también se encuentran en la saliva y en la leche materna **(Tummala et al., 2004)**. Algunos estudios han demostrado que las IgAs pueden interferir con la capacidad de algunos patógenos entéricos para establecer una infección, inhibiendo la adherencia bacteriana **(Michetti et al., 1992, Ruiz-Palacios et al., 1990)**. Sin embargo, ni la respuesta de IgAs ni la respuesta sistémica de anticuerpos inhiben la adherencia de *H. pylori* a las células gástricas *in vitro.* Esto contribuye a explicar por qué se desarrolla una infección crónica a pesar de una respuesta inmunitaria vigorosa **(Clyne et al., 1997)**.

I.4.2.3.- Polimorfismos genéticos para citocinas

Algunos estudios se han focalizado en analizar otros determinantes de riesgo específicos del hospedador, asociados al curso clínico de la infección. En este sentido, se ha sugerido que los polimorfismos para los genes del hospedador que codifican para ciertas citocinas, pueden ser tan importantes como los estímulos exógenos, para determinar la cantidad de citocinas producidas, y en consecuencia, el patrón y severidad de la inflamación **(Zambon C**

et al, 2005). Particularmente, se ha demostrado que los polimorfismos que incrementan la respuesta de IL-1β o TNF-α ante *H. pylori* están asociados a un mayor riesgo de desarrollar hipoclorhidria, atrofia y adenocarcinoma gástrico **(Machado et al., 2003; Furuta et al., 2002; El-Omar et al., 2000).** Adicionalmente, existen evidencias de que los portadores de los polimorfismos de nucleótido simple que dan lugar a una reducción en la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10, se asocian a un riesgo duplicado de desarrollar cáncer gástrico nocardial; a su vez, los portadores de múltiples genotipos proinflamatorios poseen aún mayores riesgos **(Robinson et al, 2007).** Algunas investigaciones que han analizado la influencia del estado de CagA y VacA sobre los cambios histológicos de la mucosa gástrica, en sujetos estratificados de acuerdo a los polimorfismos de IL-1β e IL-RN; han evidenciado correlaciones entre las anormalidades más severas y ambos factores, los polimorfismos de alto riesgo (los alelos IL-1β.511T e IL-RN*2) y los factores de virulencia (*cag*A+/*vac*As1+). Así, en los pacientes *vac*As1/IL-1β.511T y en los *cag*A+/IL1RN*2/*2, el radio de riesgo para carcinoma gástrico ha sido establecido en 87 y 23, respectivamente **(Figueiredo et al., 2002).**

I.4.3.- Factores ambientales: el papel de los helmintos

Algunas de las incógnitas más intrigantes, y aun no respondidas, en referencia al impacto de la infección por *H. pylori* sobre el hospedador humano guardan relación con su patogénesis: ¿por qué la infección por este microorganismo se traduce en el desarrollo de enfermedad sólo en una pequeña proporción de la población afectada, y por qué son diferentes las enfermedades asociadas con *H. pylori* en las diversas localidades geográficas? **(Fernando et al., 2001)**. En los párrafos precedentes se ha tratado de dar respuesta a estas interrogantes, delineando la participación de algunos factores de virulencia bacterianos específicos, o las diferencias en la respuesta del hospedador ante los antígenos de *Helicobacter.* No obstante, también es posible que algunos factores ambientales tengan su participación en definir el curso clínico de la infección. En este sentido, se ha propuesto que la edad de adquisición de la infección, los hábitos higiénicos y dietéticos predominantes durante la infancia del individuo, los niveles de antioxidantes presentes en la dieta diaria, el consumo de alimentos ahumados o con elevado contenido en sales o nitritos, entre otros, podrían ser

aspectos que modifiquen los procesos que conducen al desarrollo de ulceración o carcinogénesis gástrica. Alternativamente, se ha propuesto que la comorbilidad o coinfección puede modificar el curso clínico de la colonización por *H. pylori* **(Fernando et al., 2001, Shirai et al., 1998)**. Durante los últimos años se ha demostrado que las infecciones helmínticas desencadenan una respuesta inmunitaria mixta Treg/Th2, dirigida a controlar las alteraciones inmunopatológicas y a favorecer la persistencia del parásito, lo cual no sólo garantiza la supervivencia de éste y de su hospedador, sino que le permite interactuar con los mecanismos inflamatorios e inmunitarios específicos involucrados en otras infecciones, en vacunaciones, en alergias y en enfermedades autoinmunes **(Moreau y Chauvin, 2010)**.

En lo que respecta a la acción de los helmintos sobre la infección gastrointestinal por *H. pylori*, en el año 2000, Fox y cols. presentaron evidencias de que la coinfección con un helminto entérico, en un modelo murino de infección gástrica por *Helicobacter felis*, modulaba la inflamación de la mucosa gástrica y se asociaba a un riesgo disminuido de gastritis atrófica. Este hallazgo fue atribuido a una desviación de la respuesta inmune de tipo Th1 inducida por *Helicobacter*, hacia una respuesta de tipo Th2, como la que caracteriza a las infecciones helmínticas **(Fox et al., 2000)**.

La observación de lo que ha sido denominado “El Enigma Africano”, es decir, la presencia en ciertas regiones de África de una prevalencia muy elevada de infección por *H. pylori,* asociada a una frecuencia muy baja de las úlceras pépticas y el cáncer gástrico; ha conllevado a caracterizar histológicamente a los individuos afectados, detectándose que, aún en presencia de infección por las cepas más virulentas de *H. pylori* (CagA+ y VacA+), la lesión predominante es de tipo inflamatorio crónico, mientras que la gastritis aguda, la gastritis atrófica y la metaplasia intestinal, constituyen hallazgos infrecuentes en esa población **(Campbell et al 2001)**. Estas evidencias han sugerido la existencia de algunos factores intercurrentes que pudieran estar protegiendo a esta población de las lesiones de tipo inflamatorio que conducen a las complicaciones más severas asociadas a la infección **(Campbell et al., 2001)**. A este respecto, la teoría de la inmunomodulación parasitaria de la infección gástrica por *H. pylori,* ha sido esgrimida como una posible explicación para este fenómeno.

Algunos estudios epidemiológicos realizados en México y Colombia han tratado de dilucidar la existencia de relación entre la prevalencia de seropositividad para *H. pylori* y la prevalencia de infecciones parasitarias. En ambos casos se han detectado asociaciones positivas entre la prevalencia de ambos tipos de infección en la infancia, no obstante, en México se reportó que en los adultos, la infección parasitaria estaba asociada a una prevalencia reducida de seropositividad para *H. pylori* **(Torres et al., 2003; Whary et al., 2005)**.

A partir de estos hallazgos, varios autores han esbozado la utilidad que la inmunomodulación de la respuesta Th1, bien sea a través del empleo de antígenos parasitarios o de vacunas, podría representar para el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes (alergias, colitis) y de la infección por *H. pylori*. La búsqueda del mecanismo parasitario responsable de desviar la respuesta inmune hacia la variedad Th2, con miras a la elaboración de vacunas, continúa siendo motivo de intenso estudio. Entre otros factores, la Inmunoglobulina E, cuya concentración aumenta en respuesta a las infecciones parasitarias, ha sido propuesta como inductora de inmunomodulación, pero este aspecto aún no está claro. En líneas generales, los investigadores reconocen hoy en día la utilidad de estudiar la respuesta inmune inducida por helmintos y el modo como ésta podría interferir con otros fenómenos de inmunidad, y la necesidad de indagar más sobre estos mecanismos en humanos **(Imai y Fujita, 2004; Del Giudice y Michetti, 2004)**.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El papel de la infección por *Helicobacter pylori* en la carcinogénesis gástrica ha sido motivo de intenso estudio a nivel mundial, desde el punto de vista epidemiológico, socio-demográfico, clínico, histopatológico, nutricional e inmunológico, a fin de llegar a comprender los mecanismos que operan en la selección del 0,1 a 2% de los individuos infectados que llegarán a desarrollar cáncer gástrico.

El curso clínico asociado a la infección por este microorganismo, parece depender de factores inherentes al hospedero, a la bacteria y al medio ambiente. La variedad y combinación de estos factores se implica en la patogenia de las diferentes expresiones clínicopatológicas que puede desencadenar la infección, sean de carácter benigno (gastritis superficial, gastritis crónica no atrófica o úlcera péptica) o de carácter neoplásico (cáncer gástrico o linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa – MALT). Este destino "optativo o divergente" de la infección por *H. pylori* ha quedado bien ejemplificado en el llamado "enigma africano", posteriormente descrito también para varias poblaciones de Asia, Europa y América Latina. Este enigma surge por la observación de una baja incidencia de cáncer gástrico en algunas áreas geográficas o conglomerados humanos, a pesar de existir en ellas una alta prevalencia de infección por *H. pylori*, en contraste con otros grupos humanos en los cuales la elevada prevalencia de la infección se acompaña de una alta tasa de cáncer gástrico.

Para algunos autores, la clave para comprender por qué en ciertas circunstancias la infección por *H. pylori* desencadena un cáncer gástrico y en otras no, radica en los factores que determinan la cualidad, intensidad y curso de la respuesta inflamatoria que inducirá con el tiempo una gastritis crónica atrófica, en lugar de una lesión ulcerosa. Las investigaciones realizadas hasta el presente han aportado evidencias que sustentan la posible participación de 4 factores principales en la modulación del proceso inflamatorio iniciado por la infección: a) El potencial oncogénico de diferentes genotipos bacterianos de alta virulencia, b) La susceptibilidad genética del hospedero (Ej.: Los portadores de polimorfismos que codifican predominantemente para las citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias), c) La influencia de la dieta (Ej.: El efecto protector de la ingesta

de abundantes alimentos ricos en micronutrientes antioxidantes, y d) La modulación de la respuesta inmune proinflamatoria inducida por *H. pylori*, por algún mecanismo que estimule una respuesta dependiente de linfocitos T colaboradores de tipo 2 (Th2) (Ej.: Por la coinfección con helmintos intestinales).

La hipótesis de la modulación inmunitaria, ha sido investigada en modelos animales de coinfección, utilizando especies de *Helicobacter* y helmintos similares a las que afectan a los seres humanos. En estos estudios se ha sugerido que la coinfección parasitaria pudiera implicar un efecto protector, evitando o retrasando la evolución de la gastritis crónica hacia la atrofia, a través de una reducción en la expresión de citocinas proinflamatorias dependientes de linfocitos Th1, aún en presencia de inflamación crónica y de un alto grado de colonización bacteriana. No obstante, este modelo de coinfección no ha sido estudiado en humanos en relación con la respuesta local dependiente de citocinas. La evidencia más cercana de un efecto de esta naturaleza en humanos, fue obtenida a partir de un estudio realizado en niños de dos comunidades colombianas con elevada seroprevalencia de *H. pylori*, pero con diferente prevalencia de coinfecciones parasitarias. En ese estudio se demostró que los niños de la región con mayor prevalencia de coinfección parasitaria por helmintos, tenían concentraciones séricas de IgE y de la subclase 1 de la IgG anti-*H. pylori* (estimulados por una respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos Th2), superiores a las de los niños de la región con prevalencia de coinfección parasitaria significativamente menor. Tales resultados sugieren que ciertos factores ambientales, tales como las coinfecciones helmínticas, podrían inmunomodular favorablemente la respuesta inflamatoria inducida por *H. pylori* en la mucosa gástrica, ofreciendo protección contra el desarrollo de gastritis atrófica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico.

La población de Maracaibo, capital del estado Zulia, ubicado en la región costera noroccidental de Venezuela, cuenta con numerosas comunidades suburbanas cuyas condiciones de vida pudieran favorecer la prevalencia de infección por *H. pylori* y la coinfección parasitaria por helmintos, tal como lo sugieren algunos estudios previos realizados en la región. Adicionalmente, el estado Zulia cuenta con una baja tasa de mortalidad por cáncer gástrico, en

contraste con la descrita para algunas regiones andinas cercanas geográficamente, lo cual permite presumir que uno o varios factores protectores pudieran estar incidiendo en esta población, en comparación con los estados andinos.

Ante tales consideraciones, se plantea que la coinfección intestinal por helmintos, en individuos de la ciudad de Maracaibo infectados con *H. pylori*, se asocia significativamente a una modificación en el perfil de algunas citocinas expresadas en la mucosa gástrica, a favor de una respuesta antiinflamatoria. Este efecto inmunomodulador podría traducirse en variaciones significativas en el patrón de lesión gástrica evidenciado endoscópicamente, y/o en las características histopatológicas de la mucosa gástrica de los individuos coinfectados.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la coinfección parasitaria por helmintos se asocia a cambios en la expresión local de citocinas proinflamatorias y/o antiinflamatorias y en el grado de lesión tisular, en individuos con gastritis asociada a la infección por *H. pylori.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En pacientes adultos, con diagnóstico endoscópico de gastropatía e infección activa por *H. pylori*, coinfectados y no coinfectados por helmintos intestinales, se investigará:

1.- El grado de lesión de la mucosa gástrica, determinado mediante el estudio endoscópico de las vías digestivas superiores y el análisis histopatológico de biopsias provenientes del antro y el corpus gástrico.

2.- La expresión local, a nivel del antro gástrico, de las citocinas proinflamatorias IL-1β, TNF-α e IFN-γ; así como de la citocina antiinflamatoria IL-4, mediante tinción inmunohistoquímica.

3.- Si las variaciones en la expresión local de las citocinas investigadas en los casos de coinfección con helmintos, se asocian a cambios favorables significativos en el grado de lesión de la mucosa gástrica infectada por *H. pylori.*

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.- Tipo de investigación

La investigación realizada es traslacional y descriptiva, con variables cualitativas y cuantitativas; basada en un diseño de campo, no experimental, post-facto, prospectivo y transversal.

III.2.- Población objeto de estudio

Se estudiaron 46 individuos residentes en el estado Zulia (al noroeste de Venezuela), quienes fueron seleccionados luego de registrar sus datos en la historia clínica y de realizarles algunos exámenes preliminares, para constatar que cumplieran con los criterios de inclusión y que no presentaran los criterios de exclusión establecidos para esta investigación.

III.3.- Criterios de inclusión

En esta investigación participaron individuos del sexo masculino o femenino, con edad $\geq$ 18 años y diagnóstico endoscópico de gastropatía, quienes aceptaron ser incluidos en el protocolo de investigación propuesto, mediante la firma del respectivo Consentimiento Informado. A continuación, se exponen los criterios que fueron utilizados para la posterior asignación de los individuos seleccionados, a uno de los 3 grupos que se conformaron para este estudio.

III.3.1.- Diagnóstico endoscópico de gastropatía

Se consideró que un paciente tenía diagnóstico endoscópico de gastropatía, cuando al realizar la endoscopia del tracto digestivo superior (ETDS) se le detectó, al menos, un patrón endoscópico sugestivo de lesión de la mucosa gástrica, de cualquier tipo, localización y grado de severidad **(Khakoo et al., 1994)**. Este criterio debieron cumplirlo todos los individuos participantes.

III.3.2.- Infección activa por *Helicobacter pylori*

Este diagnóstico se basó en la positividad para, al menos, dos de las

siguientes pruebas, realizadas en biopsias gástricas obtenidas mediante la ETDS: cultivo microbiológico, prueba rápida de ureasa y/o visualización del microorganismo mediante el estudio histopatológico al microscopio de luz con coloración de hematoxilina-eosina **(Lage et al., 1995, Agnihotri et al., 1998).** De acuerdo a este criterio, que debió cumplirse para los grupos 1 y 2, todos los pacientes clasificados como *Hp*+ presentaron la infección comprobada a nivel del antro gástrico. Se consideró como "ausencia de infección" al resultado negativo para las tres pruebas diagnósticas aplicadas, criterio que debió cumplirse para los individuos que conformaron el grupo 3 (ver la sección III.5.- Grupos de estudio).

III.3.3.- Infección parasitaria por helmintos intestinales

Las helmintiasis intestinales fueron diagnosticadas por la visualización de las formas evolutivas de helmintos intestinales al examen de heces directo o concentrado, y/o de los vermes adultos característicos al estudio endoscópico **(Botero y Restrepo, 1998; Archimandritis et al., 1997)**. Estos criterios de infección fueron utilizados en la selección de los individuos que conformaron el grupo 1.

III.4.- Criterios de exclusión

III.4.1.- Criterios generales de exclusión

Fueron excluidos de este estudio, los individuos que presentaron:

- Cáncer gástrico o de cualquier otra localización.

- Enfermedades agudas o crónicas activas, diferentes de la que motivó la consulta actual, tales como: nefropatías, diabetes, TBC, hepatitis aguda o crónica, infección por VIH, enfermedades autoinmunes y trastornos hematológicos severos, entre otras.

- Desnutrición crónica.

- Embarazo.

- Asma bronquial o alergias.

- Tratamiento con corticosteroides, drogas inmunosupresoras u otro medicamento que interactué con el sistema inmunológico, durante los últimos seis meses.

- Tratamiento con antibióticos utilizados para erradicar la infección por

Helicobacter pylori (Ej.: metronidazol, amoxicilina, claritromicina, tetraciclinas y bismuto, entre otros), en los 6 meses previos a la consulta por la enfermedad actual.

- Infección parasitaria por protozoarios patógenos al momento del estudio, o haberla padecido durante los últimos 6 meses. El estado de infección fue corroborado mediante el examen de heces directo y concentrado.

III.4.2.- Criterios de exclusión específicos para los grupos 2 y 3

- Diagnóstico de helmintiasis intestinal al momento del estudio o durante los 6 meses previos a la consulta, según los criterios de infección previamente definidos, exceptuando también a los individuos que hubieran referido la expulsión de vermes característicos por vía anal en los 6 últimos meses, aún cuando no se obtuviera evidencia de parasitosis al examen de heces.

- Eosinofilia en sangre periférica superior al 4,0%.

III.4.3.- Criterios de exclusión específicos para los grupos 1 y 2

- Factores de riesgo para gastropatías, diferentes a la infección por *H. pylori,* tales como: colecistectomía o litiasis vesicular (debido al reflujo biliar duodenogástrico que suele acompañar a estas condiciones, puesto que la bilis es un agente etiológico para gastropatías), consumo habitual (diario, semanal o mensual) de alcohol, corticosteroides o antiinflamatorios no esteroideos, o consumo ocasional agudo en el curso de las dos semanas previas a la consulta.

III.5.- Grupos de estudio: Seguidamente, los pacientes seleccionados fueron asignados a uno de los tres grupos de estudio que se describen a continuación.

III.5.1. Grupo 1: *H. pylori*+/helmintos+ (*Hp*+/helm+): conformado por 11 Individuos con diagnóstico endoscópico de gastropatía, infección por *Helicobacter pylori* y coinfección intestinal por helmintos.

III.5.2.- Grupo 2: *H. pylori*+/helmintos- (*Hp*+/helm-): conformado por 18 Individuos con diagnóstico endoscópico de gastropatía e infección por *H. pylori*,

pero sin coinfección intestinal por helmintos. Éste constituyó el grupo control para estudiar el efecto de la coinfección helmíntica en el Grupo 1.

III.5.3.- Grupo 3: *H. pylori*-/helmintos- (*Hp*-/helm-): conformado por 17 individuos con diagnóstico endoscópico de gastropatía, atribuible a cualquier etiología, excepto a la infección por *H. pylori*, y sin infección intestinal por helmintos. Éste constituyó el grupo control para estudiar el efecto de la infección por *H. pylori* en el grupo 2.

III.6.- Tipo de muestreo y estrategias para la selección de los pacientes

Se realizó un muestreo no probabilístico e intencional, dada la necesidad de cumplir con los criterios antes establecidos.

Los individuos que conformaron los grupos 2 y 3 fueron seleccionados entre los consultantes al Servicio de Gastroenterología del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo-Estado Zulia-Venezuela, durante el período comprendido desde octubre de 2007 hasta diciembre de 2010. Por otra parte, los individuos que conformaron el grupo 1 fueron seleccionados entre los residentes de comunidades suburbanas de la ciudad de Maracaibo, mediante la realización de jornadas médicas, en las cuales se incluyeron análisis coproparasitológicos de muestras fecales provenientes de individuos adultos, como estrategia para la identificación de los pacientes con infección enteroparasitaria por helmintos.

III.7.- Aspectos bioéticos

Todos los individuos que cumplieron con los criterios exigidos para participar en la presente investigación, fueron invitados a tomar parte en la misma, siendo informados de las características, beneficios y riesgos de los estudios a ser practicados, tanto verbalmente como a través de la Hoja de Consentimiento Informado, la cual firmaron en señal de conformidad, en caso de aceptar participar libre y voluntariamente en el estudio. La recolección de las muestras sanguíneas, así como los procedimientos endoscópicos y de toma de biopsias, fueron realizados por personal profesional capacitado para tal fin.

Independientemente de los procedimientos realizados como parte del presente trabajo, todos los pacientes recibieron la atención médica necesaria y oportuna, por parte de un Médico Gastroenterólogo adscrito al Servicio de Gastroenterología de la Unidad Hospitalaria donde se realizó el muestreo. A todos los individuos participantes se les hizo entrega de los resultados de los estudios practicados, indicando tratamiento farmacológico, dietético y asesoría para realizar los cambios de estilo de vida pertinentes, cuando se consideró necesario. A los individuos que conformaron el grupo 1, se les invitó a acudir voluntariamente a la unidad hospitalaria antes mencionada, para practicarle la ETDS y algunos exámenes de laboratorio. Para este grupo de pacientes se gestionó, ante laboratorios farmacéuticos comerciales, la entrega gratuita de medicamentos antiparasitarios, anti-*H. pylori* u otros que resultaron necesarios.

Este trabajo estuvo enmarcado dentro de los lineamientos establecidos en el Código de Ética para la Vida del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, la Tecnología y las Industrias Intermedias de la República Bolivariana de Venezuela **(MCTII, 2011),** y tiene el aval del Consejo Técnico del Instituto de Investigaciones Biológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia y del personal directivo del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario de Maracaibo.

III.8.- Descripción de procedimientos

III.8.1.- Historia clínica

A todos los pacientes se les realizó un interrogatorio minucioso acerca de aspectos sociodemográficos, tales como: lugar y fecha de nacimiento, lugar de residencia, origen étnico, las variables socioeconómicas contempladas en la Escala de Graffar modificada por Méndez-Castellano **(Méndez-Castellano, 1982)**; así como también los síntomas que motivaron la consulta (tanto los generales, como los referidos al tracto digestivo), recibiendo ayuda del médico para precisar las características diferenciales y el tiempo aproximado de evolución de los mismos. Adicionalmente, se interrogaron los antecedentes patológicos y hábitos que pudieran estar involucrados en la etiología de su enfermedad actual (hábito alcohólico, consumo de esteroides, de antiinflamatorios no esteroideos, entre

otros), y el padecimiento de enfermedades crónicas o enfermedades digestivas de reciente aparición. Finalmente, se precisó si el individuo presentaba alguno de los criterios de exclusión que impidieran su ingreso al estudio. Toda esta información fue registrada en una historia médica tabulada, diseñada para este fin.

III.8.2.- Pruebas rutinarias de laboratorio

III.8.2.1.- Pruebas realizadas en muestras sanguíneas

Luego de un período de ayuno nocturno de 10 horas, se recolectó una muestra de 10 ml de sangre venosa de cada paciente mediante venopunción, bajo condiciones de asepsia y antisepsia. Una porción de esta muestra fue anticoagulada con EDTA, para realizar la biometría hemática. Del volumen de muestra restante se extrajo el suero sanguíneo, con el cual se realizó la inmunoserología para el VIH, la determinación de glicemia para despistaje de diabetes, así como de urea y creatinina para corroborar el estado de salud renal.

III.8.2.2.- Examen coproparasitológico

Cada paciente aportó tres muestras de heces frescas, emitidas en días consecutivos o no, las cuales fueron analizadas mediante un examen coproparasitológico directo con solución salina fisiológica, las coloraciones temporales de lugol y de Nair, así como la técnica de concentración de Ritchie modificada (formol-etilacetato) **(Melvin y Brooke, 1971).**

III.8.3.- Endoscopia del tracto digestivo superior

Este estudio se practicó, luego de un mínimo de 10 horas de ayuno absoluto, previa anestesia tópica de la región faríngea e hipofaríngea con lidocaína al 2% en aerosol y sedación endovenosa con midazolan (de 3 a 5 mg vía endovenosa) **(Keeffe et al., 1990).** Con monitoreo permanente de los signos vitales, se introdujo por vía oral un videoendoscopio flexible (Olympus Latin American, Inc, Japón®), siguiendo el método de visión directa, haciéndolo avanzar por la línea media, mientras el paciente realiza degluciones voluntarias

(Waye et al., 1987). Una vez en el esófago, se evaluó este órgano en toda su longitud, observando el calibre, aspecto de la mucosa, distensibilidad y peristalsis. Al llegar al estómago, previa insuflación del mismo con aire, se visualizaron sistemáticamente el fundus, el cuerpo y el antro gástrico, siendo examinados detalladamente. Finalmente, luego de pasar a través del píloro, se realizó la evaluaron de la primera y segunda porción del duodeno. Al volver al estómago, en las zonas de aparente lesión mucosal del antro gástrico, se tomaron 4 biopsias endoscópicas, empleando un dispositivo especial del endoscopio diseñado para tal fin, siendo distribuidas de la siguiente manera:

- La primera biopsia fue incluida de inmediato en un vial con solución salina estéril, destinado al cultivo microbiológico para *H. pylori*.

- La segunda biopsia fue incluida en el medio preparado para la prueba rápida de ureasa.

- Las dos biopsias restantes se incluyeron en formaldehido al 10%, para su posterior procesamiento mediante estudio histopatológico y coloraciones inmunohistoquímicas.

Adicionalmente, se tomó una biopsia del cuerpo gástrico, a una distancia aproximada de 1 centímetro por encima del ángulo de la curvatura menor, la cual también fue incluida en formaldehido al 10% para estudio histopatológico.

En cada zona, se tuvo el cuidado de tomar las biopsias en las áreas con lesión aparente y de evitar que las muestras estuvieran impregnadas en sangre, a fin de reducir la posibilidad de error en los resultados de las pruebas. Finalizada la observación, se procedió a retirar el equipo, aspirando el aire que inicialmente se insufló para distender las paredes del estómago. A continuación, constatado el estado de bienestar del paciente, los Gastroenterólogos endoscopistas formularon por escrito la descripción de los hallazgos endoscópicos, así como el diagnóstico del estado de salud esófago-gastroduodenal.

III.8.4.- Cultivo microbiológico para *Helicobacter pylori*

Para el cultivo microbiológico de *H. pylori*, la primera biopsia de mucosa gástrica antral obtenida endoscópicamente, se retiró de la pinza del endoscopio utilizando una aguja estéril, y se colocó en un tubo de Eppendorf conteniendo 0,5 ml de solución salina estéril, como medio de transporte. Esta muestra se procesó en un lapso no mayor de 4 horas luego de su recolección. Para ello, el tejido se fraccionó finamente sobre un vidrio de reloj estéril, utilizando una hojilla de bisturí. Este preparado se sembró en dos medios de cultivo enriquecidos para aislamiento primario, uno selectivo y uno no selectivo, utilizando como base Agar Brucella suplementado con sangre de carnero al 5%. Al medio selectivo se le adicionaron 3 agentes antimicrobianos: vancomicina, trimetroprim y anfotericina B. Ambos medios se incubaron a una temperatura de 35ºC, en atmósfera microaerofílica húmeda (5% de O_2, 10% de CO_2 y 85% de N_2), empleando jarras de anaerobiosis y sobres comerciales generadores de gases Anaerocult C® (Merck, Darmstadt, Alemania). Los cultivos se inspeccionaron a los 3, 5 y 7 días de incubación. La identificación de los aislamientos se basó en la morfología colonial y celular características de *H. pylori*, conjuntamente con resultados positivos para las pruebas de oxidasa, catalasa y ureasa.

III.8.5.- Prueba rápida de ureasa en biopsias

Esta prueba se basa en poner de manifiesto la fuerte actividad de ureasa de *H. pylori*, que le permite metabolizar rápidamente la urea con producción de CO_2 y amonio. Para ello, la segunda biopsia proveniente del antro gástrico fue colocada en un tubo Eppendorf conteniendo 1,5 ml de agar urea, preparado según el procedimiento previamente descrito y estandarizado para la población estudiada **(Fuenmayor et al., 2006).** La prueba se incubó a 35ºC, verificando periódicamente la aparición de cambios de color en el agar. Ésta fue considerada positiva al ocurrir un viraje de color del indicador rojo de fenol contenido en el medio, de un anaranjado suave a un rosado o fucsia intenso. La ausencia de cambios en el color se consideró como un resultado negativo. Los cambios en el medio de ureasa que ocurrieron durante el transcurso de las 2 primeras horas de incubación, se consideraron específicos para *H. pylori*; mientras que los cambios

ocurridos después de ese lapso y hasta un máximo de 24 horas de incubación, fueron interpretados con precaución, a la par de los resultados del estudio microbiológico y/o histopatológico.

III.8.6.- Estudio histopatológico con coloración de Hematoxilina-Eosina

Una biopsia del cuerpo y otra del antro gástrico fueron fijadas en una solución de formaldehido al 10%, durante un mínimo de 8 horas. Seguidamente, los fragmentos de mucosa gástrica fueron procesados, siguiendo los pasos habituales de deshidratación e inclusión en parafina, para luego proceder a realizar cortes seriados de un máximo de 5µm, los cuales se fijaron en láminas portaobjeto y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina, con el objeto de identificar la presencia y severidad de gastritis (infiltrado inflamatorio de células mononuclear), atrofia, metaplasia, actividad inflamatoria (infiltrado inflamatorio de células polimorfonucleares), fibrosis, erosiones epiteliales, acúmulos linfocitarios y colonización por *H. pylori*. Todos los especímenes fueron evaluados por el mismo patólogo. La descripción histopatológica de las lesiones se rigió por los criterios descritos en el Sistema de Sydney actualizado (escala de valoración de 0 – 3 para cada parámetro: 0 = ausente, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = severo) **(Dixon et al., 1996).** La identificación de *H. pylori* se basó en la apariencia morfológica descrita para este microorganismo en cortes histológicos de mucosa gástrica. Cuando se identificó la presencia del microorganismo, ésta fue clasificada como escasa, moderada o abundante. El patólogo, al momento de hacer la evaluación histopatológica, desconocía tanto las características clínicas como el resultado de las pruebas de ureasa y cultivo microbiológico, correspondientes a cada caso. Todas las preparaciones histológicas fueron observadas al microscopio óptico (Modelo CX21, Olympus Latin América, Inc, Japón®) con objetivos de 10X, 40X y 100X (inmersión).

III.8.7.- Cálculo del índice de riesgo para cáncer gástrico

Se calculó el índice de riesgo para cáncer gástrico, propuesto por Meining y cols **(Meining et al, 1998)**, el cual se basa en determinar el patrón de gastritis predominante, antral o corporal, presuponiendo que los pacientes con cáncer

gástrico presentan un mayor grado de inflamación crónica y activa a nivel del corpus gástrico, en comparación con la evidenciada en el antro (gastritis predominantemente corporal). Para calcular este índice se contrastaron los resultados derivados del análisis histopatológico con la coloración de hematoxilina-eosina, de las biopsias tipo "punch" tomadas por vía endoscópica y provenientes del antro y el corpus gástrico de cada paciente, con énfasis en la identificación de los siguientes hallazgos:

- Un grado de gastritis (infiltración por linfocitos y células plasmáticas) más severo en el corpus gástrico en comparación con el antro, o al menos de igual severidad.

- Un grado de actividad inflamatoria (infiltración por granulocitos neutrófilos) más severo en el corpus gástrico en comparación con el antro, o al menos de igual severidad.

- La presencia de metaplasia intestinal en el antro y/o en el corpus gástrico.

A cada aspecto se le asignó un punto, obteniéndose valores en el rango del 0 al 3. A mayor valor del índice calculado, el riesgo de llegar a desarrollar cáncer gástrico se consideró mayor. El valor predictivo positivo para cáncer gástrico del Índice de Meining, se ha estimado en 79% para un valor de 2, y de 94% para un valor de 3 (**Vieth 2006)**.

III.8.8.- Detección y cuantificación de citocinas en la mucosa gástrica antral

La detección y cuantificación de las citocinas en las biopsias de mucosa gástrica antral, se realizó mediante coloración inmunohistoquímica, por el método ABC, peroxidasa-diaminobenzidina, utilizando el kit comercial Vectastain® Elite ABC Kit (Vector Laboratories LTD, United Kingdom), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se fundamenta en la formación del complejo biotina-avidina (ABC) con anticuerpos primarios que reaccionan con los antígenos del tejido en estudio. La visualización se basa en la conversión enzimática de un sustrato cromogénico (3,3' diaminobenzidina) en un precipitado de color marrón, por la enzima peroxidasa de rábano (HRP), en el sitio de localización del antígeno, lo cual puede ser visualizado al microscopio de luz.

Todos los anticuerpos primarios utilizados, específicos para las citocinas, fueron anticuerpos de ratón anti-humano, del isotipo IgG1. Las fuentes de los anticuerpos fueron las siguientes: anti IFN-γ (Thermo Scientific, clon: B133.5), anti TNF-α (Chemicon International MAB 1021), anti IL-1β (Endogen Pierce, clon H67) y anti IL-4 (Endogen Pierce, clon 25D2). Se realizaron estudios piloto para determinar la concentración óptima de cada anticuerpo primario, la cual fue establecida en 5μg/ml. Como un control de la especificidad de la reacción (control negativo), en cada procedimiento de tinción se empleó un anticuerpo monoclonal irrelevante, del mismo isotipo de los anticuerpos primarios específicos para las citocinas, pero dirigido contra un antígeno no presente en el tejido. Se analizó una sección histológica por biopsia, con base en los estudios que han validado la inmunorreactividad para las citocinas IL-4, IL-1β, IFN-γ y TNF-α observada en una sola sección de tejido, como representativa de la muestra de biopsia completa **(Lindholm et al, 1998, Strömberg et al., 2003)**.

Las biopsias gástricas fueron fijadas en formaldehido al 4% e incluidas en bloques de parafina, de los cuales se obtuvieron cortes de 5μm de espesor, que fueron montados en láminas de vidrio (pretratadas con poly-lisina) y desparafinados **(Bodger et al., 2001).** Luego, se bloqueó la actividad de peroxidasa y la biotina endógena del tejido, empleando peróxido de hidrógeno al 0,3% y el Kit Bloqueador de Biotina-Avidina (Vector® Laboratories Inc.), respectivamente. Después de cubrir las secciones de tejido con suero bloqueador, éstas fueron incubadas con el anticuerpo primario específico para cada citocina, a 4ºC, durante toda la noche. Luego del procedimiento de lavado con solución amortiguadora de fosfato, se aplicó en forma secuencial, con pasos de lavado intercalados, el anticuerpo secundario biotinilado de cabra, anti-ratón, del isotipo IgG1, el complejo peroxidasa de rábano-biotina-avidina (Vectastain® ELITE ABC Kit) y el sustrato cromogénico 3,3-diaminobenzidina (Vector® Laboratories Inc.). Finalmente, las secciones fueron contracoloreadas con hematoxilina, deshidratadas y montadas utilizando el medio de montaje histológico Mountex® (Histolab, Göteborg, Suecia).

La expresión de las citocinas en los cortes de mucosa gástrica coloreados con inmunoperoxidasa, fue analizada mediante dos métodos diferentes, por observadores independientes:

El primer método consistió en un análisis descriptivo y semicuantitativo, realizado por el mismo patólogo encargado del estudio histopatológico de las biopsias gástricas. Mediante este análisis se determinó el patrón de distribución y grado de expresión de cada citocina a nivel del epitelio, la lámina propia y el infiltrado inflamatorio de la mucosa antral, de acuerdo a los criterios descritos a continuación **(Bodger, 2001)**:

Localización de la Expresión de Citocinas (IHQ)	**Escala visual, analógica, semicuantitativa para medir el grado de expresión de las citosinas**
- Epitelio y lámina propia	Intensidad del área marcada con IHQ: 0 = Ausente 1 = Débil 2 = Moderada 3 = Intensa
- Infiltrado inflamatorio mononuclear (MN) y polimorfonuclear (PMN)	Proporción del total de células inflamatorias marcadas con IHQ: 0 = Ausente 1 = Células escasas, aisladas, $\leq$ 10% 2 = Células en cantidad moderada: >10%, < 50% 3 = Células en cantidad abundante: $\geq$ 50%

IHQ: coloración inmunohistoquímica.

El segundo método fue cuantitativo y estuvo a cargo de otro investigador (AF). Para ello, las secciones de tejido inmunocoloreadas fueron analizadas mediante observación al microscopio óptico (modelo Axioskop®, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania), con objetivos de 10X y 40X. Con una amplificación de 400X, y empleando una cámara digital acoplada al microscopio (modelo Cyber-shot® 5mp, Sony Corporation, Japón), se procedió a tomar microfotografías de tantos campos microscópicos como fueran necesarios, hasta abarcar la totalidad del área de tejido presente en cada corte. Posteriormente, Las imágenes digitales fueron evaluadas con la ayuda del Software Adobe PhotoShop® CS4 Extended (Adobe Systems Incorporated, San José-California, USA),

La expresión de cada citocina fue cuantificada por separado para el epitelio glandular y para la lámina propia, empleando únicamente los campos fotografiados que presentaban una proporción aceptable de ambos componentes de la mucosa gástrica. Dado que entre los campos fotografiados de un mismo corte histológico podían encontrarse algunos con marcaje (áreas positivas) y otros sin marcaje (áreas negativas), se calculó la proporción de campos con marcaje/sin marcaje en el total del corte histológico. Esta proporción fue respetada al seleccionar los campos fotografiados para la cuantificación de la expresión de citocinas. Para cada citocina estudiada se analizaron entre 8 y 12 campos fotografiados por corte.

Se determinó el número de píxeles correspondientes al área total del epitelio y la lámina propia, y el número de píxeles correspondientes a la tinción inmunohistoquímica específica (color marrón oscuro) para cada una de estas áreas. Finalmente, se determinó el porcentaje de positividad para la expresión de cada citocina, utilizando la fórmula:

$$\%\ \text{de expresión para cada citocina} = \frac{\text{Número de píxeles con tinción específica en el área (epitelio o lámina propia)}}{\text{Número de píxeles para el área total examinada (epitelio o lámina propia)}} \times 100$$

En total se analizaron, por duplicado, aproximadamente 2000 campos fotografiados.

III.9.- Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron registrados en una base de datos y analizados con ayuda del Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS®, por sus siglas en inglés) versión 20.0 para Windows (IBM, Chicago, USA). Los resultados cuantitativos fueron expresados como promedios $\pm$ 1 error estándar. Se determinó la distribución de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Debido a que las variables cuantitativas, especialmente las referidas a la expresión de las citocinas por la mucosa gástrica, no presentaron una distribución normal, la mayor parte del análisis estadístico estuvo fundamentado en pruebas no paramétricas. Se empleó la Prueba de Kruskal-Wallis para el análisis de las diferencias entre los tres grupos de pacientes, la Prueba U de

Mann Whitney para la comparación entre dos grupos específicos, y el estadístico χ^2 (o Prueba Exacta de Fisher, según el caso) para evaluar el comportamiento de las variables cualitativas y ordinales. Los resultados del análisis cuantitativo de las citocinas fueron transformados a la escala semicuantitativa descrita previamente (expresión negativa, escasa, moderada o abundante), con el fin de analizar el grado de correlación entre los dos métodos de cuantificación utilizados. En todos los casos, los resultados se analizaron con un nivel de confiabilidad del 95%, considerándose significativa una $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

IV.1.- Caracterización sociodemográfica de la muestra poblacional

Se estudiaron 46 individuos adultos, 35 del sexo femenino (76,1%) y 11 del sexo masculino (23,9%), con un rango de edad comprendido entre 18 y 70 años (media: 36,1 ± 12,5 años), mestizos en su mayoría (93,5%). De acuerdo a la Escala de Graffar, los individuos se ubicaron mayoritariamente en los estratos socioeconómicos II, III y IV (91,3%), es decir, entre la clase media y el estado de pobreza relativa, distribución que refleja la condición socioeconómica predominante en la población sobre la cual ejerce su influencia asistencial el Hospital Universitario de Maracaibo.

Tal como se describió previamente, los individuos que formaron parte de la muestra poblacional fueron clasificados en tres grupos, de acuerdo al estado de infección gástrica por *H. pylori* y de parasitismo intestinal por helmintos. La composición de tales grupos, así como las características sociodemográficas de los individuos que los conformaron, se especifican en la **Tabla 1**. Puede evidenciarse que los grupos no variaron significativamente en cuanto a su composición por sexo o grupo etario; el promedio de edad ligeramente más alto del grupo *Hp*+/helm+ se explica por la presencia de un paciente de 70 años en este grupo. Este paciente fue incluido puesto que sus datos no difirieron de los valores promedio para el resto del grupo. Por otra parte, al analizar el estrato socioeconómico de los pacientes, se registró una diferencia significativa en cuanto al estrato socioeconómico, con predominio de los estratos IV y V (correspondientes a pobreza relativa y pobreza extrema) en el grupo *Hp*+/helm+ (63,6%). Este aspecto pone en evidencia el nivel socio-sanitario de las comunidades que fue necesario abordar en la búsqueda de los individuos con infección helmíntica. En tal sentido, los estudios de prevalencia realizados en la región indican que, al menos en el municipio Maracaibo del Estado Zulia, las helmintiasis intestinales no suelen ser frecuentes durante la edad adulta, a menos que las condiciones de vida del individuo sean muy deficientes desde el punto de vista de la higiene y el saneamiento ambiental básico **(Calchi et al., 2007)**.

Tabla 1.- Parámetros sociodemográficos y biométricos generales de los individuos, por grupos de acuerdo al estado de infección por *H. pylori* y helmintos intestinales.

Parámetros	Grupos de individuos estudiados					
	Hp-/Helmintos –		*Hp*+/Helmintos-		*Hp*+/Helmintos+	
Cualitativos	N° (%)					
Sexo						
Femenino	13	(76,5)	16	(88,9)	6	(54,5)
Masculino	4	(23,5)	2	(11,1)	5	(45,5)
Grupo étnico						
Mestizos	14	(82,4)	18	(100)	11	(100)
Amerindios (Wayuu)	3	(17,6)	-	-	-	-
Estrato Socioeconómico (Escala Graffar)						
Estrato II	6	(35,3)	7	(38,9)	1	(9,1)
Estrato III	8	(47,1)	9	(50,0)	3	(27,3)
Estrato IV	2	(11,8)	2	(11,1)*	4	(36,3)
Estrato V	1	(5,9)	-	-	3	(27,3)
Serología para VIH						
No reactiva	17	(100)	18	(100)	11	(100)
Cuantitativos	Media (Rango)					
Edad (años)	36,5	(18-55)	32,9	(18-51)	41,0	(21-70)
Hemoglobina (g/dL)	12,7	(11,2 -15,0)	12,2	(10,8-15,3)	11,7	(5,4-14,6)
Hematocrito (%)	43,0	(38,0-51,0)	42,1	(37,0-50,6)	40,0	(18,2-52,2)
Cuenta blanca ($x10^3$/µL)	6,9	(4,2-10,7)	6,6	(4,5-9,2)	7,3	(5,7-8,9)
Plaquetas($x10^3$/µL)	321,5	(223-554)	288,0	(214-444)	276,4	(200-374)
Eosinófilos (%)	2,04	(0,7-4,4)	2,0	(0,7-3,7)**	6,6	(0,8-19,0)**
Glicemia ayunas (mg/dL)	88,6	(69-105)	86,6	(69-106)	88,0	(72-102)
Urea (mg/dL)	24,7	(11-46)	23,9	(16-40)	30,7	(20-43)
Creatinina (mg/dL)	0,70	(0,3-1,2)	0,75	(0,5-1,1)	0,79	(0,5-1,2)

Hp: *H. pylori.* Valores referenciales: Hemoglobina:♀, 12-15g/dL; ♂, 13-16g/dL; Cuenta Blanca: 5-10x10^3/µL; Plaquetas: 150-400x10^3/µL; Eosinófilos: ≤2%; Glicemia: 60-100mg/dL; Urea: <44mg/dL; Creatinina: 0.7-1.5mg/dL. [a, b]: diferencias significativas entre los grupos *Hp*+/Helmintos- y *Hp*+/Helmintos+. *: $p < 0,05$ (Prueba de χ^2). **: $p < 0,01$ (Prueba U de Mann-Whitney).

IV.2.- Parámetros biométricos generales

Con la finalidad de determinar el estado de salud general de los participantes, se analizaron algunos parámetros biométricos de laboratorio (**Tabla 1**). Un 32% de los participantes presentó cifras de hemoglobina sugestivas de anemia leve, correspondiendo el 85% de ellos a mujeres en edad reproductiva en quienes las anemias leves suelen atribuirse a hipermenorrea, razón por la cual este hallazgo no se consideró un factor relevante que justificara la exclusión de tales pacientes del estudio. En el grupo conformado por los individuos coinfectados por helmintos intestinales, se registraron cifras ligeramente inferiores en la hemoglobina y el hematocrito, muy probablemente asociadas a la anemia que suele acompañar a las helmintiasis crónicas, bien por pérdida hemática (evidente o no) a partir de lesiones del epitelio intestinal, o por la deficiencia de nutrientes que acarrean tales parásitos. En efecto, un individuo parasitado por *Trichuris trichiura*, presentó anemia severa (Hb: 5,4g/dl). Adicionalmente, como era de esperarse, el grupo de individuos con helmintiasis (*Hp*+/helm+) presentó valores significativamente más elevados de eosinófilos en sangre periférica, diferencia que se explica tanto por la eosinofilia que suele acompañar a las helmintiasis, como por los criterios de exclusión aplicados para la selección de los pacientes que conformaron los grupos no parasitados por helmintos (*Hp*-/helm- y *Hp*+/helm-). El resto de las determinaciones de laboratorio realizadas, se encontró dentro del rango normal en los tres grupos de pacientes, lo cual sugiere que el estado de salud general era similar en todos los grupos (**Tabla 1**).

En cuanto a las especies de helmintos intestinales presentes en el grupo de individuos *Hp*+/helm+, predominó el monoparasitismo, siendo los agentes causales *Ascaris lumbricoides* (5 casos), *Trichuris trichiura* (3 casos) y ancilostomídeos (1 caso). En dos pacientes se evidenció infestación simultánea por *Ascaris lumbricoides* + *Trichuris trichiura* (1 caso) y *Ascaris lumbricoides* + *Strongyloides stercoralis* (1 caso). A juzgar por el número de formas evolutivas parasitarias observado en la materia fecal de los pacientes, la mayoría de ellos presentó un parasitismo leve o moderado. No fue posible precisar el tiempo de evolución de la infestación parasitaria.

IV.3.- Hallazgos endoscópicos en el tracto digestivo superior

Al examen endoscópico, todos los pacientes presentaron algún tipo de lesión en la mucosa gástrica (**Tabla 2**). Los hallazgos fueron compatibles sólo con gastropatías no ulcerosas en el 82,7% de los casos, con predominio de las gastropatías congestivas, erosivas y nodulares, y compromiso simultáneo del antro y el corpus gástrico. En relación a las gastropatías congestivas, el término identifica a la mucosa gástrica edematosa, despulida, eritematosa y con red vascular subepitelial visible; diferente a la descripción de la gastropatía congestiva que aparece en la literatura anglosajona, usualmente asociada a la cirrosis hepática con hipertensión portal. Las úlceras gástricas se presentaron con una frecuencia relativamente baja (17,3%), asociadas siempre a algún otro patrón endoscópico de lesión mucosal. En sólo dos pacientes se demostró la presencia de reflujo biliar duodeno-gástrico, ambos pertenecientes al grupo control (*Hp*-).

Tabla 2.- Tipos de lesiones gástricas diagnosticadas endoscópicamente, según el estado de infección por *H. pylori* y helmintos intestinales.

Diagnóstico endoscópico	**Grupos estudiados: N° de casos (%)**					
	Hp-/Helm–		*Hp*+/Helm-		*Hp*+/Helm+	
Estómago con aspecto patológico	**17**	**(100,0)**	**18**	**(100,0)**	**11**	**(100,0)**
Gastropatías no ulcerosas	15	(88,2)	15	(83,3)	8	(72,7)
Gastropatía congestiva	9	(52,9)	13	(72,2)	5	(45,5)
Gastropatía erosiva	6	(35,3)	9	(50,0)	6	(54,5)
Gastropatía nodular*	1	(5,9)	4	(22,2)	5	(45,5)
Gastropatía eritematosa	2	(11,8)	2	(11,1)	1	(9,1)
Gastropatía hemorrágica	1	(5,9)	0	(0,0)	0	(0,0)
Gastropatía reticular	0	(0,0)	1	(5,6)	0	(0,0)
Úlcera gástrica[a]	2	(11,8)	3	(16,7)	3	(27,3)

Hp: *H. pylori*. Helm: helmintos. *: $p < 0,05$ a expensas del grupo *Hp*+/helm+ (Prueba de χ^2). [a]:Cualquier localización gástrica, número y severidad. Algunos pacientes presentaron más de un hallazgo endoscópico.

La frecuencia de algunos patrones endoscópicos varió entre los grupos estudiados: la gastropatía congestiva se presentó más frecuentemente en el grupo *Hp*+/Helm-, mientras que la gastropatía nodular se presentó con mayor frecuencia en los grupos *Hp*+, especialmente, en los infestados por helmintos ($p < 0,05$). Por otra parte, la frecuencia de úlceras gástricas no varió significativamente, aunque se observó una tendencia a un mayor número de casos entre los individuos *Hp*+ (**Tabla 2**).

En el 54,3% de los pacientes se evidenció un solo patrón endoscópico de lesión gástrica, mientras que en el 45,7% restante se distinguieron patrones múltiples, siendo más frecuente la combinación congestivo-nodular. Entre los grupos, el número de patrones endoscópicos sugestivos de gastropatía varió significativamente, observándose una mayor frecuencia de patrones múltiples entre los individuos infectados por *H. pylori*, particularmente entre los no coinfectados por helmintos ($p < 0,05$) (**Tabla 3**).

Tabla 3.- Número de patrones endoscópicos sugestivos de gastropatías no ulcerosas, según el estado de infección por *H. pylori* y helmintos intestinales.

Número de patrones endoscópicos	**Grupos estudiados: N° de casos (%)**					
	Hp-/Helmintos–		*Hp*+/Helmintos-		*Hp*+/Helmintos+	
Un patrón	14	(82,4)	6	(33,3)	5	(45,5)
Dos patrones	3	(17,6)	12	(66,7)	5	(45,5)
Tres patrones	-	-	-	-	1	(9,1)

Hp: *H. pylori.* El número de patrones endoscópicos varió significativamente entre los grupos a expensas de un mayor porcentaje de pacientes con múltiples patrones sugestivos de lesión en el grupo *Hp*+/helm- ($p < 0,05$. Prueba de χ^2).

En la región duodenal, la frecuencia de patrones endoscópicos sugestivos de lesión resultó inferior a la del estómago (54,3% vs. 100%), registrándose una mayor frecuencia de lesiones en el grupo de pacientes con helmintiasis, la cual no fue estadísticamente significativa (**Tabla 4**). En concordancia con lo descrito

en la mucosa gástrica, en esta porción del tubo digestivo también se observaron diferentes patrones de lesión, con predominio de las duodenopatías congestivas, granulares y erosivas. Únicamente la duodenopatía granular se presentó con frecuencia significativamente diferente entre los grupos de pacientes, siendo mayor en los individuos *Hp*+ ($p < 0,05$). Las úlceras pépticas de localización duodenal resultaron infrecuentes (2,2% del total), registrándose sólo un caso, correspondiente a un individuo *Hp*+/helm-, quien además presentaba una pangastropatía de patrón combinado (congestivo y erosivo), así como úlceras gástricas antrales tipo Forrest III.

Tabla 4.- Lesiones duodenales diagnosticadas endoscópicamente, según el estado de infección por *H. pylori* y helmintos.

Diagnóstico Endoscópico	**Grupos estudiados: N° de casos (%)**					
	Hp-/Helm–		*Hp*+/Helm-		*Hp*+/Helm+	
Duodeno con Aspecto Patológico	**8**	**(47,1)**	**9**	**(50,0)**	**8**	**(72,7)**
Duodenopatía congestiva	3	(17,6)	3	(16,7)	1	(9,1)
Duodenopatía granular*	1	(5,9)	4	(22,2)	5	(45,5)
Duodenopatía erosiva	2	(11,8)	2	(11,1)	2	(18,2)
Duodenopatía eritematosa	1	(5,9)	0	(0,0)	0	(0,0)
Duodenopatía de aspecto parasitario	1	(5,9)	3	(16,7)	1	(9,1)
Duodenopatía con puntillado blanquecino	4	(23,5)	7	(38,9)	0	(0,0)
Úlcera duodenal[a]	0	(0,0)	1	(5,6)	0	(0,0)

Hp: *H. pylori*. *: diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el número de casos con el respectivo diagnóstico entre los grupos, particularmente a expensas del grupo *Hp*+/helmintos+ (Prueba de χ^2). [a] Cualquier localización duodenal, número y severidad. Algunos pacientes presentaron más de un hallazgo endoscópico.

IV.4.- Hallazgos histopatológicos en la mucosa gástrica

El estudio histopatológico de las secciones de tejido mucosal gástrico fue realizado en las biopsias antrales de todos los pacientes, así como en las biopsias provenientes del corpus gástrico de 44 de ellos (95,6%), puesto que en dos de los pacientes coinfectados por *H. pylori* y alguna especie de helminto intestinal, no fue posible obtener esta biopsia.

IV.4.1.- Hallazgos histopatológicos en la mucosa gástrica antral

Los resultados derivados del análisis histopatológico de las biopsias de la mucosa gástrica antral, por grupos, se presentan en la **Tabla 5**. En 7 individuos pertenecientes al grupo no infectado por *H. pylori* (41,2% de ese grupo; 15,2% del total de pacientes), se describió una mucosa histológicamente normal. En el resto de los individuos (84,8%) se evidenció un infiltrado de células mononucleares linfoplasmocitarias a nivel de la lámina propia, compatible con el diagnóstico de gastritis crónica. Ésta se acompañó de evidencias de atrofia mucosal (pérdida aparente de glándulas gástricas) de severidad variable, en un 63% de los casos, los cuales fueron diagnosticados como gastritis crónica atrófica. La distribución de este tipo de gastritis varió entre los grupos de pacientes, presentando una frecuencia significativamente mayor entre los infectados por *H. pylori* ($p < 0,01$). En cuanto a la intensidad de la infiltración por células mononucleares (el criterio utilizado para describir la severidad de la gastritis crónica), ésta resultó moderada en la mayoría de los pacientes *H. pylori*-positivos, en contraste con los *H. pylori* negativos, quienes presentaron únicamente inflamación crónica leve ($p < 0,01$). Por otra parte, se evidenció actividad inflamatoria (inflamación caracterizada por la infiltración de la mucosa por leucocitos polimorfonucleares) predominantemente de grado leve, en el 32,6% de los individuos estudiados, todos pertenecientes a los grupos con infección por *H. pylori*. Otros hallazgos histopatológicos menos frecuentes, fueron: los acúmulos linfocitarios (23,9%), la fibrosis leve (32,6%) y las erosiones del epitelio superficial (4,3%). Ninguno de los pacientes presentó metaplasia intestinal en el antro gástrico.

Tabla 5.- Hallazgos histopatológicos en la mucosa gástrica antral de los pacientes, según el estado de infección por *H. pylori* y helmintos intestinales.

Hallazgos histopatológicos en el antro gástrico	**Grupos de individuos estudiados - N° (%)**					
	Hp-/Helmintos –		*Hp*+/Helmintos-		*Hp*+/Helmintos+	
Mucosa normal	7	(41,2)	-	-	-	-
Gastritis crónica (GC)*	10	(58,8)	18	(100,0)	11	(100,0)
GC no atrófica	4	(23,5)	4	(22,2)	2	(18,2)
GC atrófica	6	(35,3)	14	(77,8)	9	(81,8)
Grado de infiltración mononuclear**						
Leve	10	(100,0)	1	(5,6)	-	-
Moderada	-	-	15	(83,3)	10	(90,9)
Acentuada	-	-	2	(11,1)	1	(9,1)
Grado de atrofia						
Leve	5	(83,3)	5	(35,7)	1	(11,1)
Moderada	1	(16,7)	7	(50,0)	7	(77,8)
Acentuada	-	-	2	(14,3)	1	(11,1)
Infiltrado polimorfonuclear**						
Ausente	17	(100,0)	11	(61,1)	3	(27,3)
Presente	-	-	7	(38,9)	8	(72,7)
Grado de actividad inflamatoria						
Leve	-	-	3	(42,8)	6	(75,0)
Moderada	-	-	2	(28,6)	1	(12,5)
Acentuada	-	-	2	(28,6)	1	(12,5)
Acúmulos linfocitarios						
Ausentes	17	(100,0)	11	(61,1)	7	(63,6)
Presentes	-	-	7	(38,9)	4	(36,4)
Fibrosis[a]						
Ausente	14	(82,4)	9	(50,0)	8	(72,7)
Presente	3	(17,6)	9	(50,0)	3	(27,3)
Erosiones						
Ausentes	17	(100,0)	16	(88,9)	11	(100,0)
Presentes	-	-	2	(11,1)	-	-
Grado de colonización por *Hp*[b]						
Escasa	-	-	9	(64,3)	4	(44,5)
Moderada	-	-	5	(35,7)	3	(33,3)
Abundante	-	-	-	-	2	(22,2)

Hp: *H. pylori*. * y**: diferencias significativas al comparar los 3 grupos de pacientes. *: $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. [a]: diferencia significativa ($p < 0,05$) sólo al comparar los pacientes *Hp*+/helmintos- con los pacientes *Hp*-/helmintos-. (Prueba de χ^2). [b] En algunos pacientes *Hp*+ no se detectó la presencia del microorganismo en el antro gástrico al estudio histopatológico, a pesar de haber presentado un cultivo positivo.

Tal como puede evidenciarse en las cifras anteriores, algunos hallazgos histopatológicos antrales difirieron significativamente entre los grupos de pacientes en función de la infección por *H. pylori*, presentando elementos indicativos de una mayor severidad de la gastritis en los pacientes infectados, en comparación con los no infectados. Aun cuando algunos aspectos histopatológicos, como la gastritis crónica atrófica y la actividad inflamatoria, se presentaron con mayor frecuencia en el grupo coinfectado por helmintos, tales diferencias no fueron estadísticamente significativas al comparar estos pacientes con los infectados sólo por *H. pylori*. La atrofia antral no se correlacionó con la edad de los pacientes en ninguno de los grupos.

En cuanto a la severidad de la infección por *H. pylori*, determinada mediante la visualización de la morfología bacilar característica del microorganismo en los cortes histológicos de la mucosa gástrica antral, ésta no difirió significativamente entre los grupos, aunque tendió a ser ligeramente mayor en los pacientes *Hp*+/helm+. Además, la carga bacteriana antral no se correlacionó con el grado de infiltración mononuclear o polimorfonuclear presente en la mucosa del antro gástrico. En seis de los pacientes infectados por *H. pylori*+, el microorganismo no fue visualizado al examen histopatológico, a pesar de haber presentado un cultivo y una prueba de ureasa positivos.

IV.4.2.- Hallazgos histopatológicos en la mucosa del corpus gástrico

En general, los cambios histopatológicos se presentaron con una frecuencia y grado de severidad ligeramente menor en la mucosa del corpus gástrico, en comparación con lo descrito en la región antral. Considerando el total de los pacientes, el infiltrado mononuclear indicativo de inflamación crónica se observó en un 68,2%, los signos de atrofia glandular en un 43,2% y las evidencias de actividad inflamatoria en un 27,3% de los casos; tales hallazgos fueron generalmente de grado leve o moderado. Los acúmulos linfocitarios y la fibrosis leve fueron hallazgos infrecuentes en el corpus gástrico, al igual que en el antro.

Tabla 6.- Hallazgos histopatológicos en el corpus gástrico de los pacientes, según el estado de infección por *H. pylori* y helmintos.

Hallazgos histopatológicos en el corpus gástrico	**Grupos de individuos estudiados N° (%)**					
	Hp-/Helmintos –		*Hp*+/Helmintos-		*Hp*+/Helmintos+	
Mucosa normal	11	(64,8)	1	(5,6)	2	(22,2)
Gastritis crónica (GC)**	6	(35,2)	17	(94,4)	7	(77,8)
GC no atrófica	3	(17,6)	4	(22,2)	4	(44,4)
GC atrófica	3	(17,6)	13	(72,2)	3	(33,4)
Grado de infiltración mononuclear						
Leve	5	(83,3)	4	(23,5)	3	(42,9)
Moderada	1	(16,7)	12	(70,6)	4	(57,1)
Acentuada	-	-	1	(5,9)	-	-
Grado de atrofia						
Leve	1	(33,3)	4	(30,8)	1	(33,3)
Moderada	2	(66,7)	9	(69,2)	2	(66,7)
Infiltrado polimorfonuclear*						
Ausente	16	(94,1)	12	(66,7)	4	(44,4)
Presente	1	(5,9)	6	(33,3)	5	(55,6)
Grado de actividad inflamatoria						
Leve	1	(100,0)	2	(33,3)	3	(60,0)
Moderada	-	-	3	(50,0)	2	(40,0)
Acentuada	-	-	1	(16,7)	-	-
Metaplasia intestinal						
Ausente	17	(100,0)	16	(88,9)	9	(100,0)
Presente	-	-	2	(11,1)	-	-
Acúmulos linfocitarios**						
Ausentes	17	(100,0)	12	(66,7)	9	(100,0)
Presentes	-	-	6	(33,3)	-	-
Fibrosis						
Ausente	16	(94,1)	13	(72,2)	9	(100,0)
Presente	1	(5,9)	5	(27,8)	-	-
Grado de colonización por *Hp*[a]						
Escasa	-	-	6	(54,5)	6	(75,0)
Moderada	-	-	5	(45,5)	2	(25,0)

*y**: diferencias significativas entre los 3 grupos de pacientes. *: $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Prueba de χ^2). [a] En algunos pacientes *Hp*+ no se detectó la presencia del microorganismo en el corpus gástrico al estudio histopatológico.

En concordancia con lo descrito en la región antral gástrica, en la mucosa del corpus se registraron diferencias significativas entre los pacientes *H. pylori*-negativos y los *H. pylori*-positivos (**Tabla 6**). Estos últimos presentaron mayor frecuencia de gastritis crónica atrófica, de actividad inflamatoria y de acúmulos linfocitarios. Adicionalmente, dentro de este grupo se detectaron dos pacientes con metaplasia intestinal (de grados leve y moderado, respectivamente).

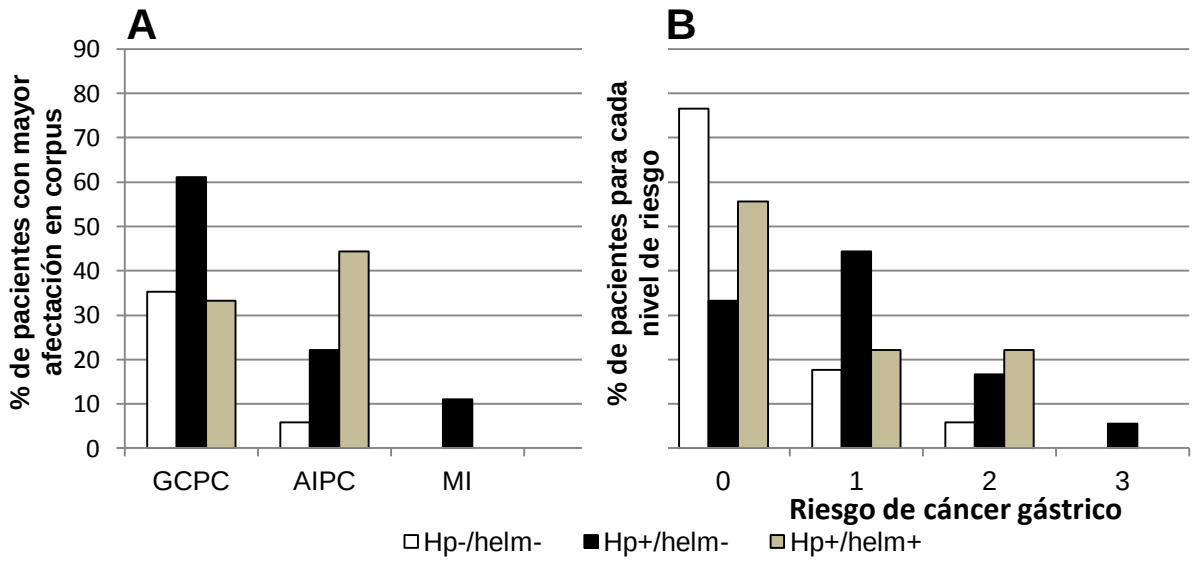
Es importante resaltar que casi todos los parámetros histopatológicos evaluados, especialmente, la gastritis crónica atrófica, se presentaron con menor frecuencia y/o menor grado de severidad en la mucosa del corpus gástrico del grupo coinfectado por parásitos. Al igual que lo descrito en el antro, el grado de colonización del corpus gástrico por *H. pylori* no varió significativamente en función de la infección por helmintos, siendo predominantemente leve en los dos grupos *Hp*+. Además, este tampoco se correlacionó con el grado de inflamación crónica. Sin embargo, en el grupo sin coinfección helmíntica, la intensidad de la colonización se correlacionó con el grado de actividad inflamatoria en el corpus gástrico (r = 0,894; $p < 0,05$)

IV.4.3.- Distribución topográfica predominante de la gastritis e índice de riesgo para cáncer gástrico

Se realizó la comparación del grado de gastritis, actividad inflamatoria y presencia de metaplasia intestinal, en las biopsias provenientes de la mucosa antral y corporal gástrica de los pacientes de cada grupo, a fin de identificar la distribución topográfica predominante de la gastritis, en el antro o en el corpus gástrico, y el índice de riesgo para cáncer gástrico. Los resultados de este análisis, se presentan en el **Gráfico 1**.

Aunque no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos de pacientes, es importante resaltar que el grupo *Hp*+/helm-, fue el único en presentar casos con metaplasia intestinal (a nivel del corpus gástrico), además de registrar una proporción mayor de individuos con gastritis predominantemente corporal (61,1%) (**Gráfico 1-A**).

Gráfico 1.- Parámetros indicativos de la distribución topográfica de la gastritis, e índice de riesgo para cáncer gástrico en los grupos de pacientes.



A: Parámetros indicativos de la distribución topográfica de la gastritis. GCPC= gastritis crónica predominantemente corporal. AIPC= actividad inflamatoria predominantemente corporal. MI= metaplasia intestinal. Las diferencias entre los grupos de pacientes no fueron significativas ($p > 0,05$). (Prueba de χ^2).
B: Índice de riesgo de cáncer gástrico. Media calculada para el índice de riesgo de cáncer gástrico por grupos: *Hp*-/helm-: 0,29; *Hp*+/helm-: 0,94; *Hp*+/helm+: 0,67. El riesgo calculado para el grupo infectado sólo por *H. pylori* difirió significativamente del riesgo para el grupo no infectado ($p < 0,05$, Prueba U de Mann-Whitney).

En líneas generales, el índice de riesgo para cáncer gástrico resultó bajo en la muestra poblacional estudiada, correspondiéndole valores ubicados entre 0 y 1 al 84,1% de los pacientes (**Gráfico 1-B**). Al comparar el índice de riesgo entre los grupos de pacientes, éste osciló entre 0 y 2, tanto para los *Hp*-/helm-, como para los *Hp*+/helm+, siendo sus valores promedio 0,29 y 0,67, respectivamente ($p > 0,05$). En contraste, el riesgo de cáncer osciló entre 0 y 3 en el grupo *Hp*+/helm-, con un promedio de 0,94, siendo significativamente mayor que el calculado para el grupo control no infectado ($p < 0,05$).

IV.4.4.- Correlación entre los hallazgos histopatológicos y los hallazgos endoscópicos

No se evidenció correlación entre el tipo de gastropatía diagnosticada endoscópicamente (ulcerosa o no ulcerosa) y el grado de infiltración por células inflamatorias en la mucosa gástrica. Sin embargo, se obtuvo una correlación positiva significativa entre el grado de inflamación crónica y activa, tanto en el antro como en el corpus gástrico, y dos de los parámetros endoscópicos descritos en estos pacientes: el número de patrones de lesión mucosal y la gastropatía de tipo nodular. Al considerar sólo los pacientes infectados por *H. pylori*, las correlaciones fueron significativas especialmente en el corpus gástrico. En estos pacientes se detectó además una correlación entre la gastropatía nodular y el grado de colonización por *H. pylori* en ambas regiones de la mucosa gástrica. Algunas de estas correlaciones se hicieron también evidentes al analizar los grupos de pacientes separadamente, en función de la coinfección helmíntica (**Tabla 7**).

Tabla 7.- Correlación entre los hallazgos endoscópicos y los histopatológicos.

Hallazgos endoscópicos e histopatológicos	**Grupos de pacientes**					
	Total de *Hp*+		*Hp*+/helm-		*Hp*+/helm+	
	r	p	*r*	P	*r*	P
N° de patrones endoscópicos y:						
- GIPMN antral	0,415	*	-	-	-	-
- GIMN en el corpus	0,455	*	-	-	-	-
- GIPMN en el corpus	0,532	**	0,489	*	0,678	*
- Densidad de *Hp* en el corpus	-	-	-	-	0,671	*
Gastropatía de tipo nodular :						
- GIPMN antral	-	-	-	-	0,737	*
- Densidad de *Hp* en el antro	0,422	*	-	-	-	-
- GIMN en el corpus	0,426	*	-	-	0,926	**
- GIPMN en el corpus	0,460	*	-	-	0,833	**
- Densidad de *Hp* en el corpus	0,463	*	-	-	-	-

GIMN: grado de infiltración mononuclear. GIPMN: grado de infiltración polimorfonuclear. *Hp*: *H. pylori*. *p < 0,05. **p< 0,01. (Coeficiente de correlación de Spearman). Al considerar el total de los pacientes, las correlaciones son todas significativas, por la diferencia clara entre los *Hp*- y los *Hp*+, por tal razón se incluyó en el total de pacientes sólo a los *Hp*+.

IV.5.- Expresión de las citocinas en la mucosa gástrica antral

El análisis de la respuesta inmunitaria se fundamentó en la cuantificación de la expresión local de citocinas, mediante inmunotinción con peroxidasa en cortes de tejidos parafinados. Se estudió la mucosa del antro gástrico, por ser este el nicho natural para la colonización por *H. pylori* y, por lo tanto, donde podrían ponerse en evidencia, con mayor probabilidad y en estadios más tempranos de la infección, los efectos del microorganismo sobre la respuesta inmunitaria del hospedador. Se analizaron citocinas proinflamatorias y asociadas a la respuesta inmunitaria tipo Th1 (IL-1β, TNF-α e IFN-γ, respectivamente), así como una citocina antiinflamatoria, asociada a la respuesta tipo Th2 (IL-4).

IV.5.1.- Análisis descriptivo-semicuantitativo

IV.5.1.1.- Localización de la inmunorreactividad para las citocinas

Todas las citocinas se expresaron en algún grado, tanto en las células del epitelio superficial (en algunos casos también en el glandular), como en las células inflamatorias infiltrantes (mononucleares o polimorfonucleares) presentes en el epitelio y/o en la lámina propia de la mucosa antral. En la mayoría de los pacientes, las citocinas se localizaron en la región más superficial de la mucosa, mientras que la inmunorreactividad rara vez se observó por debajo del tercio distal (luminal) de ésta (**Figura 3**).

Las cuatro citocinas se expresaron predominantemente a nivel de las células epiteliales, por lo que en más del 50% de los pacientes el grado de positividad epitelial superó al registrado en la lámina propia mucosal (**Gráfico 2**). Tales hallazgos resultaron más evidentes para la IL-4, observándose una expresión predominantemente epitelial en el 71,7% de los individuos ($p > 0,05$). La inmunorreactividad en la lámina se observó generalmente en las adyacencias de las células epiteliales superficiales.

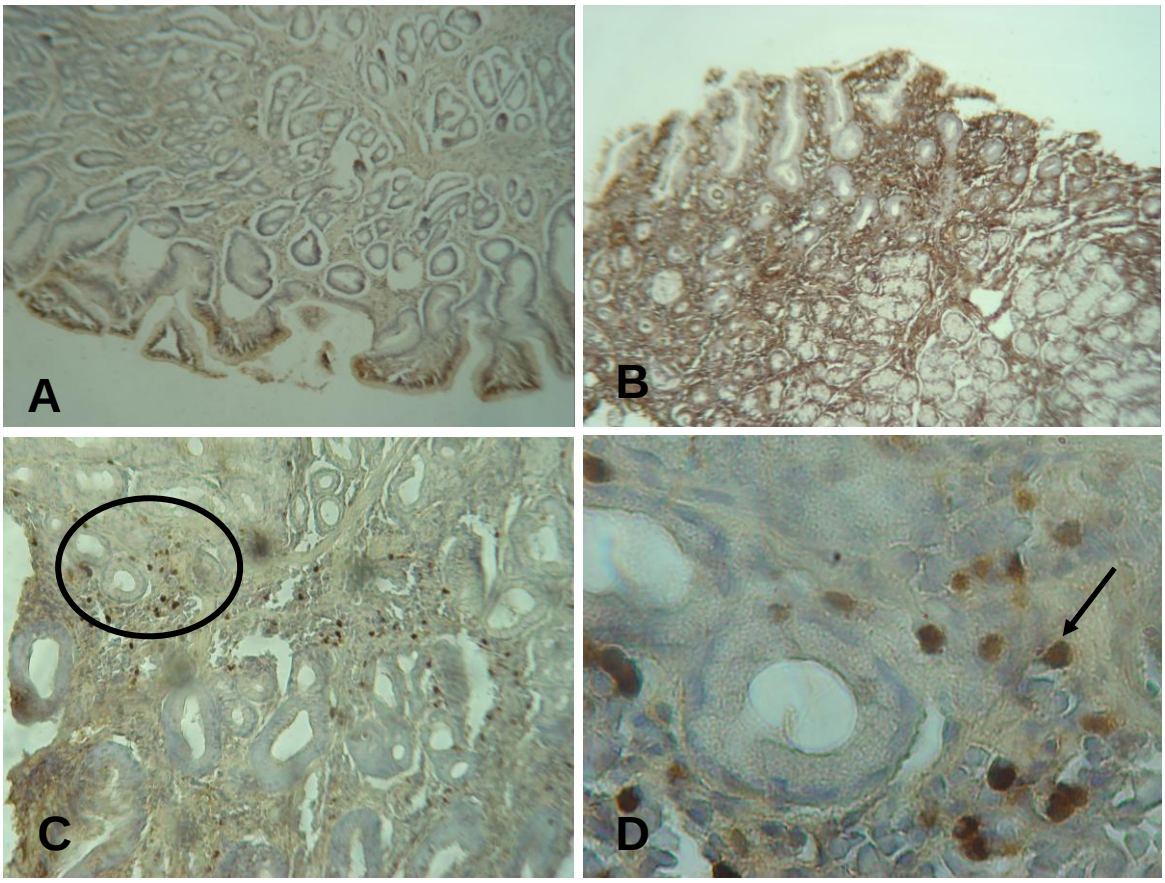
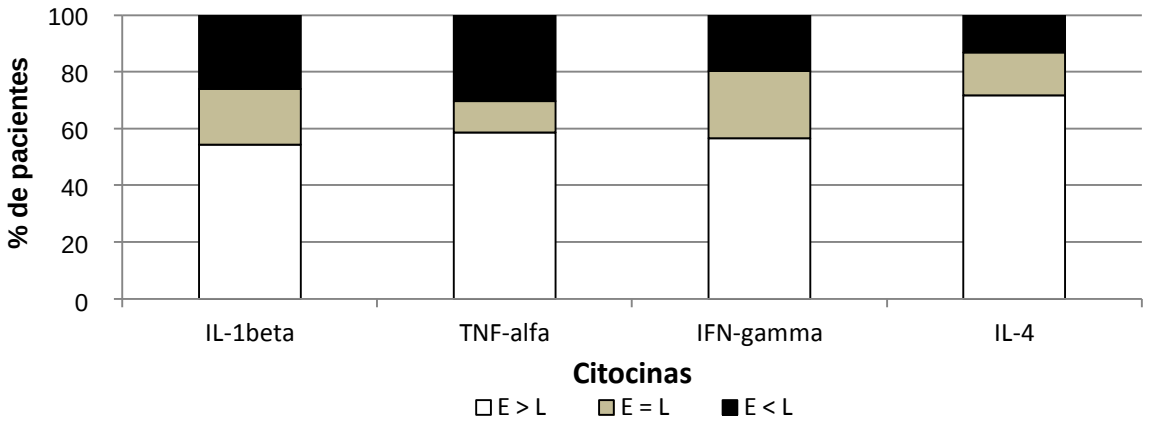


Figura 3.- A: Expresión de IL-1β predominante en el epitelio superficial de la mucosa antral de un paciente *Hp*-/helm-. **B:** Expresión de IL-1β en el epitelio y la lámina propia de un paciente *Hp*+/helm-. **C:** Expresión de IL-1β predominante en el infiltrado inflamatorio de un paciente *Hp*+/helm- (óvalo) (100X). **D:** Imagen a mayor aumento de un segmento de la fotografía K, donde se observa la expresión de IL-1β en el infiltrado inflamatorio de un paciente *Hp*+/helm- (flecha) (400X).

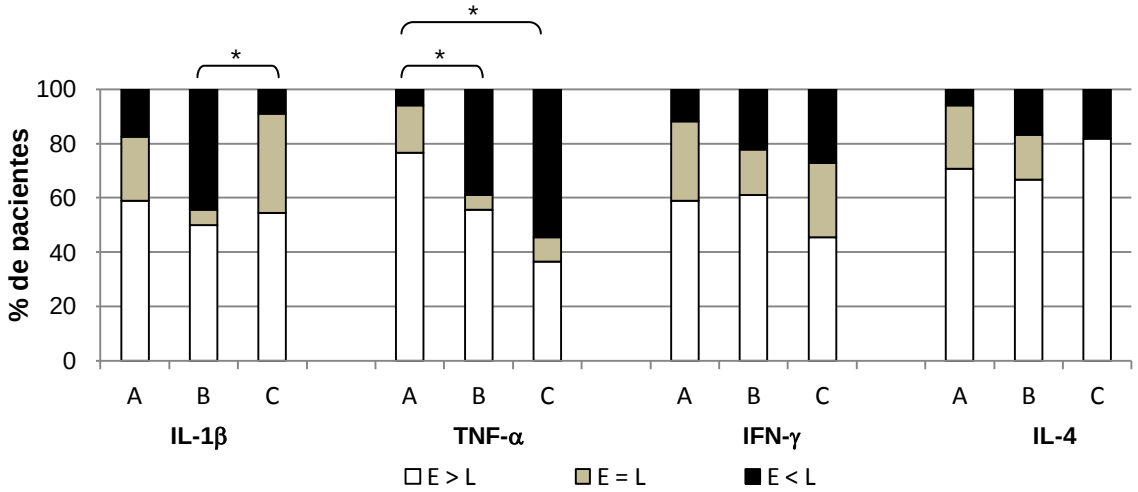
Gráfico 2.- Localización predominante de las citocinas en la mucosa gástrica antral



E: epitelio; L: lámina propia. Todas las citocinas se expresaron predominantemente a nivel del epitelio ($p > 0,05$; Prueba de χ^2).

Al analizar la localización predominante de las citocinas en los diferentes grupos de pacientes, se obtuvieron resultados similares a los evidenciados en la totalidad de los mismos (**Gráfico 3**). Sin embargo, la infección por *H. pylori* aumentó la expresión del TNF-α en la lámina propia y el efecto fue aún más acentuado en los pacientes con infestación helmíntica. Por otra parte, el grado de inmunorreactividad para la IL-1β también tendió a incrementarse en la lámina propia de los pacientes infectados sólo por *H. pylori*, mientras que en los coinfectados, la expresión de esta citocina predominó nuevamente en el epitelio.

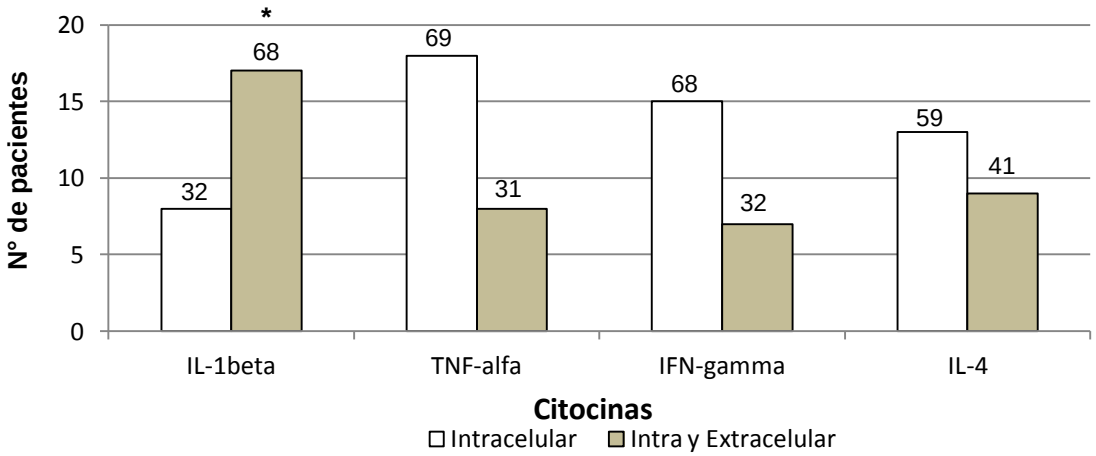
Gráfico 3.- Comparación de la inmunorreactividad para las citocinas en el epitelio y la lámina propia mucosal gástrica de los grupos de pacientes, según el análisis descriptivo.



A: grupo *Hp*-/helm-. **B:** grupo *Hp*+/helm-. **C:** Grupo *Hp*+/helm+. **E:** epitelio. **L:** lámina propia. * $p < 0,05$. (Prueba de χ^2).

En la lámina propia, todas las citocinas exhibieron dos modalidades de expresión: una tinción netamente intracelular, restringida al citoplasma de las células inflamatorias (mononucleares y granulocitos polimorfonucleares) y una fuerte tinción de la lámina propia completa, sugestiva de la presencia de la citocina en la matriz extracelular. En líneas generales, considerando la totalidad de los pacientes, la expresión del TNF-α, el IFN-γ y la IL-4 predominó en el compartimiento intracelular (69, 68 y 59%, respectivamente), mientras que la expresión de la IL-1β presentó con mayor frecuencia la dualidad intra y extracelular (68,0%) ($p < 0,05$) (**Gráfico 4**).

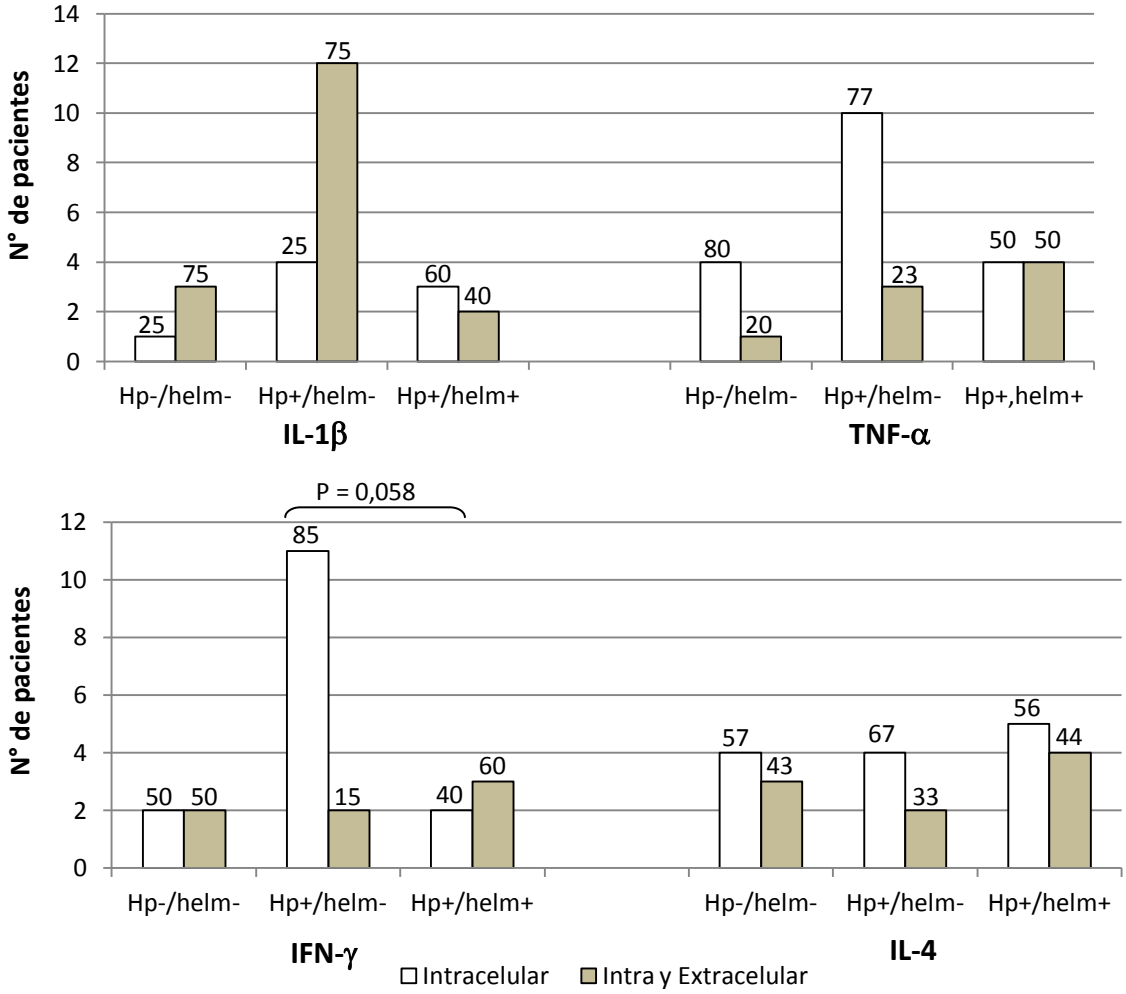
Gráfico 4- Localización de las citocinas en la lámina propia de la mucosa gástrica antral.



Los números sobre las barras indican los porcentajes para cada categoría. La frecuencia de localización mixta, intra y extracelular, fue mayor para la IL-1β que para el resto de las citocinas. * $p < 0,05$ (Prueba de χ^2).

Al comparar los tres grupos de pacientes, en cuanto a la localización predominante de la inmunorreactividad para las citocinas en la lámina propia (**Gráfico 5**), no se observaron diferencias significativas, sino sólo discretas tendencias: tanto la expresión del IFN-γ (en el grupo *Hp*+/helm-) como la de la IL-1β (en el grupo *Hp*+/helm+) fue a predominio intracelular mientras que, en este último grupo, el TNF-α tendió a presentar una mayor expresión extracelular.

Gráfico 5.- Localización de las citocinas en la lámina propia de la mucosa gástrica antral, según el estado de infección por *H. pylori* y helmintos.



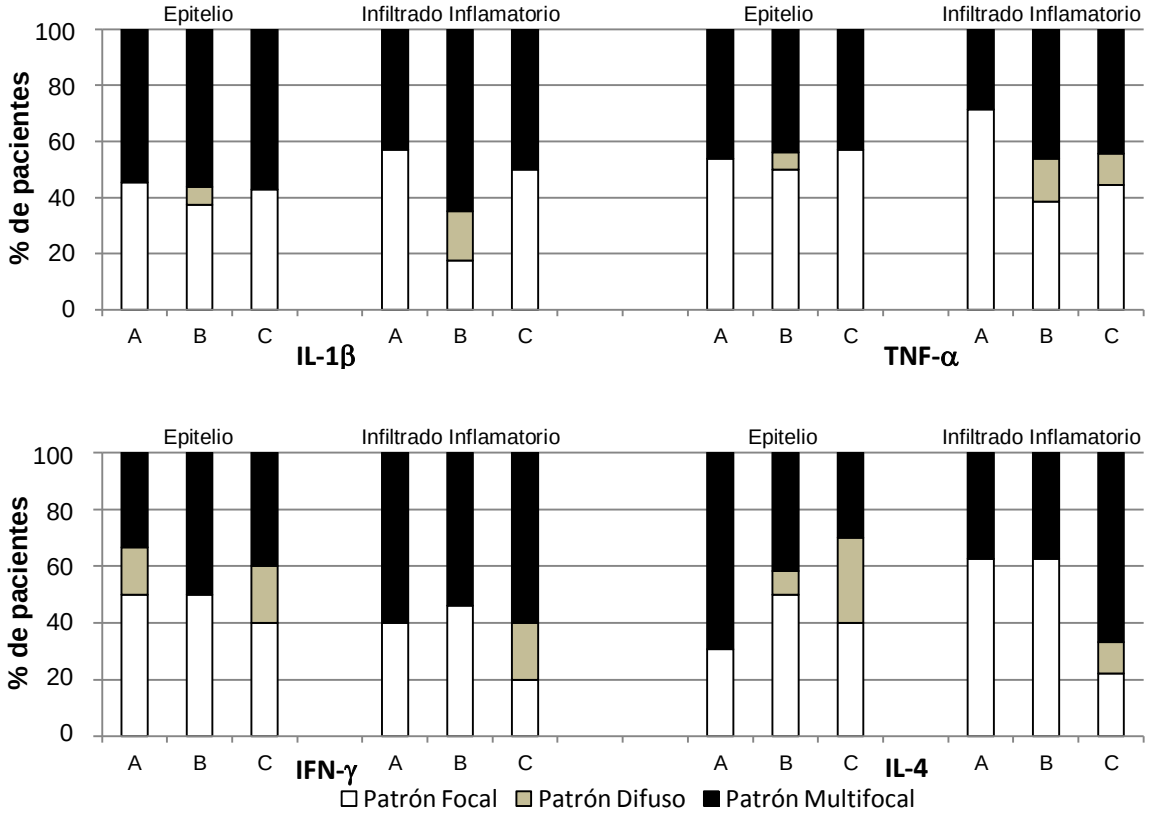
Los números sobre las barras indican los porcentajes para cada categoría. No se observaron diferencias al comparar los grupos de pacientes ($p > 0,05$). Se indica el único valor de p que resultó cercano a la significancia estadística. (Prueba de χ^2).

IV.5.1.2.- Patrón de distribución de la expresión de las citocinas

La distribución de la expresión de las citocinas en el epitelio y en el infiltrado inflamatorio mucosal de cada corte de tejido analizado, presentó variaciones entre los pacientes, distinguiéndose tres patrones bastante definidos: un patrón de distribución focal, caracterizado por una sola área de concentración de la tinción; un patrón de distribución multifocal (disperso), con dos o más áreas de concentración de la tinción; y un patrón de distribución difuso, caracterizado por abarcar amplias zonas del corte evaluado (**Figuras 4 y 5**). Los dos primeros

patrones se observaron con frecuencias similares, mientras que el patrón difuso se visualizó en pocos casos. La distribución de la expresión de las citocinas tendió a guardar relación con el grado de expresión de las mismas, de tal forma que el patrón focal se correspondió, generalmente, con una inmunorreactividad escasa, mientras que los patrones multifocal y difuso con frecuencia acompañaron a una positividad de mayor intensidad (**Gráfico 6**).

Gráfico 6.- Patrón de expresión de las citocinas en la mucosa gástrica antral.



A: grupo *Hp*-/helmintos-. **B:** grupo *Hp*+/helmintos-. **C:** grupo *Hp*+/helmintos+. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de pacientes, al comparar los patrones de distribución de la expresión de las citocinas ($p > 0,05$. Prueba de χ^2).

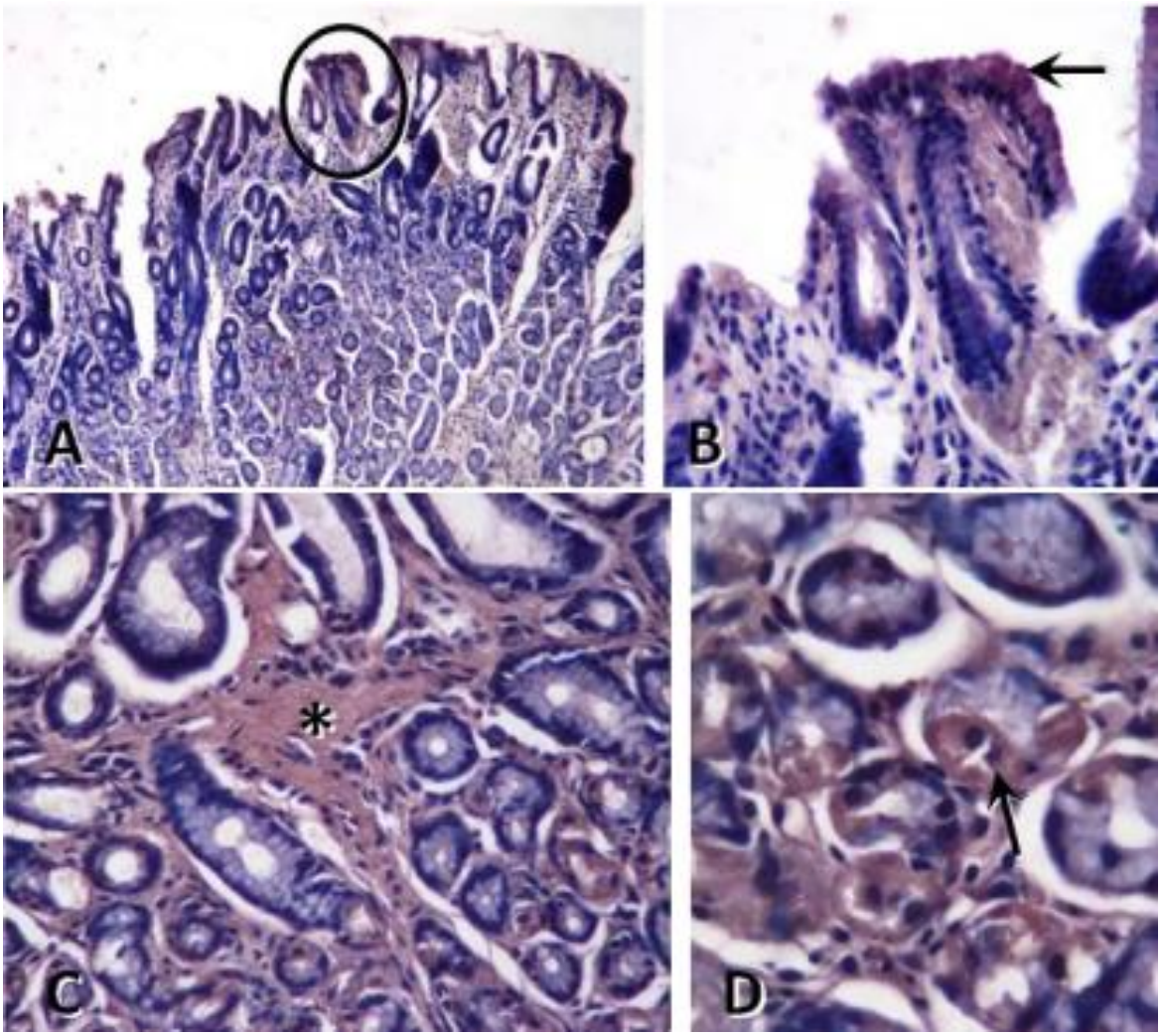


Figura 4.- Patrón de expresión de las citocinas en la mucosa gástrica antral. **A:** Expresión focal de IL-1β en el epitelio superficial (óvalo) (100X). **B:** Imagen a mayor aumento de la microfotografia A, que muestra la expresión focal de IL-1β en el epitelio superficial (flecha) (400X). **C:** Expresión multifocal de TNF-α a nivel de la lámina propia (asterisco) (400X). **D:** Expresión multifocal de TNF-α a nivel de células epiteliales parietales (flecha) (1000X).

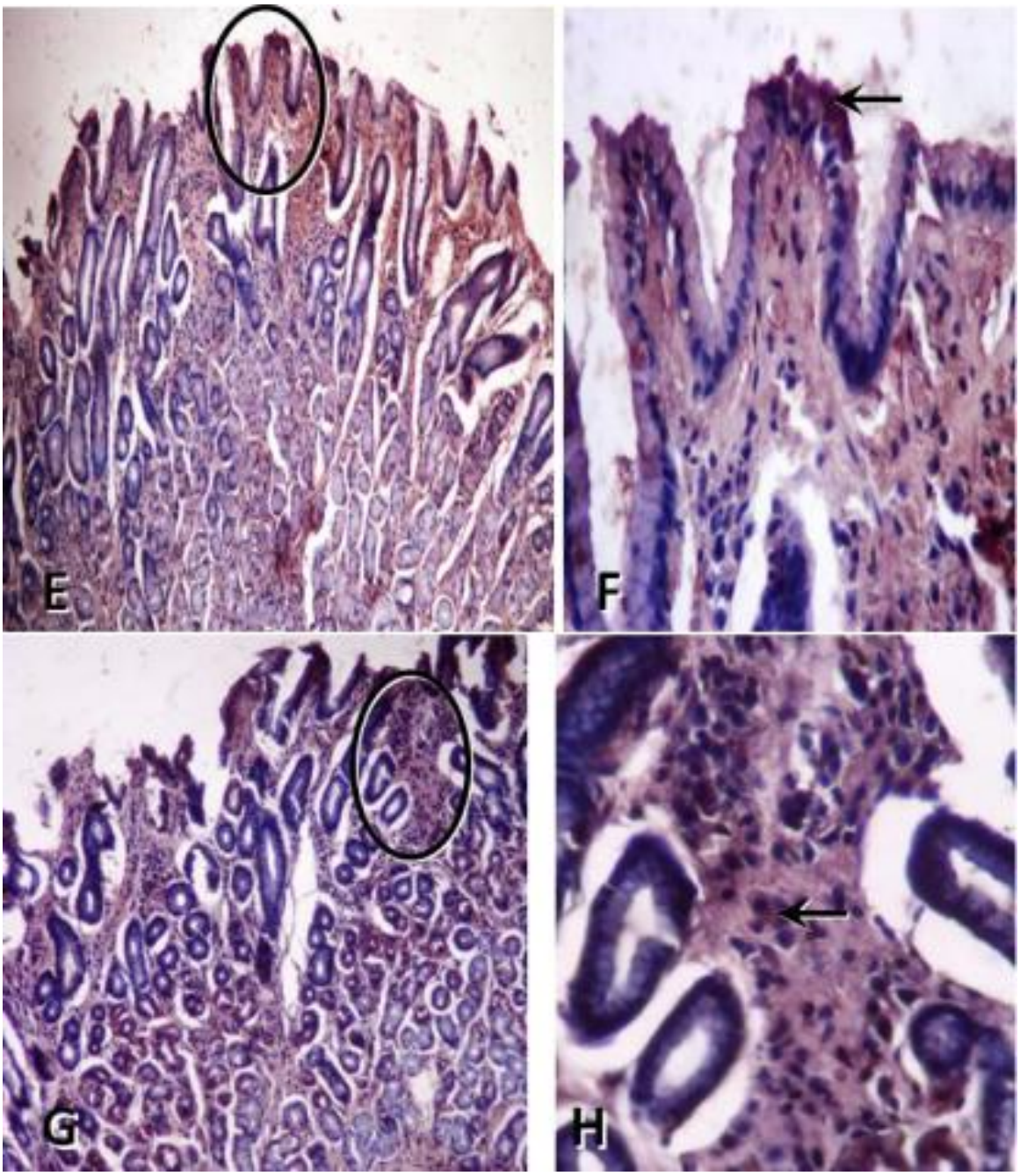
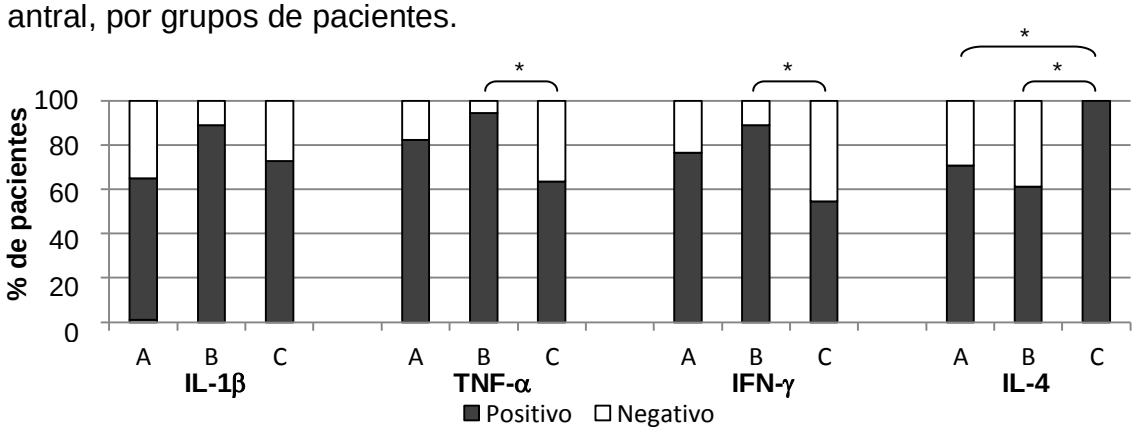


Figura 5.- Patrón de expresión de las citocinas en la mucosa gástrica antral. **E:** Expresión multi-focal de IFN-γ en el epitelio superficial (óvalo) (100X). **F:** Imagen a mayor aumento de la microfotografía E, que muestra la expresión multi-focal de IFN-γ en el epitelio superficial (flecha) (400X). **G:** Expresión multifocal de IL-4 a nivel de la células inflamatorias mononucleares (óvalo) (100X). **F:** Imagen a mayor aumento de la microfotografia G, que muestra la expresión multifocal de IL-4 en las células inflamatorias mononucleares (flecha) (400X).

IV.5.1.3.- Porcentaje de positividad para las citocinas por grupos de pacientes

Todas las citocinas analizadas se expresaron en los tres grupos de pacientes, independientemente del estado de infección por *H. pylori* o helmintos intestinales. En las células epiteliales de la mucosa antral gástrica de los pacientes infectados por *H. pylori*, y también de los no infectados, se evidenció expresión para las cuatro citocinas, inclusive para el IFN-γ y la IL-4. En esta región de la mucosa antral, el grupo de pacientes infectado sólo por *H. pylori* presentó el mayor porcentaje de positividad para las citocinas proinflamatorias así como una menor frecuencia de expresión de la IL-4, aun cuando estas diferencias no resultaron significativas. El porcentaje de positividad varió entre los grupos infectados por *H. pylori* en función de la coinfección helmíntica, evidenciándose una menor frecuencia de expresión de las citocinas proinflamatorias TNF-α e IFN-γ, y una mayor frecuencia de positividad para la antiinflamatoria IL-4 en los individuos con helmintiasis, la cual difirió significativamente tanto del grupo infectado sólo por *H. pylori* como del grupo no infectado (**Gráfico 7**).

Gráfico 7.- Porcentaje de positividad para las citocinas en el epitelio de la mucosa antral, por grupos de pacientes.

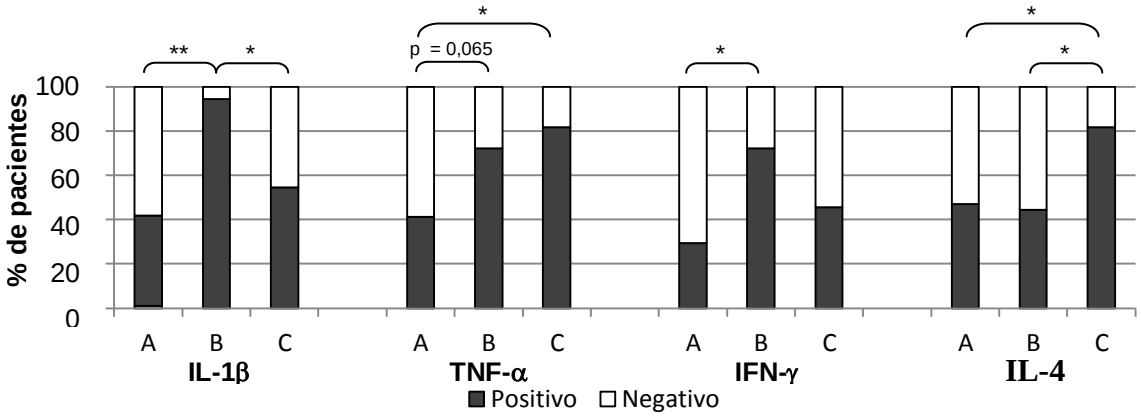


A: *Hp*-/helm-. **B:** *Hp*+/helm-. **C:** *Hp*+/helm+. * $p < 0,05$. (Prueba de χ^2)

En las células del infiltrado inflamatorio resultaron más evidentes los efectos de la infección por *H. pylori*, al incrementarse significativamente la frecuencia de expresión de las tres citocinas proinflamatorias en el grupo infectado sólo por este microorganismo. Asimismo, se constató una disminución significativa en la frecuencia de expresión de la IL-1β, tendencia a la disminución del porcentaje de

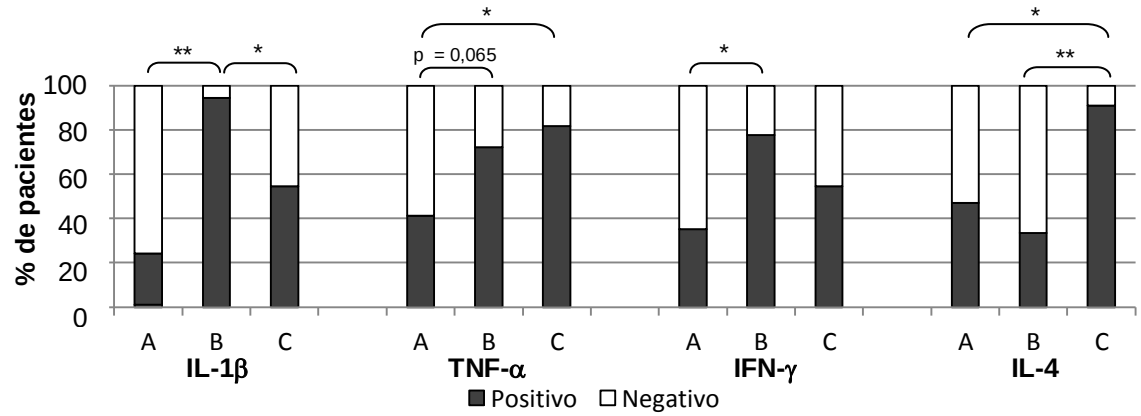
positividad para el IFN-γ y un incremento significativo en el porcentaje de individuos con expresión para la IL-4 en el grupo de pacientes coinfectados por helmintos. Por otra parte, la positividad para TNF-α incrementó en este grupo, en comparación con los individuos delgrupo control no infectado, aunque no varió en comparación con el grupo *Hp*+/helm- (**Gráfico 8**). Resultados similares a los observados en el infiltrado inflamatorio se evidenciaron en la lámina propia de la mucosa antral, donde resultó aun más acentuado el incremento en la frecuencia de expresión de la IL-4 en los pacientes parasitados (**Gráfico 9**).

Gráfico 8.- Porcentaje de positividad para las citocinas en el infiltrado inflamatorio de la mucosa antral, por grupos de pacientes.



A: *Hp*-/helm-. **B:** *Hp*+/helm-. **C:** *Hp*+/helm+. * p < 0,05. ** p < 0,01. Se indica una diferencia con tendencia a la significancia estadística. (Prueba de χ^2)

Gráfico 9.- Porcentaje de positividad para las citocinas en la lámina propia de la mucosa antral, por grupos de pacientes

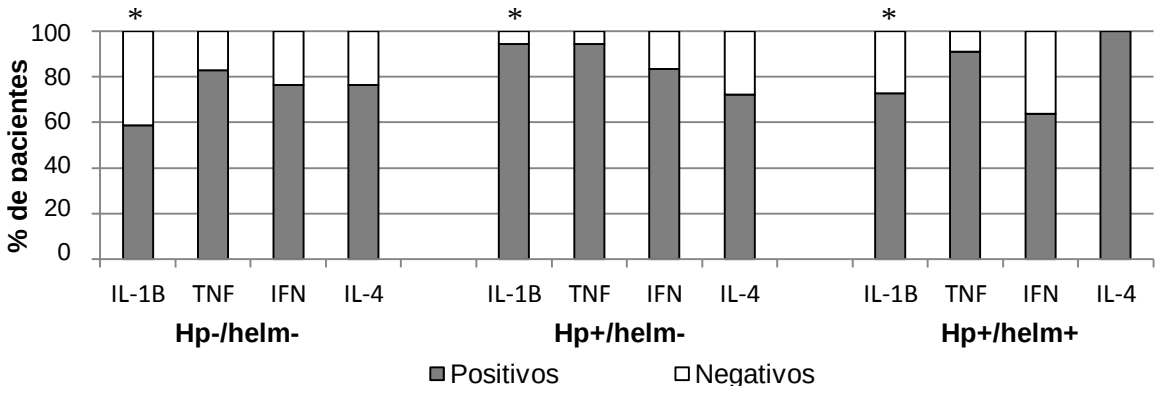


A: *Hp*-/helm-. **B:** *Hp*+/helm-. **C:** *Hp*+/helm+. * p < 0,05. ** p < 0,01. Se indica una diferencia con tendencia a la significancia estadística. (Prueba de χ^2)

Al considerar la positividad global para las citocinas, es decir la suma de la inmunorreactividad observada en las tres áreas detalladas anteriormente (epitelio,

lámina propia o infiltrado inflamatorio), se hizo evidente una alta frecuencia de expresión de las cuatro citocinas en los tres grupos de pacientes (**Gráfico 10**)**.**

Gráfico 10.- Positividad global para la expresión de las citocinas, según el estado de infección por *H. pylori* y helmintos intestinales.



Las diferencias en la frecuencia de positividad para las cuatro citocinas no fueron significativas para ninguno de los grupos de pacientes. *: al comparar el porcentaje de expresión de cada citocina entre los 3 grupos estudiados, hubo diferencias estadísticamente significativas para la IL-1β, a expensas de una mayor positividad en el grupo *Hp*+/helmintos- ($p < 0,05$. Prueba de χ^2).

Aunque se evidenciaron discretas variaciones en los porcentajes de positividad para las diferentes citocinas en cada uno de los grupos de pacientes, las mismas no fueron estadísticamente significativas. Cuando se comparó la frecuencia de expresión de cada citocina en los tres grupos, sólo se obtuvo diferencia para la IL-1β, cuya positividad resultó significativamente superior en el grupo infectado sólo por *H. pylori*.

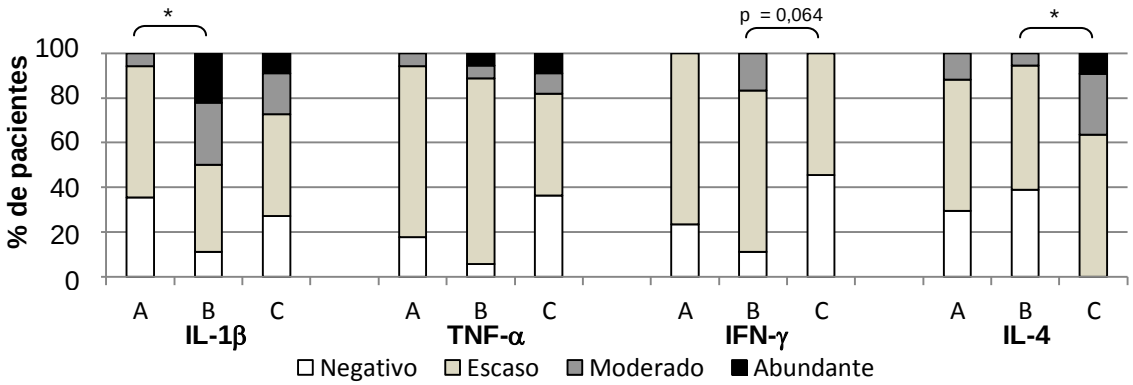
En un intento por detectar posibles patrones de respuesta inmunitaria en los grupos de pacientes, se analizaron las combinaciones de citocinas más frecuentemente observadas. Así, se detectó una positividad simultánea para las cuatro citocinas en una elevada proporción de los individuos pertenecientes a los tres grupos de pacientes: 61% (*Hp*+/helm-), 45% (*Hp*+/helm+) y 29% (*Hp*-/helm-). Otro patrón observado en el grupo infectado sólo por *H. pylori* fue la positividad para las tres citocinas proinflamatorias, en ausencia de expresión de la IL-4. Por el contrario, el grupo coinfectado por helmintos intestinales expresó siempre la IL-4, acompañada de una o dos citocinas proinflamatorias (generalmente TNF

y/o IL-1β). Finalmente, el grupo control no infectado por *H. pylori* exhibió una variedad de combinaciones de citocinas, por lo que no resultó posible establecer una tendencia en ese grupo.

IV.5.1.4.- Grado de expresión para las citocinas por grupos de pacientes, de acuerdo al análisis semicuantitativo.

Al analizar el grado de inmunorreactividad para las citocinas en la mucosa gástrica antral, se observó una expresión predominantemente escasa de las cuatro citocinas en los tres grupos de pacientes. Sin embargo, en el epitelio de la mucosa fue evidente una mayor expresión de la IL-1β (moderada o abundante) y la tendencia a una mayor expresión del IFN-γ entre los individuos *Hp*+/helm-, así como una mayor expresión de la IL-4 en los individuos coinfectados por helmintos intestinales, al compararlos con sus respectivos grupos control (**Gráfico 11**).

Gráfico 11.- Grado de expresión de las citocinas en el epitelio de la mucosa antral, por grupos de pacientes

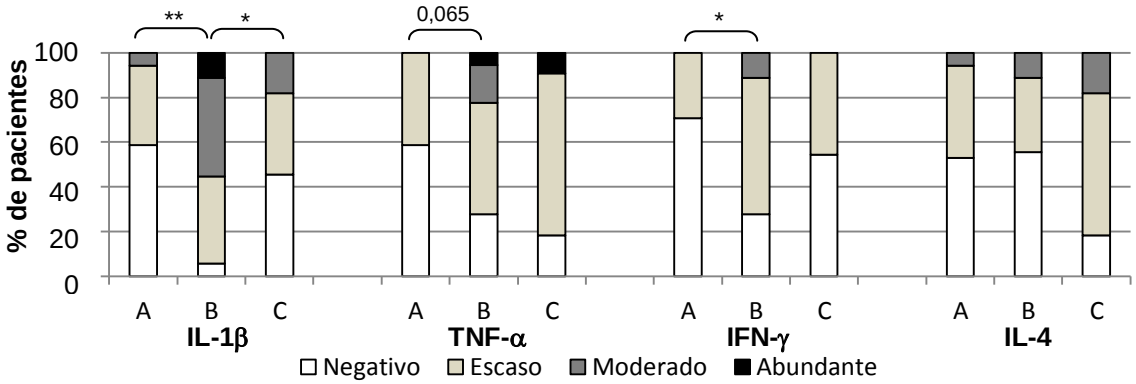


A: *Hp*-/helm-. **B:** *Hp*+/helm-. **C:** *Hp*+/helm+. * $p < 0,05$. Se indica una diferencia con tendencia a la significancia estadística. (Prueba de χ^2)

En concordancia con lo observado en el epitelio, en las células del infiltrado inflamatorio de los individuos *Hp*+/helm-, la IL-1β se expresó con mayor intensidad

que en el resto de los grupos. El grado de expresión del IFN-γ y el TNF-α también resultó discretamente mayor en este grupo (**Gráfico 12**). Cabe señalar que la expresión epitelial de todas las citocinas se correlacionó, significativamente, con el grado de expresión de las mismas en las células del infiltrado inflamatorio (IL-1β: r = 0,722; TNF-α: r = 0,455; IFN-γ: r = 0,573 e IL-4: r = 0,610; p < 0,01, respectivamente).

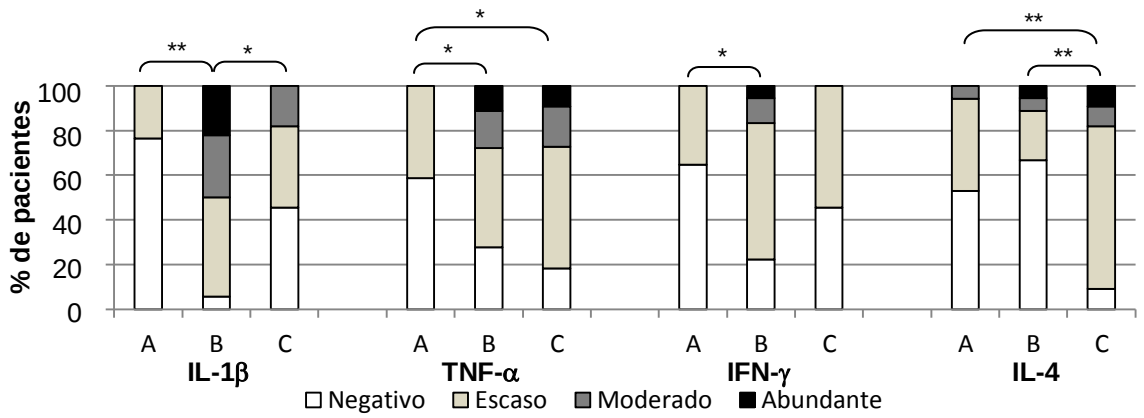
Gráfico 12.- Grado de expresión de las citocinas en el infiltrado inflamatorio de la mucosa antral, por grupos de pacientes



A: *Hp*-/helm-. **B:** *Hp*+/helm-. **C:** *Hp*+/helm+. * p < 0,05. ** p < 0,01. Se indica una diferencia con tendencia a la significancia estadística. (Prueba de χ^2)

Similar a lo observado en las células del infiltrado inflamatorio, en la lámina propia mucosal los grupos de pacientes difirieron en cuanto a la intensidad de expresión de las tres citocinas proinflamatorias, siendo ésta significativamente mayor en el grupo infectado sólo por *H. pylori* (**Gráfico 13**). En cuanto al grupo coinfectado por helmintos, resultó evidente un menor grado de inmunorreactividad para la IL-1β, así como un incremento significativo en la expresión de la IL-4, en comparación con el grupo *Hp*+/helm-. En este grupo también se incrementó el grado de expresión del TNF-α, en comparación con el grupo *Hp*-.

Gráfico 13.- Grado de expresión de las citocinas en la lámina propia de la mucosa antral, por grupos de pacientes



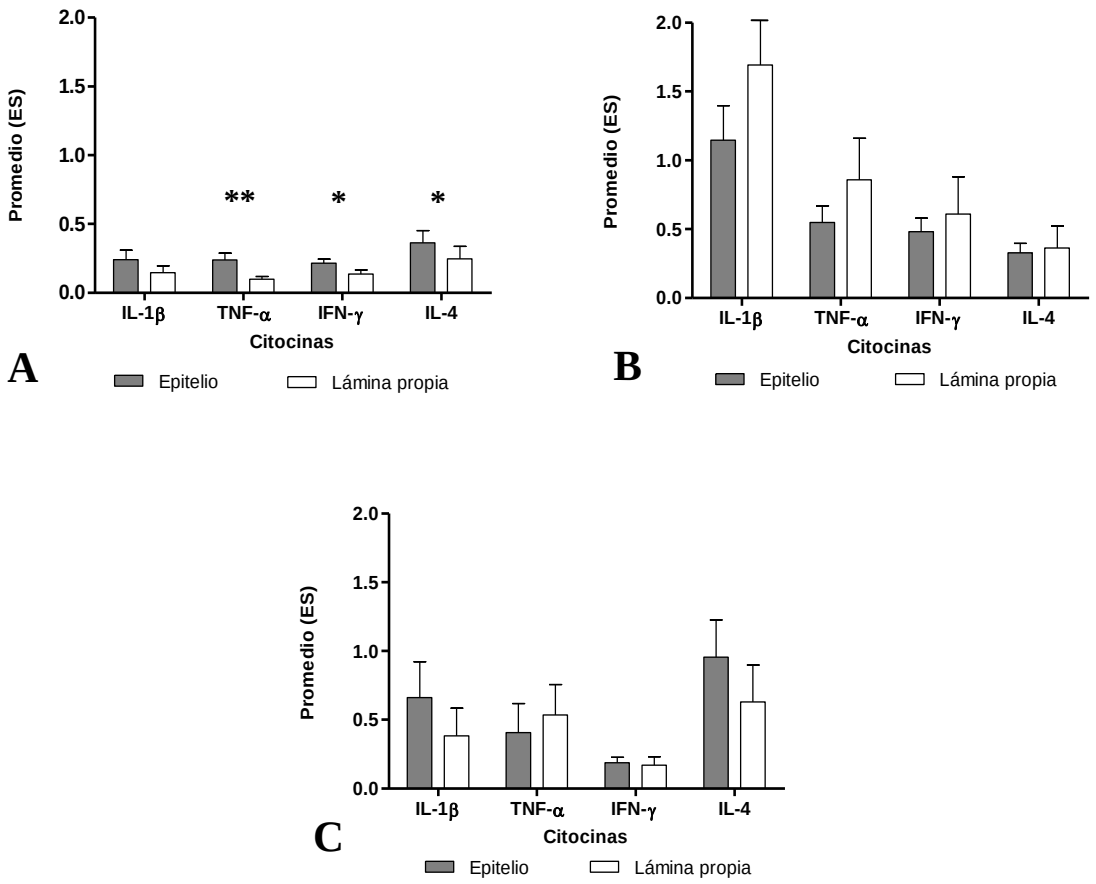
A: *Hp*-/helm-. **B:** *Hp*+/helm-. **C:** *Hp*+/helm+. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. (Prueba de χ^2).

IV.5.2.- Análisis cuantitativo de la inmunorreactividad para las citocinas

El **Gráfico 14** muestra las medias de la inmunorreactividad cuantificada para las diferentes citocinas, en el epitelio y la lámina propia mucosal, en los tres grupos de pacientes. En consonancia con el análisis descriptivo mostrado en el **Gráfico 3**, se observó que, entre los pacientes no infectados por *H. pylori*, efectivamente, la inmunorreactividad para todas las citocinas resultó mayor en el epitelio, siendo significativas las diferencias entre éste y la lámina propia, en lo referente a TNF-α, IFN-γ e IL4 ($p < 0,05$). Un comportamiento similar fue observado en los pacientes coinfectados por helmintos, excepto para el TNF-α, cuya expresión media resultó ligeramente superior, aunque no significativa, en la lámina propia. Por otra parte, en los pacientes infectados sólo por *H. pylori,* la media de la inmunorreactividad para todas las citocinas superó en la lámina propia a la registrada en el epitelio, aún cuando las diferencias observadas no resultaron significativas, aunque el incremento en el grado de expresión de las citocinas prinflamatorias se evidenció en ambas regiones de la mucosa. La revisión de la expresión de citocinas en cada individuo permitió identificar que tal comportamiento obedeció a un pequeño número de pacientes con una respuesta muy acentuada en la lámina propia (especialmente para IL-1β y TNF-α), observada como una expresión difusa de la citocina, con compromiso de las células del infiltrado inflamatorio y de la matriz extracelular.

En cuanto al grado de expresión de las citocinas entre los grupos de pacientes, se observó que los individuos no infectados por *H. pylori* y los infectados sólo por este microorganismo, exhibieron la menor y la mayor expresión de las citocinas proinflamatorias, respectivamente, mientras que el grupo coinfectado por helmintos registró valores intermedios para tales citocinas. En contraste, la IL-4 fue expresada mayormente por el grupo coinfectado por helmintos, evidenciándose en los 2 grupos restantes grados de expresión similares entre sí (**Gráfico 14, Tabla 8**).

Gráfico 14.- Promedio de expresión de cada citocina en el epitelio y la lámina propia de la mucosa gástrica antral.



A: Pacientes *Hp*-/helmintos-. **B:** pacientes *Hp*+/helmintos-. **C:** pacientes *Hp*+/helmintos+. Las barras corresponden a la media del porcentaje del área de la mucosa gástrica con tinción específica para cada citocina. La expresión de TNF-α, IFN-γ e IL-4 fue significativamente diferente al comparar el epitelio y la lámina propia en el grupo de pacientes *Hp*-/helmintos-; en los grupos restantes las diferencias no resultaron significativas. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$ (Prueba U de Mann-Whitney).

Tabla 8.- Expresión cuantitativa de las citocinas IL-1β, TNF-α, IFN-γ e IL-4, en la mucosa gástrica antral.

Citocinas	Expresión de las citocinas en los grupos de pacientes Media ± error estándar (Rango)		
	Hp-/helmintos–	*Hp*+/helmintos-	*Hp*+/helmintos+
TNF-α			
Epitelio**	0,24 ± 0,05 (0,06 - 1,02)	0,55 ± 0,12 (0,08 – 2,43)	0,41 ± 0,21 (0,02 – 2,42)
Lámina propia**	0,10 ± 0,02 (0,00 – 0,39)	0,86 ± 0,30 (0,03 – 5,13)	0,54 ± 0,22 (0,01 – 2,53)
Total**	0,18 ± 0,04 (0,14 – 0,22)	0,73 ± 0,21 (0,52 – 0,94)	0,48 ± 0,17 (0,01 – 1,67)
IL-1β			
Epitelio**	0,24 ± 0,07 (0,00 – 1,17)	1,15 ± 0,25 (0,06 – 3,30)	0,66 ± 0,26 (0,06 – 2,55)
Lámina propia**	0,15 ± 0,05 (0,01 – 0,83)	1,70 ± 0,46 (0,02 – 5,74)	0,39 ± 0,20 (0,00 – 2,05)
Total**	0,20 ± 0,04 (0,16 – 0,24)	1,44 ± 0,34 (1,10 – 1,78)	0,51 ± 0,22 (0,04 – 2,25)
IFN-γ			
Epitelio[a]	0,22 ± 0,03 (0,03 – 0,49)	0,48 ± 0,10 (0,04 – 1,42)	0,19 ± 0,04 (0,01- 0,50)
Lámina propia	0,14 ± 0,03 (0,01 – 0,54)	0,61 ± 0,27 (0,01 – 5,04)	0,17 ± 0,06 (0,00 – 0,66)
Total[b]	0,18 ± 0,02 (0,16 – 0,20)	0,52 ± 0,15 (0,37 – 0,67)	0,17 ± 0,03 (0,02 – 0,47)
IL-4			
Epitelio*	0,36 ± 0,09 (0,05 – 1,55)	0,33 ± 0,07 (0,02 – 1,09)	0,96 ± 0,27 (0,11 – 3,28)
Lámina propia*	0,25 ± 0,09 (0,02 – 1,56)	0,36 ± 0,16 (0,00 – 2,43)	0,63 ± 0,27 (0,02 – 3,19)
Total*	0,32 ± 0,09 (0,23 – 0,41)	0,35 ± 0,10 (0,24 – 0,44)	0,75 ± 0,18 (0,07 – 2,19)

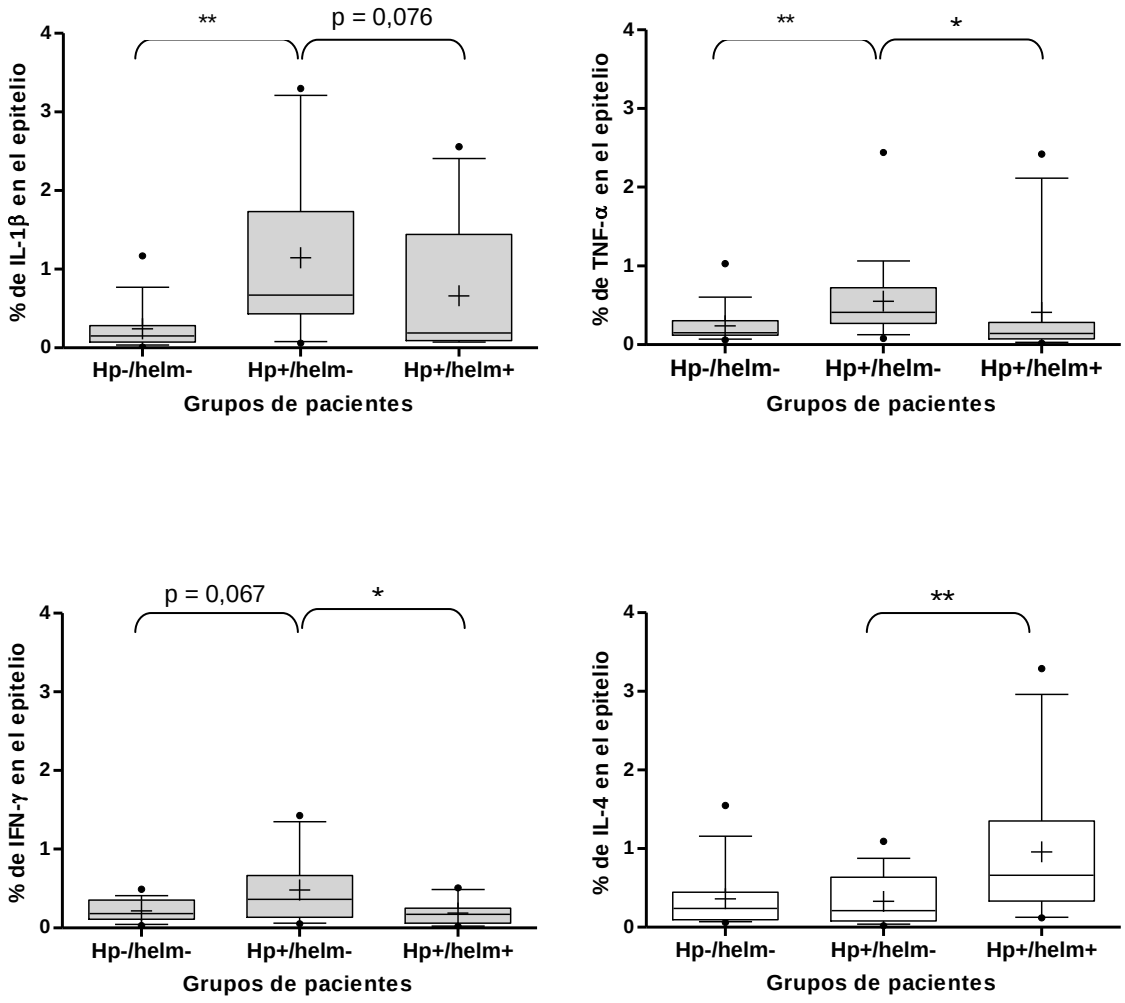
Las cifras corresponden a la media del porcentaje del área de la mucosa gástrica (epitelio o lámina propia) con tinción específica para cada citocina. La expresión de la IL-1β, el TNF-α y la IL-4 resultó diferente al comparar los tres grupos de pacientes, la expresión del IFN-γ también tendió a ser diferente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. [a]: $p = 0,059$. [b]: $p = 0,056$ (Prueba de Kruskal-Wallis).

Al comparar simultáneamente el nivel de citocinas expresado por los tres grupos de pacientes (Prueba de Kruskal-Wallis), se observó que los grupos difirieron en la inmunorreactividad para la IL-1β ($p < 0,01$), el TNF-α ($p < 0,01$) y la IL-4 ($p < 0,05$), tanto al considerar la expresión neta de cada citocina, como al analizarla separadamente en el epitelio y la lámina propia. La inmunorreactividad para el IFN-γ también tendió a ser diferente entre los grupos ($p = 0,056$) particularmente a expensas de su expresión epitelial ($p = 0,059$) (**Gráfico 14, Tabla 8**).

Con la finalidad de evidenciar claramente las diferencias entre los grupos de pacientes en cuanto a la expresión de las citocinas, se compararon los grupos *Hp+* con su control correspondiente. Entre el grupo infectado sólo por *H. pylori* y su respectivo control no infectado, se detectaron diferencias significativas en la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1β y TNF-α. Tales citocinas alcanzaron mayores niveles de expresión en el grupo *H. pylori*-positivo, tanto en el epitelio como en la lámina propia ($p < 0,01$). La expresión del IFN-γ también tendió a estar incrementada en este grupo de pacientes ($p = 0,067$ y $0,057$, en el epitelio y en la lámina propia, respectivamente), aunque esta tendencia solo fue significativa al considerar su expresión total en la mucosa antral ($p = 0,041$). El nivel de expresión de la IL-4 no varió entre estos dos grupos de pacientes (**Gráficos 15 y 16**).

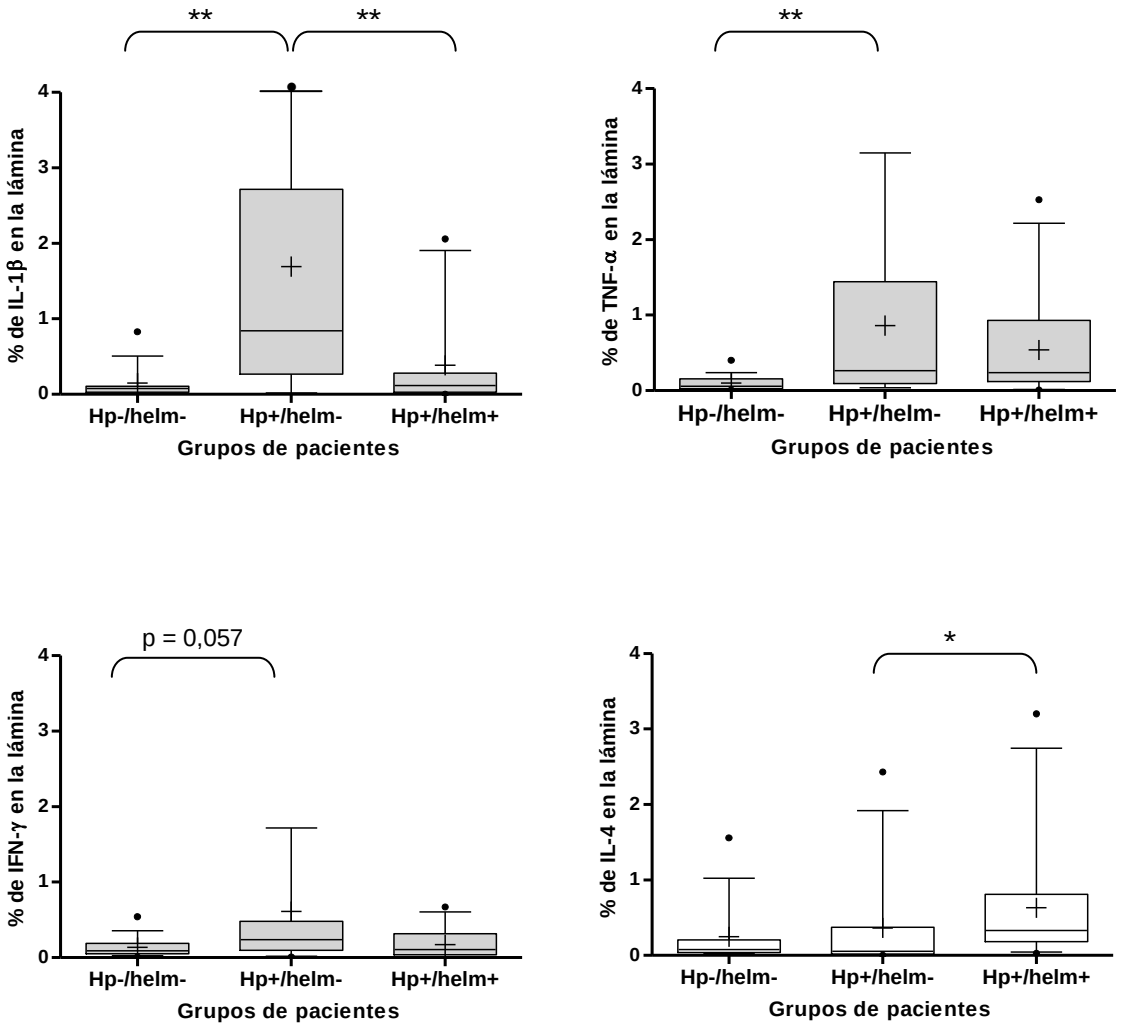
Por otra parte, al comparar los grupos infectados por *H. pylori*, con y sin infestación simultánea por helmintos intestinales, se observaron algunos hallazgos interesantes: el grupo coinfectado presentó un menor nivel de expresión epitelial de las citocinas proinflamatorias TNF-α e IFN-γ, una menor expresión total de la IL-1β, particularmente a expensas de la lámina propia, aunque con tendencia a ser menor también en el epitelio; y una mayor expresión de la IL-4, tanto en el epitelio como en la lámina propia de la mucosa gástrica antral (**Gráficos 15 y 16**).

Gráfico 15.- Expresión cuantitativa de las citocinas en el epitelio de la mucosa gástrica



* p < 0,05; ** p < 0,01. El gráfico indica la mediana (línea horizontal dentro de la caja), el promedio (+), los percentiles 25% y 75% (límites de la caja), 10% y 90% (rango de los alambres), el valor mínimo y el valor máximo de cada serie (•).

Gráfico 16.- Expresión cuantitativa de las citocinas en la lámina propia de la mucosa gástrica



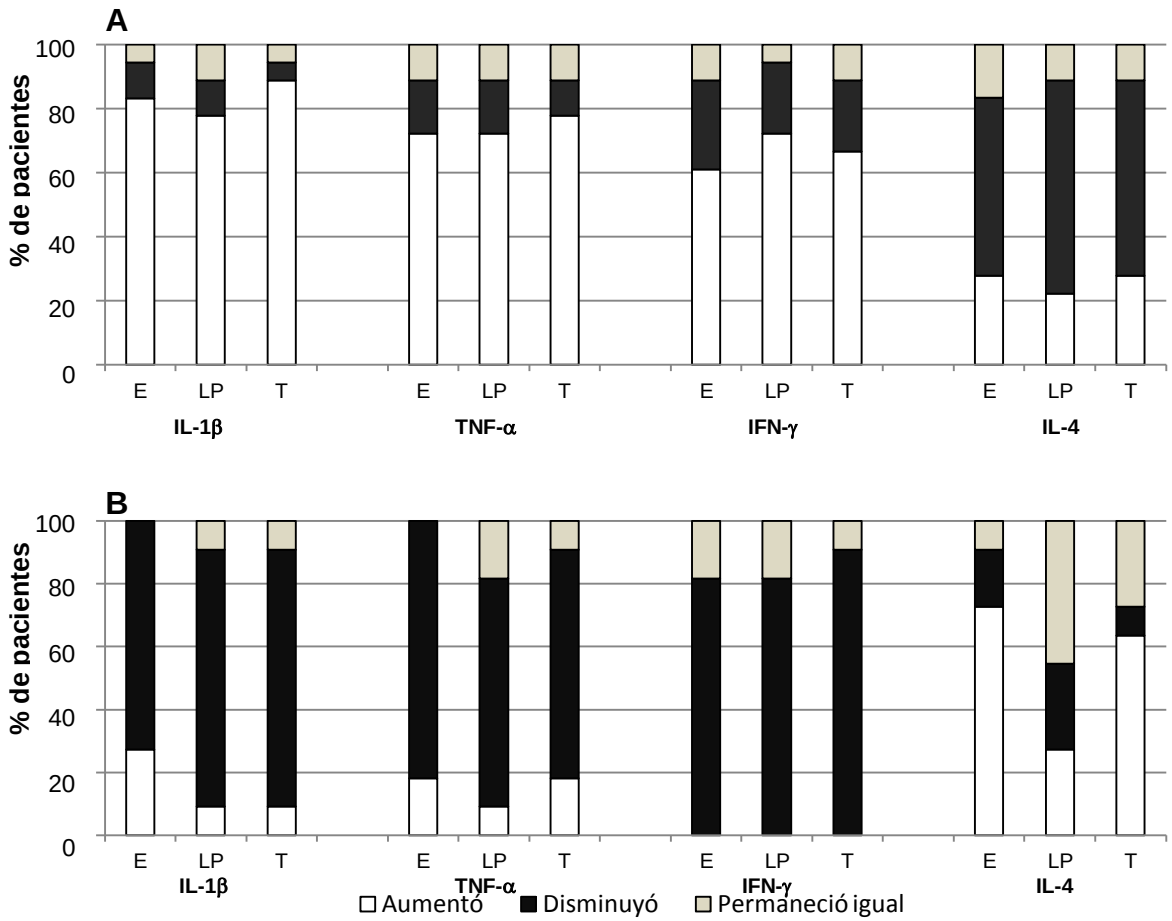
* p< 0,05. ** p < 0,01 (Prueba U de Mann-Whitney). El gráfico indica la mediana (línea horizontal dentro de la caja), el promedio (+), los percentiles 25% y 75% (límites de la caja), 10% y 90% (rango de los alambres), el valor mínimo y el valor máximo de cada serie (•).

El coeficiente de correlación entre los dos métodos de cuantificación aplicados para determinar la expresión de las citocinas en la mucosa antral (descriptivo-semicuantitativo y cuantitativo), resultó superior al 80% para todas las citocinas, tanto en el epitelio como en la lámina propia mucosal (p < 0,01. Coeficiente de correlación de Spearman).

Con el fin de conocer si las diferencias observadas en la expresión de citocinas en cada grupo se correspondían con la expresión registrada por cada individuo, se calcularon las frecuencias relativas de las diferencias individuales en la expresión de las citocinas en cada grupo (aumento, disminución o sin cambios), con respecto al promedio de expresión total de dicha citocina en el grupo control correspondiente. El **Gráfico 17** muestra estos resultados para los dos grupos infectados por *H. pylori* (con y sin co-infección helmíntica). Entre los individuos infectados sólo por *H. pylori* se evidenció, una tendencia contundente al aumento en la expresión neta de las citocinas proinflamatorias, efecto éste que fue comprobado para la IL-1β, el TNF-α y el IFN-γ, en el 89%, 78% y 67% de los individuos, respectivamente, con variaciones mínimas al considerar la expresión de tales citocinas a nivel del epitelio y de la lámina propia, separadamente. Adicionalmente, la infección por *H. pylori* se acompañó de una disminución en la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-4 en el 61% de los individuos.

Por otra parte, la coinfección por helmintos de hábitat intestinal en individuos con infección gástrica por *H. pylori*, resultó asociada a una disminución en la expresión de las citocinas proinflamatorias, tanto en el epitelio como en la lámina propia de la mucosa gástrica antral, lo cual fue corroborado para el IFN-γ, la IL-1β y el TNF-α, en el 91%, 82% y 73% de los individuos de este grupo, respectivamente. La infección por helmintos se asoció también a un incremento en la producción de la IL4 en el 64% de los individuos de este grupo, particularmente a expensas de un aumento en su expresión epitelial (73% de los individuos).

Gráfico 17.- Tipos de variaciones observadas en la expresión de las citocinas, al comparar los grupos de pacientes infectados por *H. pylori* con su grupo control respectivo.

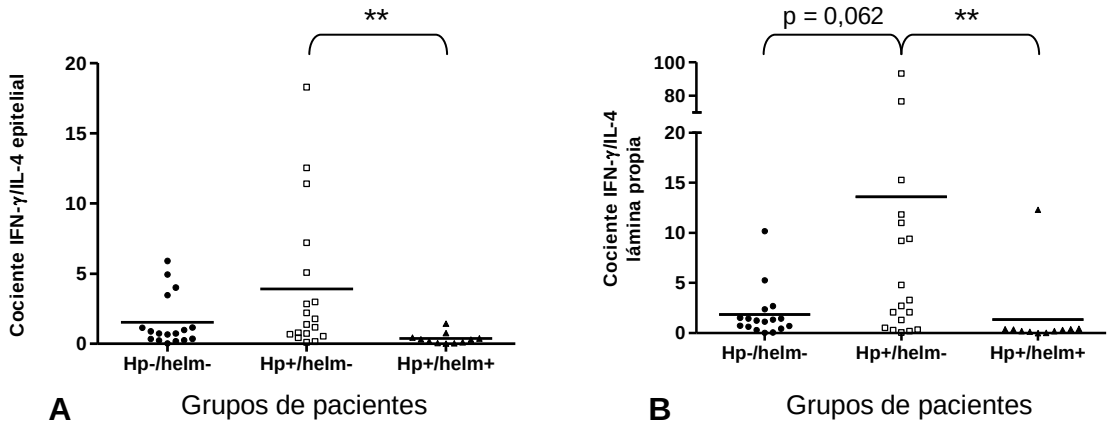


E: epitelio: **LP:** lámina propia; **T:** expresión neta (total) de cada citocina en la mucosa, sin discriminar por área. **A:** Grupo *Hp*+/helmintos- versus la X ± 1 error estándar del grupo *Hp*-/helmintos–. **B:** Grupo *Hp*+/helmintos+ versus la X ± 1 error estándar del grupo *Hp*+/helmintos-.

Adicionalmente, se calculó el radio de las citocinas IFN-γ/IL-4, para determinar el perfil de los linfocitos T cooperadores (T helper o Th) y compararlo entre los grupos de pacientes **(Serrano C. et al., 2007).** El cociente calculado permitió evidenciar diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes, tanto en el epitelio como en la lámina propia ($p < 0,01$; prueba de Kruskal-Wallis). Al grupo infectado sólo por *H. pylori* le correspondieron los cocientes más altos: epitelio: 3,90; lámina propia: 13,58), compatibles con un perfil de citocinas característico de una respuesta predominantemente Th1. Por su parte, el grupo coinfectado por helmintos presentó los cocientes más bajos (epitelio: 0,37; lámina propia: 1,35), significativamente inferiores a los del grupo *Hp*+/helm- e, inclusive, a los

obtenidos para el grupo control no infectado por *H. pylori* (epitelio: 1,53; lámina propia: 1,85), compatibles con una respuesta Th2-predominante **(Gráfico 18).**

Gráfico 18.- Cociente IFN-γ/IL-4 en el epitelio y la lámina propia de la mucosa gástrica, según el estado de infección por *H. pylori* y helmintos intestinales.



A: epitelio. **B:** lámina propia. p < 0,01 para la comparación de los tres grupos de pacientes en ambas regiones de la mucosa gástrica (Prueba de Kruskal-Wallis). ** p < 0,01 (Prueba U de Mann-Whitney). La barra horizontal indica la media.

IV.5.3.- Correlación entre la expresión de citocinas y los hallazgos histopatológicos

Con el fin de identificar posibles asociaciones entre la expresión de las citocinas y el grado de inflamación de la mucosa antral, se calcularon los coeficientes de correlación entre cada citocina y la severidad del infiltrado inflamatorio crónico y activo presente en el antro y en el corpus gástrico. Todas las correlaciones significativas encontradas se especifican en la **Tabla 9**.

En general, considerando la totalidad de los pacientes, la gastritis crónica antral se correlacionó positivamente con el grado de expresión de las tres citocinas proinflamatorias, IL-1β, TNF-α e IFN-γ, y con el cociente IFN-γ/IL4 total, es decir, con un patrón de citocinas Th1-predominante. El grado de actividad

inflamatoria también se correlacionó positivamente con la expresión de la IL-1β y el IFN-γ. Por su parte, el grado de inflamación del corpus gástrico, se correlacionó directamente con la inmunorreactividad para la IL-1β y el TNF-α, e inversamente con la expresión de la IL-4 en la lámina propia de la mucosa antral.

El análisis de correlación entre el grado de gastritis y la expresión de las citocinas, fue realizado también en los dos grupos de pacientes infectados por *H. pylori,* considerados separadamente. En el grupo *Hp*+/helm-, resultó nuevamente evidente la correlación directa entre el grado de inflamación crónica y un perfil de citocinas inflamatorias (cociente IFNγ/IL-4 y TNF-α); así como la correlación inversa con la IL-4. Por otra parte, ninguna citocina se mostró correlacionada con el grado de inflamación crónica, antral o corporal, detectado en los pacientes *Hp*+/helm+; pero la participación de la IL-1β y el IFN-γ en el proceso inflamatorio activo resultó evidente también en este grupo.

Tabla 9.- Correlación entre la expresión de las citocinas y el grado de inflamación en el antro y el corpus gástrico, según el estado de infección por *H. pylori* y helmintos.

Citocinas	Grupos de pacientes					
	Total de individuos		*Hp*+/helm-		*Hp*+/helm+	
Grado de inflamación crónica en el antro gástrico	*r*	p	*r*	p	*r*	P
-TNF-α en lámina	0,368	*	-	-	-	-
-TNF-α en el infiltrado inflamatorio	0,359	*	0,595	**	-	-
-IL-1β en lámina	0,365	*	-	-	-	-
-IFN-γ en lámina	0,373	*	-	-	-	-
-IFN-γ en el infiltrado inflamatorio	0,329	*	-	-	-	-
-Cociente IFN-γ/IL-4 en epitelio	-	-	0,493	*	-	-
-Cociente IFN-γ/IL-4 total	0,320	*	0,495	*	-	-
Grado de inflamación crónica en el corpus gástrico						
-TNF-α en epitelio	0,386	*	-	-	-	-
-TNF-α en lámina	0,513	**	0,594	*	-	-
-TNF-α en el infiltrado inflamatorio	0,528	**	0,546	*	-	-
-TNF-α total	0,507	**	0,578	*	-	-
-IL-1β en epitelio	0,425	*	-	-	-	-
-IL-1β en lámina	0,392	*	-	-	-	-
-IL-1β en el infiltrado inflamatorio	0,476	**	-	-	-	-
-IL-1β total	0,492	**	-	-	-	-
-IL-4 en lámina	-0,442	*	-0,687	**	-	-
Grado de actividad inflamatoria en el antro gástrico						
-IL-1β en epitelio	-	-	-	-	0,967	**
-IL-1β en lámina	0,587	0,035	-	-	0,899	*
-IL-1β en el infiltrado inflamatorio	-	-	-	-	0,822	*
-IL-1β total	0,593	0,033	-	-	0,993	**
-IFN-γ en epitelio	0,589	0,034	-	-	0,904	*
-IFN-γ en lámina	0,589	0,034	-	-	-	-
Grado de actividad inflamatoria en el corpus gástrico						
- IL-1β en lámina	0,578	*	-	-	-	-
- IL-1β total	-	-	-	-	0,913	*
- IFN-γ en epitelio	0,763	**	-	-	0,978	**
- I FN-γ en lámina.	0,609	*	0,822	*	1,000	**

r: coeficiente de correlación. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$.

V. DISCUSIÓN

Uno de los argumentos utilizados para explicar el curso clínico divergente que puede seguir la infección por *H. pylori*, está basado en el modelo epidemiológico clásico de causalidad según el cual, las lesiones tisulares infligidas por el agente infeccioso son moduladas por su interacción con otros factores, que pueden derivarse de las propiedades de virulencia de la cepa infectante, de la respuesta del hospedador a la infección o del ambiente externo **(Ghoshal et al., 2010)**. En este contexto, el llamado enigma africano **(Holcombe 1992)** descrito posteriormente en algunas regiones de Asia y Latinoamérica **(Miwa et al., 2002; Whary et al., 2005; Con et al., 2006; Goh et al., 2009)**, y caracterizado por una muy alta prevalencia de infección por *H. pylori* en áreas con una baja incidencia de cáncer gástrico, podría ser atribuido a una modulación del proceso inflamatorio gástrico iniciado por el microorganismo, hacia un curso no neoplásico **(Ghoshal et al., 2010)**.

En la presente investigación, se analizó la participación de las infecciones intestinales por helmintos como posibles moduladores externos de la respuesta inmunitaria asociada a la infección gástrica por *H. pylori* en humanos. Para ello, se determinó y comparó el patrón de gastritis predominante y el grado de expresión local de las citocinas proinflamatorias IFN-γ, IL-1β y TNF-α, y de la citocina antiinflamatoria IL-4, en individuos venezolanos adultos infectados por *H. pylori,* coinfectados o no por helmintos intestinales, así como también en un grupo control libre de infección.

V.1.- Hallazgos endoscópicos en el tracto digestivo superior

Entre la variedad de lesiones mucosales observadas al estudio endoscópico en la población estudiada, sólo las gastropatías de tipo nodular presentaron una frecuencia significativamente diferente entre los grupos de pacientes, siendo más comunes en los individuos *H. pylori*-positivos, especialmente, entre los coinfectados por helmintos. Hasta ahora, no se han reportado patrones endoscópicos específicos de lesión en la mucosa del corpus gástrico, que permitan diagnosticar la gastritis asociada a la infección por *H. pylori* con elevada sensibilidad y especificidad **(Yan et al., 2010)**. Sin embargo, diversos estudios han

propuesto que la gastritis nodular, una forma de gastropatía crónica con un patrón miliar de apariencia irregular, semejante a un pavimento de adoquines a la visualización endoscópica **(Hassall y Dimmick, 1991)**, tiene una especificidad y un valor predictivo positivo altos para diagnosticar la infección por *H. pylori* **(Elitsur et al., 2000; Miyamoto et al., 2003; Al-Enezi et al., 2010**). La frecuente identificación de ese patrón endoscópico gástrico en individuos infectados por *H. pylori*, especialmente en pacientes con una alta densidad de colonización, constituye una de las evidencias que sustentan la participación de este microorganismo como principal inductor de esa variedad de lesión mucosal **(Rafeey et al., 2004; Koh et al., 2007)**. Tales observaciones se corroboraron nuevamente en este trabajo, donde el 90% de los casos con esa gastropatía correspondió a pacientes *H. pylori*-positivos en quienes, además, el patrón endoscópico de lesión se correlacionó significativamente con el grado de colonización microbiana, tanto en el antro como en el corpus gástrico. No obstante, el hecho de que el patrón de gastropatía nodular esté ausente en un alto porcentaje de los pacientes *Hp*+ (69%), apoya las observaciones previas que atribuyen a este indicador una baja sensibilidad y un bajo valor predictivo negativo en el diagnóstico de esta infección **(Elitsur et al., 2000; Miyamoto et al., 2003; Al-Enezi et al., 2010**).

Tal como fue mencionado anteriormente, se ha sugerido que la apariencia nodular de la mucosa gástrica podría estar relacionada con la densidad de *H. pylori* durante la fase aguda de la infección. Según esta hipótesis, un inóculo bacteriano inicial muy abundante desencadenaría una respuesta inmunitaria exagerada, con atracción de un elevado número de células inflamatorias **(Ladas et al., 1999)**. Este argumento podría ser útil para explicar, en parte, la alta frecuencia de gastritis nodular que se reporta en niños sometidos a endoscopia (dado que en la infancia es más frecuente la infección aguda), en contraste con la relativa minoría de pacientes adultos en quienes se detecta este patrón endoscópico **(Bahu et al., 2003; Rafeey et al., 2004; Al-Enezi et al., 2010)**. Las variaciones en las propiedades de virulencia de las cepas bacterianas y en los factores inherentes al hospedador, así como las complejas interacciones entre ambos, han sido postuladas como alternativas para explicar la presencia de gastritis nodular en sólo una fracción de los individuos adultos infectados **(Chen et al., 2008)**.

Adicionalmente, algunos autores han atribuido la apariencia característica de la gastropatía nodular, al aumento en el número de agregados o folículos linfoides en la lámina propia, visibles al examen histopatológico, especialmente en niños **(Dwivedi et al., 2008; Chen et al., 2008; Prieto et al., 1992)**. Sin embargo, en el presente estudio no se detectó asociación significativa entre la nodularidad de la mucosa y la presencia de agregados linfoides, puesto que éstos fueron visualizados sólo en el 50% de los pacientes con ese tipo de gastropatía, así como también en el 27,8% de los casos con otras modalidades de lesión mucosal. El hallazgo de folículos linfoides al análisis histopatológico, en ausencia de nodularidad gástrica evidente a la endoscopia, también ha sido reportado previamente **(Genta et al., 1993; Sokmensuer et al., 2009).**

Se ha sugerido que una hiperplasia linfoide significativa podría dar lugar a la formación de nódulos en algunos casos de gastritis causada por *H. pylori*. La isla de patogenicidad *cag*-PAI del microorganismo podría participar en la etiopatogenia de este hallazgo histológico, mediante dos mecanismos diferentes: primero, a través del sistema de secreción tipo IV, que facilita la entrada de pequeños productos derivados del peptidoglucano bacteriano al interior de las células epiteliales, activando así la respuesta inflamatoria y, segundo, por acción de la proteína CagA *per se*, que activa al factor nuclear κβ, potenciando la respuesta proinflamatoria por la vía de la proteincinasa activadora de mitógenos Ras (Ras-MAP), independientemente de la fosforilación de los residuos de tirosina de la proteína (**Al-Enezi et al., 2010)**. Ambas respuestas conducirían a la proliferación de células B y al desarrollo de agregados y folículos linfoides. Además, se ha demostrado que la infección por *H. pylori* también aumenta la expresión endotelial de la molécula 1 de adhesión celular a la adresina mucosal (MAdCAM-1), que forma parte de un sistema de localización de blancos y "domiciliación de moléculas" que media el reclutamiento de linfocitos hacia el tejido linfoide asociado a la mucosa, contribuyendo así al desarrollo de la gastritis nodular **(Ohara et al., 2003)**. Lo anterior podría explicar por qué la gastropatía nodular no está presente en todos los casos de infección por *H. pylori*, y sugiere la posibilidad de que el desarrollo de ésta dependa de la infección por cepas portadoras de ciertos factores de virulencia, aspecto cuyo conocimiento escapa a los límites del presente trabajo. En este mismo contexto podría esperarse que la

coinfección por helmintos intestinales, indujera un mayor grado de infiltración mucosal por linfocitos tipo B, derivados no sólo de la proliferación de estas células estimulada por *H. pylori*, sino también de la respuesta inmunitaria predominantemente Th2 desencadenada por tales enteroparásitos, lo que explicaría la tendencia de ese grupo de pacientes a presentar una mayor formación de nódulos en la mucosa gástrica. No obstante, se desconoce si la gastritis nodular entraña un riesgo adicional al de la infección por *H. pylori* para el desarrollo de otras enfermedades gastroduodenales de mayor severidad o para cáncer gástrico **(Sokmensuer 2009),** por lo que resulta difícil analizar el significado clínico de la presencia de este patrón endoscópico o predecir su evolución en los pacientes, coinfectados o no por helmintos.

Un hallazgo más reciente parece sugerir que la gastropatía nodular no sólo es consecuencia de la formación de folículos linfoides, sino que ésta podría surgir como resultado de otros mecanismos. En tal sentido, se ha reportado un incremento de la proteinasa 3 de neutrófilos (PR3) en la mucosa gástrica de los pacientes con gastropatía nodular. La PR3 es una proteasa de serina producida por los neutrófilos, cuya función primaria es la degradación de proteínas extracelulares en los sitios de inflamación, pero su actividad proteolítica prolongada o excesiva puede causar daños al tejido, por lo que se ha sugerido que esta proteasa podría jugar un papel importante en el desarrollo de la gastritis nodular. La PR3 procesa quimiocinas y citocinas, tales como IL-8, TGF-β, TNF-α unido a membranas, IL-1β, IL-18 e IL-32, disminuyendo la actividad biológica de tales citocinas. También procesa la pro-forma de la familia de ligandos de IL-1, tales como IL-1β e IL-18 **(Hong et al., 2012)**. La elevada expresión de la PR3 en los pacientes con gastritis nodular, producto de los neutrófilos infiltrantes, podría explicar la correlación significativa entre esta gastropatía, la actividad inflamatoria y el grado de inflamación crónica en el corpus gástrico, descrita en el presente trabajo. De hecho, la correlación entre la gastropatía nodular y el grado de inflamación gástrica ha sido reportada previamente **(Rafeey et al 2004; Miyamoto et al., 2002)**.

Otro Hallazgo endoscópico relevante en la población estudiada, es una frecuencia general de úlceras gástricas del 17%. Aunque en otros grupos

poblacionales se han reportado frecuencias mayores, similares o inferiores **(Sacco et al., 2007; Costa et al., 2009; Sung et al., 2009)** es difícil establecer comparaciones con los resultados aquí obtenidos, por tratarse de pacientes en cuya selección se aplicaron estrictos criterios de exclusión. Sin embargo, los resultados derivados de un estudio realizado entre 1998 y 1999 en condiciones similares y en la misma unidad hospitalaria, permiten inferir que la frecuencia de úlceras gástricas no ha variado en esta población **(Fuenmayor et al, 2002)**. Adicionalmente, la distribución homogénea de estas patologías en los 3 grupos de pacientes estudiados, independientemente del estado de infección por *H. pylori*, sugiere la participación de otros agentes en su etiología. En efecto, se ha propuesto que sólo un 48 a 75% de las úlceras gástricas se deben a la infección por este microorganismo, y que la aspirina, otros antiinflamatorios no esteroideos, el alcohol, el estrés y las sales biliares también pueden estar involucrados en su patogénesis **(Uyanikoğlu et al., 2012; Sung et al., 2009)**.

En cuanto al predominio de casos con patrones endoscópicos múltiples entre los pacientes infectados por *H. pylori*, especialmente en aquellos sin coinfección parasitaria, tal hallazgo podría representar otra evidencia a favor de un mayor grado de compromiso de la mucosa gástrica, atribuible a la infección bacteriana.

En relación a los hallazgos endoscópicos evidenciados en la mucosa duodenal, la tendencia al aumento en la frecuencia de lesiones entre los pacientes *Hp*+/helm+ y el predominio del patrón de lesión granular en este grupo, sugieren que hay afectación crónica del duodeno, que podría atribuirse al parasitismo por helmintos de hábitat duodenal. Sin embargo, el patrón granular fue observado también en los pacientes parasitados por *T. trichiura* (helminto de hábitat colónico) e, inclusive, en individuos no parasitados por helmintos. Estos hallazgos permiten suponer que otros factores podrían estar participando en la patogenia de la duodenopatía granular en esta selección de pacientes (incluyendo la infección por *H. pylori,* dada la estrecha relación anatómica y fisiológica entre el estómago y el duodeno). En cuanto a las úlceras pépticas de localización duodenal, lesiones en cuya etiología la participación de *H. pylori* es indiscutible (95 a 100% de los casos), estas fueron diagnosticadas en tan sólo un

paciente, perteneciente al grupo *Hp*+/helm-. A diferencia de lo descrito para las úlceras gástricas, durante los últimos años se ha evidenciado una disminución sustancial en la frecuencia de úlceras duodenales en la población estudiada (de un 7,5% a fines de la década de 1990, a un 2,1% en el presente estudio) **(Fuenmayor et al., 2002)**. Tal disminución, frente a una frecuencia estable o lentamente decreciente de las úlceras gástricas, también ha sido observada en otros países y atribuida tanto a los efectos de la terapia anti-*H. pylori,* como a las variaciones poblacionales en el porcentaje de participación de los otros agentes etiológicos reconocidos para estas patologías **(Groenen et al., 2009; Goh et al., 2009; Wang y Peura, 2011)**.

V.2.- Hallazgos histopatológicos en la mucosa gástrica

En concordancia con la amplia descripción existente en relación con los cambios histopatológicos que suelen acompañar a la infección por *H. pylori* **(Dhakhwa et al., 2012, Zhang et al., 2005; Lamarque et al., 2003; Vega-Ramos y Rodríguez-Moguel, 2000),** en la mucosa gástrica antral de todos los pacientes *H. pylori*-positivos, se observó el infiltrado de células mononucleares característico de la gastritis crónica. Asimismo, en un elevado número de estos casos se evidenció un grado moderado de actividad inflamatoria y cambios sugestivos de atrofia glandular. Aunque con menor frecuencia, también se observaron acúmulos linfocitarios y fibrosis leve. Tales hallazgos confirman, una vez más, la importante participación de *H. pylori* en la patogénesis de esas alteraciones histológicas.

En relación con el estudio histopatológico de la mucosa gástrica antral en los individuos coinfectados con helmintos, el único cambio significativo fue un aumento en la frecuencia de casos con actividad inflamatoria. No obstante, esto ocurrió a expensas de un aumento neto de los casos de grado leve, con disminución de los casos con infiltración polimorfonuclear moderada y acentuada. Este hallazgo aislado es difícil de interpretar y no permite identificar un efecto consistente de los helmintos sobre las alteraciones inducidas por *H. pylori* en la mucosa gástrica. En cuanto a la tendencia al aumento en el grado de colonización antral por *H. pylori*, ésta ha sido observada también en modelos murinos de coinfección *Helicobacter*-nemátodos intestinales y en estudios de infección experimental precedida por una vacunación inductora de la respuesta

inmunitaria tipo Th2 **(Fox et al., 2000; Taylor et al., 2008);** tal efecto ha sido atribuido a cambios en el perfil de las citocinas que acompañan a la infección helmíntica, aspecto que será discutido posteriormente.

La menor frecuencia y grado de severidad de las alteraciones histopatológicas en el corpus gástrico de los individuos *H. pylori*-positivos, en comparación con lo observado en el antro gástrico, coincide con la baja frecuencia de neoplasias gástricas reportada en la región. Las diferencias histopatológicas entre antro y corpus fueron aun más evidentes entre los individuos coinfectados por helmintos, quienes presentaron en el corpus una menor variedad e intensidad de lesiones mucosales, en comparación con los infectados sólo por *H. pylori*. Debido a la distribución topográfica del infiltrado inflamatorio, compatible con una gastritis predominantemente antral, el riesgo de cáncer gástrico calculado en los pacientes coinfectados resultó menor al de los pacientes infectados sólo por *H. pylori,* y comparable al del grupo control libre de la infección bacteriana. Aunque tales resultados no alcanzaron significancia estadística, la tendencia evidenciada puede considerarse un indicio importante de un posible efecto regulador ejercido por los parásitos sobre el proceso inflamatorio inducido por *H. pylori*. Esta tendencia cobra mayor importancia al tomar en cuenta el pequeño número de individuos estudiados en este grupo y su variabilidad, atribuible a todos los posibles factores intercurrentes (genéticos y ambientales) difíciles de controlar por ser inherentes a la investigación en seres humanos.

Entre los hallazgos histopatológicos descritos en el antro y en el corpus gástrico, llama la atención la elevada frecuencia de cambios sugestivos de atrofia mucosal, la cual no ha sido documentada previamente en el estado Zulia, región de procedencia de los pacientes. Tomando en cuenta que la atrofia se considera una lesión precursora en la evolución hacia el adenocarcinoma gástrico, este hallazgo es inesperado, puesto que en la región zuliana se ha reportado una frecuencia relativamente baja de este tipo de neoplasia, en contraste con la de otros estados venezolanos, como los de la región andina (**Alonso-Amelot y Avendaño, 2009**). En la mayoría de los pacientes, la atrofia presentó una distribución topográfica que ha sido asociada a un bajo riesgo de cáncer (más

frecuente y acentuada en el antro que en el corpus gástrico). Además, otros indicadores de riesgo, como la metaplasia intestinal y la displasia **(Correa y Piazuelo, 2012)** estuvieron ausentes. Tales resultados favorecen el argumento de una infrecuente evolución de estos casos hacia la malignidad. Es importante también resaltar que la atrofia gástrica no es el único predictor de riesgo de carcinogénesis gástrica. De hecho, el índice de riesgo para cáncer gástrico de Meining, aplicado en esta investigación **(Meining et al., 1998)**, excluye a la atrofia como indicador de riesgo, probablemente por las elevadas discrepancias interobservador que se han reportado en torno a su identificación y gradación **(Offerhaus et al, 1999; Aydin et al., 2003; Rugge et al., 2005)**. Sin embargo, el bajo promedio de edad de los pacientes con atrofia supondría que, de confluir ciertos factores predisponentes, éstos contarían con el tiempo de vida necesario para desarrollar cáncer gástrico, según la cascada de eventos hacia la carcinogénesis gástrica aceptada actualmente (**Correa y Piazuelo, 2012**), razón por la cual sería recomendable realizar un seguimiento de los casos con atrofia, a corto, mediano y largo plazo.

V.3.- Expresión de las citocinas en la mucosa gástrica antral

Es escasa la información existente en la literatura, sobre la localización, el patrón de expresión y/o la naturaleza de las células productoras de citocinas en la mucosa gástrica. Esto se relaciona con el hecho de que una alta proporción de los trabajos dirigidos a evaluar la respuesta inmunitaria celular y la expresión local de citocinas inducida por *H. pylori*, han sido realizados a partir del análisis de su ARNm, o de la cuantificación de las proteínas en sobrenadantes de cultivos de biopsias gástricas, en linfocitos aislados de biopsias gástricas, o en líneas de células epiteliales gástricas **(Futagami et al., 2006; Kim et al., 2005; Yamaoka et al., 1996; Basso et al.,1996)**. Tales estudios, aunque han realizado valiosas aportaciones al conocimiento de la respuesta inmunitaria celular local ante la infección, no reflejan exactamente la realidad de la situación *in situ*, como lo permiten los métodos de inmunotinción histológica.

Pese a lo anterior, las escasas investigaciones basadas en análisis inmunohistoquímicos han permitido describir ciertas particularidades para algunas

citocinas, tales como: mayor concentración de las células productoras de IFN-γ e IL-8 en la región del cuello de las glándulas gástricas **(Ahlstedt et al., 1999, Lindholm et al., 1998)**, distribución uniforme y homogénea de las células mononucleares con tinción específica para la IL-1β en la lámina propia, y distribución del TGF-β en acúmulos **(Lindholm et al., 1998)**, entre otras. Sin embargo, en la presente investigación no se evidenciaron estos patrones para las cuatro citocinas estudiadas. Los encontrados en este estudio de distribución focal, multifocal y difuso de la expresión de las citocinas gástricas pueden interpretarse como consecuencia de su intensidad, debido a la tendencia observada hacia una distribución multifocal o difusa al incrementarse el grado de inmunorreactividad. Sin embargo, no se descarta que la distribución parcheada de *H. pylori* en la mucosa gástrica pudiera tener alguna participación en la definición del patrón de distribución de las citocinas en las diferentes áreas de la mucosa antral.

Hasta ahora, la contribución de las células epiteliales antrales a la respuesta dependiente de citocinas en casos de infección por *H. pylori*, ha sido extensamente documentada para la IL-8, pero la información en relación a otras citocinas es escasa y, en algunos casos, controversial. La expresión predominante de todas las citocinas analizadas en el epitelio superficial y en áreas limitadas de la lámina propia subyacente, coincidió con lo reportado por **Lopes et al (2005).** De hecho, basados en el hallazgo de una fuerte expresión de IL-8, TNF-α, IFN-γ, TGF-β e IL-4 en el epitelio superficial y glandular antral de niños infectados y no infectados por *H. pylori*, estos autores propusieron que el epitelio contribuye no sólo a la respuesta proinflamatoria y reguladora, sino también a la respuesta antiinflamatoria de la mucosa gástrica.

Es importante resaltar la inmunotinción epitelial evidenciada para el IFN-γ, una citocina cuya producción por parte de las células epiteliales no ha sido caracterizada con precisión. Sin embargo, la correlación significativa entre esta expresión y el número de células inflamatorias positivas para la misma citocina, coincide con hallazgos similares previamente descritos, tanto en la mucosa gástrica **(Lindholm et al., 1998; Lopes et al., 2005)** como en la duodenal **(Strömberg et al., 2003).** Adicionalmente, este último grupo de investigadores describió la existencia de asociación entre las áreas epiteliales con fuerte tinción para el IFN-γ

y la tinción también acentuada para el receptor de esa citocina. Con base en tales hallazgos, se ha sugerido que la inmunorreactividad epitelial observada para el IFN-γ podría derivar de la producción previa de esta citocina por los mononucleares infiltrantes de la mucosa, la cual habría sido captada por las células epiteliales gracias a su reconocimiento por el receptor específico. No obstante, la expresión epitelial del IFN-γ se observó también en ausencia aparente de linfocitos positivos para esta citocina. Existe el antecedente de un hallazgo similar, que fue atribuido a células inmunitarias productoras de pequeñas cantidades de citocinas presentes en las adyacencias del epitelio o ubicadas en sitios distantes de la mucosa **(Lopes et al., 2005)**, efecto que sería posible gracias a la triple acción autocrina-paracrina-endocrina de estas proteínas. En cualquier caso, la expresión epitelial gástrica del IFN-γ, cuya producción se considera restringida básicamente a los linfocitos Th1, T citotóxicos y a las células NK del sistema inmunitario **(Karttunen et al., 1995),** es un hallazgo que debería investigarse con mayor detenimiento. De hecho, la producción epitelial de IL-4 fue motivo de intensa controversia, hasta ser comprobada hace apenas unos años **(Orsini et al., 2007)**. Independientemente de lo anterior, las evidencias confirman que las células del epitelio realizan una contribución sustancial a la expresión de citocinas en la mucosa gástrica, bien mediante su producción activa o mediante la captación de las citocinas producidas por los leucocitos infiltrantes del epitelio o de la lámina propia, por lo que podrían tener participación en la inmunopatogénesis de las lesiones asociadas a la infección por *H. pylori.*

En el presente trabajo, todas las citocinas se expresaron en el epitelio y en el infiltrado inflamatorio intraepitelial o de la lámina propia de la mucosa antral, tanto en los individuos infectados por *H. pylori* como en los no infectados, aunque con frecuencia e intensidad variables. En este sentido, existen diferencias entre los autores, ya que algunos reportan ausencia de expresión de la IL-4 en los individuos infectados por *H. pylori* o expresión de algunas citocinas proinflamatorias únicamente en individuos infectados, mientras que otros presentan resultados acordes con los aquí obtenidos. La variabilidad en la expresión de las citocinas entre los diferentes estudios puede ser explicada, al menos en parte, a partir de las diferencias en los métodos utilizados para su

determinación, ya que no es igual evaluar la expresión global de las citocinas en homogenados de biopsias gástricas, que evaluar su producción por ciertos grupos celulares específicos. Aun entre los trabajos realizados con metodologías similares, podrían presentarse diferencias inherentes a la técnica utilizada. Por ejemplo, las variaciones en los anticuerpos primarios, en la sensibilidad del sistema de detección o en las técnicas de fijación de los tejidos, pueden dar lugar a resultados diferentes en los estudios basados en tinciones inmunohistoquímicas. Sin embargo, también es posible que las diferencias observadas en la expresión de las citocinas, obedezcan a particularidades inherentes a la población estudiada, como aquellas que dependen del perfil genético de los individuos, de las características de virulencia de las cepas infectantes o de las influencias ambientales.

La expresión en bajo grado de todas las citocinas investigadas (tanto las proinflamatorias IL1β, TNFα e IFNγ como la antiinflamatoria IL-4) en los pacientes no infectados por *H. pylori* sugiere que, en ausencia de infección, la mucosa mantiene una producción basal, relativamente controlada y balanceada, de las citocinas pertenecientes a los dos grupos linfocitarios TCD4+ más importantes, es decir, una respuesta mixta Th2/Th1, con una ligera tendencia al predominio Th2, tal como parece indicarlo el cociente IFN-γ/IL-4 calculado para este grupo. En otra investigación previa, ya se había constatado el predominio de las citocinas antiinflamatorias IL-4 y TGF-β (aunque acompañadas de una expresión elevada de IL-1β), en individuos adultos con gastritis, no infectados por *H. pylori* **(Lindholm et al., 1998)**. Tales hallazgos sugieren que la respuesta inmunitaria predominante en la mucosa gástrica con leves alteraciones histopatológicas o, al menos, en ausencia de uno de los principales agentes agresores gástricos reconocidos hasta ahora, podría estar caracterizada por la producción equilibrada y en bajo grado de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (respuesta mixta Th2/Th1 o Th0). Esta respuesta de citocinas está en concordancia con el grado inflamatorio significativamente menor, evidenciado al examen histopatológico de la mucosa gástrica de los individuos no infectados, en comparación con los infectados. Por otra parte, el hecho de que la expresión de todas las citocinas predominara en el epitelio superficial antral de los individuos *H. pylori*-negativos, ratifica el papel que desempeñan el epitelio y las citocinas allí localizadas, en el mantenimiento de la

homeostasis de la mucosa gástrica, tal como ha sido sugerido previamente **(Lindholm et al., 1998).**

En lo que respecta al perfil de citocinas predominante en la mucosa gástrica infectada por *Helicobacter pylori*, éste ha demostrado ser diferente al de los individuos no infectados. Desde las primeras investigaciones al respecto, se estableció que las poblaciones linfocitarias de los pacientes *Hp*+ están conformadas por una elevada proporción de linfocitos T productores de IFN-γ e IL-2, y por un número muy escaso de los secretores de IL-4 e IL-5, lo cual resulta consistente con una respuesta de citocinas predominantemente Th1 **(D´Elios et al., 1997 a y b; Bamford et al., 1998)**. Numerosos estudios subsiguientes han confirmado esta premisa **(Bimczok et al., 2010; Pellicanò et al., 2007; Amedei et al., 2006; D´Elios et al., 2005),** aún cuando también han surgido evidencias de la posible participación de otros grupos de células linfocitarias (Th17, Treg…) en la respuesta inmunitaria frente a *H. pylori* **(Cheng et al., 2012; Raghavan 2012; Khamri et al., 2010; Shi et al., 2010; Mahajan et al., 2008).** La vigorosa respuesta inmunitaria de tipo Th1 inducida por el microorganismo ha sido asociada al desarrollo de atrofia gástrica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico, aunque en un número limitado de los individuos infectados **(Hou et al., 2007; Houghton et al., 2002).**

En el presente trabajo, la infección por *H. pylori* se acompañó de un incremento significativo en la expresión de todas las citocinas proinflamatorias, pero no de la IL-4 antiinflamatoria, por lo que el cociente de las citocinas IFN-γ/IL-4 se elevó significativamente en relación con el del grupo control (*Hp*-), resultados que ratifican el predominio de la respuesta inmunitaria de tipo Th1 ante la infección. Sin embargo, es importante resaltar que la IL-1β fue la citocina expresada con mayor frecuencia e intensidad, tanto en el epitelio como en la lámina propia de este grupo de pacientes, en lugar del IFN-γ, considerado hasta ahora como el marcador más representativo de la respuesta Th1. Además, estos pacientes mantuvieron un grado de expresión de la IL-4, que no difirió significativamente del observado en el grupo control no infectado. En una investigación previa, se obtuvieron resultados similares a los del presente estudio, en pacientes infectados con *H. pylori* que presentaban únicamente gastritis crónica **(Lindholm et al., 1998)**. En otro estudio en el que se evaluaron las citocinas

secretadas por clones de células T derivadas de pacientes *Hp*+ con gastritis crónica, se demostró que estos clones expresaban tanto citocinas Th1 como Th2, lo que fue definido como un perfil Th0. Los autores concluyeron que la respuesta local Th0, que incluye la producción de IL-4, puede estar determinada por factores individuales del hospedador y contribuir a un menor grado de inflamación gástrica y a la prevención de las úlceras pépticas **(D´Elios et al., 1997)**. De acuerdo a los resultados podría plantearse que, en estos pacientes, el componente Th1 de la respuesta inmunitaria pudiera encontrarse bajo los efectos de un mecanismo de inmunorregulación negativa. Durante los últimos años se han presentado evidencias de la participación de la IL-4 en un mecanismo de tolerancia mucosal, a través del cual una respuesta inmunitaria lesiva puede ser prevenida, suprimida o revertida a una respuesta menos lesiva para el tejido **(Orsini et al., 2007)**. En tal sentido, es posible que la producción de IL-4 por parte de las células epiteliales e inmunitarias, aunque en bajo grado, regule la producción excesiva del IFN-γ, como parece observarse en esta investigación al evaluar proporcionalmente la secreción de IFN-γ con respecto a las otras citocinas proinflamatorias analizadas y especialmente la IL-1β. Esta interpretación podría soportar el concepto de desarrollo de una respuesta inmunorreguladora que reduzca la producción de lesiones de mayor severidad en la mucosa. Es conocido que el IFN-γ contribuye a la inflamación gástrica, no sólo activando fagocitos mononucleares y neutrófilos, sino también regulando la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II en las células epiteliales **(Engstrand et al., 1989)**. Además, el IFN-γ también disminuye la función de la barrera epitelial **(Adams et al., 1993)**. No obstante, es indiscutible el estado inflamatorio desencadenado por la infección, que en el presente trabajo estuvo caracterizado por un mayor grado de infiltración de la mucosa por células mononucleares y polimorfonucleares, asociado a la expresión significativamente mayor de algunas de las citocinas más relevantes en la respuesta inflamatoria (la IL-1β, el TNF-α y, en menor grado, el IFN-γ), en comparación con el grupo no infectado.

El hecho de que la IL-1β sea la citocina proinflamatoria predominante entre los pacientes *H. pylori*-positivos, podría explicar la baja frecuencia de enfermedad ulceropéptica duodenal descrita en estos pacientes. No en vano, a esta citocina

se le atribuye un efecto protector contra el desarrollo de tal patología, debido a su potente acción inhibitoria de la secreción ácida gástrica, demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* **(Dalta et al., 2011; Uehara et al., 1989)**. Sin embargo, la hipoclorhidria severa asociada a niveles elevados y sostenidos de la IL-1β, puede también constituir un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico **(Furuta et al., 2002; El-Omar et al., 2001).** Aunque en la presente investigación no se midió el pH de las secreciones gástricas, el posible efecto antisecretor de la IL-1β debería ser tenido en cuenta en esta población que presenta cifras elevadas de gastritis crónica atrófica. Considerando nuevamente la baja frecuencia de cáncer gástrico reportada en la región, tales resultados sugieren la necesidad de estudiar a fondo los posibles mecanismos reguladores o inmunomoduladores que podrían estar operando en esta población.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el grupo de individuos con infección simultánea por *H. pylori* y helmintos intestinales, fueron significativamente diferentes a los descritos en los grupos anteriores y, por lo tanto, revisten especial importancia, además de ser el objeto fundamental de este estudio. El notable incremento en el grado de expresión de la citocina IL-4, en relación a la expresada por los pacientes infectados sólo por *H. pylori* y por los individuos no infectados, sugiere que la respuesta inmunitaria de tipo predominantemente Th2 desencadenada por los helmintos a nivel intestinal, puede repercutir sobre la dinámica inmunitaria del antro gástrico. Los efectos de la coinfección helmíntica se evidenciaron, además, en una reducción significativa de las tres citocinas proinflamatorias investigadas, bien en el epitelio (IFN-γ y TNF-α) o en la lámina propia de la mucosa antral (IL-1β). El incremento en la expresión de la IL-4 con reducción del IFN-γ en el grupo coinfectado, determinó un cociente muy bajo para estas citocinas, típico de una respuesta de tipo Th2.

Resultados similares a los del presente estudio han sido reportados por un grupo de investigadores del Instituto Tecnológico de Massachusetts, USA, quienes han desarrollado varios estudios dirigidos a encontrar posibles explicaciones para los llamados enigmas africano, asiático y latinoamericano que, tal como se explicó anteriormente, plantean la paradoja de poblaciones con una alta prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* y una baja prevalencia de

cáncer gástrico. Empleando dos modelos diferentes de coinfección en murinos (ratones C57BL/6, coinfectados por *H. felis* y el helminto intestinal *Heligmosomoides polygyrus,* y gerbos de Mongolia -*Meriones unguiculatus*- coinfectados por *H. pylori* y la filaria tisular *Brugia pahangi*), este grupo de investigadores encontró evidencias de que las infecciones helmínticas pueden modular la respuesta inmunitaria predominantemente Th1 inducida por especies de *Helicobacter,* hacia una respuesta menos inflamatoria y predominantemente Th2. En estas investigaciones, la acción moduladora de los helmintos se tradujo, no sólo en un incremento de la expresión genética de las citocinas anti-inflamatorias IL-4, IL-10 y TGF-β, sino también en una regulación negativa de las citocinas proinflamatorias IFN-γ, IL-1β, TNF-α y de las quimiocinas IP-10, RANTES y MIP-1β, todas asociadas a una respuesta inflamatoria gástrica de tipo Th1. Además, se evidenciaron cambios en la respuesta serológica sistémica, con mayores niveles del isotipo IgG1 anti-*H. pylori* asociado a la respuesta inmunitaria tipo Th2 en los casos de coinfección, en contraste con una mayor expresión del isotipo IgG2, asociado a la respuesta tipo Th1, en los animales infectados sólo por la especie de *Helicobacter* **(Fox et al., 2000; Martin et al., 2010)**.

Evidencias similares a las encontradas en los anteriores modelos experimentales de coinfección, derivadas del estudio de las concentraciones séricas de los isotipos de IgG anti-*H. pylori*, han sido obtenidas en dos poblaciones colombianas con prevalencia de infección por *H. pylori* superior al 90% y diferencias contrastantes en la prevalencia de helmintiasis intestinal y en el riesgo de cáncer gástrico, llevando a los autores a concluir que los agentes coinfectantes estudiados pueden modular la respuesta inflamatoria asociada a la infección por *H. pylori* lo que explicaría, al menos en parte, la diferencia en el riesgo de cáncer gástrico observada entre estas dos poblaciones **(Whary et al., 2005; Ek et al., 2012)**.

Es de suma importancia señalar que, a partir del análisis histopatológico de la mucosa gástrica realizado en los modelos animales de coinfección antes descritos, los autores concluyeron que la infección concurrente con helmintos intestinales o tisulares, no protege contra la infección por *Helicobacter* (pues los

animales mantuvieron una densa colonización bacteriana, tanto en el antro como en el corpus gástrico), sino que sus efectos se traducen en una atenuación de la inflamación gástrica y un menor riesgo para el desarrollo de las lesiones precursoras del cáncer gástrico, como la atrofia y la metaplasia intestinal **(Fox et al., 2000; Martin et al., 2010)**. El mecanismo propuesto para este fenómeno inmunomodulador es una regulación negativa de la síntesis del IFN-γ inducida por las citocinas proinflamatorias IL-10, TGF-β y, especialmente, por la IL-4. Esta última activaría la proliferación de células T reguladoras (Treg) con habilidad para suprimir la actividad de otros grupos de linfocitos, así como también de las células dendríticas, a través de mecanismos dependientes de contactos célula-célula, no completamente dilucidados aun. Este efecto se acompañaría de una reducción significativa en la expresión de las quimiocinas activadas por el IFN-γ en el sitio de la inflamación, atenuando las alteraciones histopatológicas gástricas y duodenales asociadas a la infección por *Helicobacter* **(Fox et al., 2000; Raghavan y Quiding-Järbrink, 2012)**.

En relación con lo anterior, es importante enfatizar que, a pesar de las diferencias identificadas en el perfil de citocinas de los pacientes coinfectados con helmintos, el análisis histopatológico de las biopsias reveló efectos de pequeña magnitud (no significativa) sobre el grado de atenuación de las lesiones; no obstante, estos efectos predominaron en el corpus gástrico, el área con mayor propensión al desarrollo de cambios preneoplásicos y neoplásicos. Tales variaciones, consistentes en una menor frecuencia de gastritis crónica atrófica, menor grado de infiltración mononuclear y polimorfonuclear, ausencia de metaplasia intestinal, de acúmulos linfocitarios y fibrosis, tendencia a la gastritis predominantemente antral y menor riesgo de cáncer gástrico, constituyen importantes hallazgos, por sus posibles implicaciones a largo plazo. Éstos adquieren aun mayor significado al considerar que la mayoría de los individuos infectados por *H. pylori* presentaron lesiones histopatológicas de grado leve a moderado, así como un bajo riesgo general de cáncer gástrico, lo que probablemente limitó la posibilidad de poner en evidencia efectos protectores de mayor magnitud ejercidos por las helmintiasis, a lo cual se suma el desconocimiento del tiempo de evolución de ambos tipos de infección y de una

serie de variables inherentes al hospedero, la bacteria y el ambiente, cuyo control estuvo fuera de los límites del presente estudio.

La explicación para el enigma que se plantea en algunas poblaciones de África y de otros países subdesarrollados en torno a la infección por *H. pylori* sugiere que la exposición a los antígenos de ciertos agentes infecciosos y especialmente de los parásitos helmintos, durante la infancia, favorece el desarrollo de una respuesta inmunitaria contra-reguladora de tipo mixto Treg/Th2 capaz de interactuar con los mecanismos inmunitarios e inflamatorios involucrados en otras infecciones (e, inclusive, en enfermedades alérgicas o autoinmunes y en la respuesta a la vacunación) disminuyendo el riesgo de desarrollar respuestas proinflamatorias aberrantes en los individuos predispuestos genéticamente **(Whary y Fox, 2004; Moreau y Chauvin, 2010)**. Esta propiedad de los helmintos podría explicar los resultados obtenidos en los tres grupos de pacientes del presente estudio, cuya interacción con parásitos intestinales desde temprana edad (demostrada en numerosos estudios epidemiológicos locales) podría estar determinando la baja prevalencia de cáncer gástrico reportada en la región, el grado leve a moderado de las lesiones histopatológicas gástricas aquí evidenciado, la similar expresión basal de la citocina antiinflamatoria IL-4 en individuos infectados y no infectados por *H. pylori,* así como la expresión relativamente baja de las citocinas proinflamatorias, especialmente del IFN-γ, aún en los individuos infectados. Sin embargo, es necesario reconocer que en la población del estado Zulia hasta el presente no se han estudiado los polimorfismos genéticos para las citocinas proinflamatorias, ni se han caracterizado las cepas de *H. pylori* predominantes (en cuanto a las proteínas CagA, VacA, BabA, entre otros factores de virulencia), aspectos éstos que podrían estar incidiendo en la magnitud de los procesos patogénicos inducidos por el microorganismo en la mucosa gástrica, en esta localidad geográfica. Las variaciones en los factores genéticos y microbianos antes señalados, con capacidad demostrada para incidir sobre la susceptibilidad a la infección, su mantenimiento y curso clínico, podrían ser también la clave para explicar los cambios atípicos en la expresión de las citocinas evidenciados en algunos pacientes, cuando se realizó la comparación entre cada individuo y el promedio de su grupo control correspondiente.

Finalmente, en concordancia con lo descrito en los modelos animales de coinfección, en la presente investigación los cambios en la respuesta inmunitaria atribuibles a la infección helmíntica, no se acompañaron de una reducción significativa en la densidad de colonización por *H. pylori*. Tal como fue mencionado con anterioridad, es probable que la disminución en la expresión del IFN-γ promovida por los helmintos, provea una explicación para este resultado, pues se ha demostrado un efecto similar (aumento en la densidad de colonización por *H. pylori*) en ratones con expresión deficiente de esta citocina **(Sawai et al., 1999)**. Al mismo tiempo, se ha señalado que la reducción de la respuesta inflamatoria inducida por las células Treg, puede incrementar la densidad bacteriana **(Raghavan y Quiding-Järbrink, 2012)**. Otro estudio previo en ratones, dirigido a evaluar el efecto protector de dos vacunas inductoras de las respuestas inmunitarias Th1 y Th2, respectivamente, contra la infección por *H. pylori*, demostró que la vacuna Th2 provoca un incremento significativo de la IL-4 y reducción del IFN-γ, pero no logra disminuir el grado de colonización por *H. pylori*, razón por la cual se concluyó que la respuesta inmunitaria de tipo Th2 no protege contra la infección **(Taylor et al., 2008)**. Basados en estos hallazgos, tales autores enfatizaron la importancia de la inmunidad Th1 y del IFN-γ para la protección contra la colonización por *H. pylori*. Estas aseveraciones parecen contradictorias, pues la respuesta inmunitaria natural frente a la infección, predominantemente Th1, durante muchos años ha sido considerada aberrante, promotora de gastritis crónica e ineficaz para la erradicación de un microorganismo extracelular **(Blanchard et al., 1999; Suerbaum et al., 2002)**. Sin embargo, las evidencias acumuladas a partir de estudios *in vitro* sugieren que *H. pylori* cumple, al menos, una residencia intracelular transitoria, principalmente en macrófagos, la cual juega un papel importante en su ciclo de vida (**Amieva et al., 2002; Necchi et al., 2007).** Algunos investigadores, inclusive, plantean que *H. pylori* debería ser considerado un organismo intracelular facultativo **(Dubois et al., 2007)**, lo que explicaría la participación del IFN-γ en el control de los niveles de colonización por este microorganismo. Otra de las paradojas aun inexplicadas en torno a la infección por *H. pylori* es que, mientras las respuestas inflamatoria e inmunitaria específica ante la infección rara vez conducen a su resolución espontánea, la inmunización

terapéutica y profiláctica con productos derivados de *H. pylori* en modelos animales, ha demostrado tener eficacia en prevenir o reducir la colonización y la inflamación **(Meyer et al., 2000)**. Tales hallazgos indican que, aun cuando se ha avanzado mucho en el conocimiento de la respuesta inflamatoria y de la patogénesis de las lesiones gástricas asociadas a la infección por *H. pylori*, y se han dilucidado muchos aspectos relativos a la respuesta del hospedador ante la infección, queda un largo camino por recorrer hasta lograr descifrar los enigmas que entraña la compleja interacción *H. pylori*-humano.

Analizados en conjunto, los datos del presente estudio demuestran que la infección por *H. pylori* provoca una intensa respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica, con un marcado aumento de las citocinas proinflamatorias IL-1β, TNF-α e IFN-γ, sin asociarse a una modificación significativa de la expresión tisular de IL-4. Este estado patogénico de la mucosa gástrica antral se modula por la parasitación intestinal por helmintos. Se produce una marcada disminución de la expresión de citocinas proinflamatorios con aumento de la antiinflamatoria IL-4. Este hallazgo plantea la posible relevancia de los helmintos en la modificación de la historia natural de la infección por *H pylori* y de sus complicaciones, incluyendo su carácter de predisposición a la transformación tumoral. Los mecanismos de inducción de este efecto a distancia en la mucosa antral por la parasitación intestinal permanecen desconocidos, pero abren la investigación de posibles procedimientos inmunorreguladores de carácter preventivo y terapéutico.

VI. CONCLUSIONES

De este trabajo de investigación sobre la expresión de citocinas en el epitelio y la lámina propia de la mucosa gástrica antral, el grado de lesión tisular en individuos infectados por *H. pylori* y el análisis de su posible modulación por la helmintiasis intestinal, se concluye que:

1.- La infección gástrica por *H. pylori* incrementa la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1β y TNF-α en el epitelio y en la lámina propia de la mucosa antral con respecto a los sujetos no infectados. También, se objetiva que la presencia de la bacteria se asocia a una tendencia al aumento de IFN-γ en ambas regiones de la mucosa, sin afectar la expresión de IL-4.

2.- La infección por *H. pylori* incrementa el grado de infiltración mononuclear y granulocítica de la mucosa gástrica, la frecuencia y el grado de atrofia glandular y el índice de riesgo para cáncer gástrico, con respecto a los sujetos no infectados.

3.- La coinfección helmíntica modula la respuesta inmunitaria inducida por *H. pylori* en la mucosa gástrica antral. Se asocia a un incremento de la expresión de la citocina anti-inflamatoria IL4 y a una reducción de las proinflamatorias, IL-1β tanto en el epitelio como en la lámina propia y TNF-α e IFN-γ en el epitelio.

4.- La coinfección por helmintos intestinales no afecta el grado de colonización gástrica por *H. pylori*, pero se asocia a una disminución discreta de las lesiones histopatológicas en el corpus y del índice de riesgo para cáncer gástrico.

5.- En la población no infectada por *H. pylori* se expresan en bajo grado, y especialmente en el epitelio, tanto las citocinas proinflamatorias IL-1β y TNF-α, como el IFN-γ (Th1) y la IL-4 (Th2), lo cual coincide con una baja frecuencia y severidad de lesión mucosal gástrica.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams RB, Planchon SM, Roche JK. IFN-γ modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding. **J Immunol**. 150:2356-63, 1993.

2. Agnihotri N, Bhasin DK, Vohra H, Ray P, Singh K, Ganguly NK. Characterization of lymphocytic subsets and cytokine production in gastric biopsy samples from *Helicobacter pylori* patients. **Scand J Gastroenterol**. 33: 704-9, 1998.

3. Ahlstedt I, Lindholm C, Lönroth H, Hamlet A, Svennerholm AM, Quiding-Järbrink M. Role of local cytokines in increased gastric expression of the secretory component in *Helicobacter pylori* infection. **Infect Immun.** 67(9):4921-5, 1999.

4. Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A, Wakebe H, Ohmoto Y, Imagawa K, Kikuchi M, Mukaida N, Matsushima K. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. **Infect Immunol.** 65, 3218–24, 1997.

5. Al-Enezi SA, Alsurayei SA, Aly NYA, Ismail AE, Ismail WA, Al-Brahim N, El-Dousari A. Endoscopic nodular gastritis in dyspeptic adults: prevalence and association with *Helicobacter pylori* Infection. **Med Princ Pract**. 19:40–45, 2010.

6. Alonso-Amelot ME, Avendaño-Meza M. Conglomerados de cáncer gástrico en el Estado Mérida, Venezuela. **Interciencia** 34(9):617-622, 2009.

7. Amedei A, Bergman MP, Appelmelk BJ, Azzurri A, Benagiano M, Tamburini C, van der Zee R, Telford JL, Vandenbroucke-Grauls CM, D'Elios MM, Del Prete G Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and H+, K+-adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. **J Exp Med.** 198(8): 1147-56, 2003.

8. Amedei A, Cappon A, Codolo G, Cabrelle A, Polenghi A, Benagiano M, Tasca E, Azzurri A, D'Elios MM, Del Prete G, de Bernard M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. **J Clin Invest**. 116(4):1092-101, 2006.

9. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology**.134:306–23, 2008.

10. Amieva MR, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S. *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. **Cell Microbiol**. 4(10):677–90, 2002.

11. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. **Science.** 300: 1430 - 4, 2003.

12. Archimandritis A, Souyioultzis S, Hatzopoulos N, Tzivras M. Ascaris lumbricoides diagnosed through upper gastrointestinal endoscopy. **J Clin Gastroenterol**. 25(4):719-20, 1997.

13. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. **J Clin Invest.** 119 (9): 2475 –87, 2009.

14. 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**. 270 (30): 17771–7, 1995.

15. Aydin O, Egilmez R, Karabacak T, et al. Interobserver variation in histopathological assessment of *Helicobacter pylori* gastritis. **World J Gastroenterol**. 9:2232-5, 2003.

16. Bacon CM, Petricoin EF, Ortaldo JR et al. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci USA**. 92:7307-11, 1995.

17. Bagnoli F, Buti L, Tompkins L, Covacci A, Amieva MR. *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** 102: 16339-44, 2005.

18. Bahu Mda G, da Silveira TR, Maguilnick I, Ulbrich-Kulczynki J. Endoscopic nodular gastritis: an endoscopic indicator of high grade bacterial colonization and severe gastritis in children with *Helicobacter pylori*. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** 36: 217– 22, 2003.

19. Bamford KB, Fan X, Crowe SE, Leary JF, Gourley WK, Luthra GK, Brooks EG, Graham DY, Reyes VE, Ernst PB. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. **Gastroenterology.** 114:482–492, 1998.

20. Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. **Clin Exp Immunol.** 149(2):217-25, 2007.

21. Basso D, Scrigner M, Toma A, Navaglia F, Di Mario F, Rugge M, Plebani M. *Helicobacter pylori* infection enhances mucosal interleukin-1 beta, interleukin-6, and the soluble receptor of interleukin-2. **Int J Clin Lab Res.** 26(3): 207-10, 1996.

22. Bellack NR, Koehoorn MW, MacNab YC, Morshed MG. A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. **Epidemiol Infect.** 134(3): 439–49, 2006.

23. Bergman MP, Engering A, Smits HH, van Vliet SJ, van Bodegraven AA, Wirth HP, Kapsenberg ML, Vandenbroucke-Grauls CM, van

Kooyk Y, Appelmelk BJ. *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DCSIGN. **J Exp Med.** 200(8): 979-90, 2004.

24. Bergman M, Del Prete G, van Kooyk Y, Appelmelk B. *Helicobacter pylori* phase variation, immune modulation and gastric autoimmunity. **Nat Rev Microbiol**. 4: 151-9, 2006.

25. Berstad AE, Holbjorn K, Bukholm G, Moran AP, Brandtzaeg P. Complement activation directly induced by *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology.** 120: 1108–16, 2001.

26. Bimczok D, Clements RH, Waites KB, Novak L, Eckhoff DE, Mannon PJ, Smith PD, Smythies LE. Human primary gastric dendritic cells induce a Th1 response to *H. pylori*. **Mucosal Immunol.** 3(3):260-9, 2010.

27. Blanchard TG, Czinn SJ, Nedrud JG. Host response and vaccine development to *Helicobacter pylori* infection. **Curr Top Microbiol Inmunol.** 241: 181-213, 1999.

28. Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **J Clin Investig.**113: 321-3, 2004.

29. Blaser MJ, Chyou PH, Nomura A. Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. **Cancer Res.** 55: 562-5, 1995.

30. Berroterán A, Perrone M, Correnti M, Cavazza ME, Tombazzi C, Lecuna V, Goncalvez R. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en el estómago y placa dental de una muestra de la población en Venezuela. **Acta Odontol Venez**. 39(2):35-4, 2001.

31. Bodger K, Bromelow K, Wyatt JI, Heatley RV. Interleukin 10 in *Helicobacter pylori* associated gastritis: immunohistochemical localisation and in vitro effects on cytokine secretion. **J Clin Pathol**. 54(4):285-92, 2001.

32. Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Ulivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elios MM, Telford JL, Baldari CT. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms**. J Exp Med.** 198(12): 1887-97, 2003.

33. Bossen C, Ingold K, Tardivel A, Bodmer JL, Gaide O, Hertig S, Ambrose C, Tschopp J, Schneider P. Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. **J Biol Chem**. 281(20):13964-71, 2006.

34. Botero D, Restrepo M. **Parasitosis Humanas.** 3era Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. p 409-15. 1998.

35. Bruce MG, Maaroos HI. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter.** 13 (Suppl 1):1-6, 2008.

36. Brunda MJ. Interleukin-12. **J Leukoc Biol**. 55:280-8, 1994.

37. Calchi M, Rivero Z, Acurero E, Díaz I, Chourio G, Bracho A, Maldonado A, Fernández B, Fernández M, González J, Villalobos R. Prevalence of Enteroparasites in Two Communities of Santa Rosa de Agua in Maracaibo, Zulia, Venezuela, 2006. **Kasmera**. 35(1):38-48, 2007.

38. Campbell, DI, Warren, BF, Thomas, JE, Figura N, Telford JL, and Sullivan, PB. The African Enigma: low prevalence of gastric atrophy, high prevalence of chronic inflammation in west African adults and children. **Helicobacter**. 6: 263-7, 2001.

39. Caruso R, Fina D, Paoluzi OA, Del Vecchio Blanco G, Stolfi C, Rizzo A, Caprioli F, Sarra M, Andrei F, Fantini MC, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. IL-23 mediated regulation of IL-17 production in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. **Eur J Immunol**. 38(2): 470-8, 2008.

40. Ceci P, Mangiarotti L, Rivetti C, Chiancone E. The neutrophil activating Dps protein of *Helicobacter pylori*, HP-NAP, adopts a mechanism different from Escherichia coli Dps to bind and condense DNA. **Nucleic Acids Res**. 35: 2247-56, 2007.

41. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci USA**. 93(25): 14648-53, 1996.

42. Chen MJ, Shih SC, Wang TE, Chan YJ, Chen CJ, Chang WH. Endoscopic patterns and histopathological features after eradication therapy in *Helicobacter pylori* –associated nodular gastritis. **Dig Dis Sci**. 53: 1893–7, 2008.

43. Cheng HH, Tseng GY, Yang HB, Wang HJ, Lin HJ, Wang WC. Increased numbers of Foxp3-positive regulatory T cells in gastritis, peptic ulcer and gastric adenocarcinoma. **World J Gastroenterol**. 18(1):34-43, 2012.

44. Chu SH, Kim H, Seo JY, Lim JW, Mukaida N, Kim KH. Role of NF-kappaB and AP-1 on *Helicobacter pylori*-induced IL-8 expression in AGS cells. **Dig Dis Sci**. 48(2): 257-65, 2003.

45. Clyne M, Thomas JE, Weaver L, Drumm B. In vitro evaluation of the role of antibodies against *Helicobacter pylori* in inhibiting adherence of the organism to gastric cells. **Gut.** 40: 731–8, 1997.

46. Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 and IL-29. **J Allergy Clin Immunol**. 121:1108-1111, 2008.

47. Con SA, Valerín AL, Takeuchi H, Con-Wong R, Con-Chin VG, Con-Chin GR, Yagi-Chaves SN, Mena F, Brenes Pino F,

Echandi G, Kobayashi M, Monge-Izaguirre M, Nishioka M, Morimoto N, Sugiura T, Araki K. *Helicobacter pylori* CagA status associated with gastric cancer incidence rate variability in Costa Rican regions. **J Gastroenterol**. 41(7):632-7, 2006.

48. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. **Lancet.** 2:58–60, 1975.

49. Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. **J Dig Dis**. 13(1):2-9, 2012.

50. Costa AC, Figueiredo C, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**. Suppl 1:15-20, 2009.

51. Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. **J Biol Chem**. 267; 10570–5, 1992.

52. Crabtree JE. Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. **Aliment Pharmacol Ther**. 10, 1S–10S, 1996.

53. Crabtree JE. Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. **Scand J Gastroenterol**. 215, 3S–10S, 1996.

54. Crabtree JE, Covacci A, Farmery SM, Xiang Z, Tompkins DS, Perry S, Lindley IJ, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. **J Clin Pathol**. 48(1):41-45, 1995.

55. Datta De D, Bhattacharjya S, Maitra M, Datta A, Choudhury A, Dhali GK, Roychoudhury S. IL1B induced Smad 7 negatively regulates gastrin expression. **PLoS One**. 6(3):e14775, 2011.

56. Del Giudice G, Michetti P. Inflammation, immunity and vaccines for *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**. 9 (Suppl 1): 23-8, 2004.

57. D'Elios MM, Amedei A, Benagiano M, Azzurri A, Del Prete G. *Helicobacter pylori*, T cells and cytokines: the 'dangerous liaisons'. **FEMS Immunol. Med. Microbiol**. 44: 113-9, 2005.

58. D'Elios MM, Amedei A, Cappon A, Del Prete G, de Bernard M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (*HP*-NAP) as an immune modulating agent. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 50: 157-64, 2007.

59. D'Elios MM, Appelmelk BJ, Amedei A, Bergman MP, Del Prete G. Gastric autoimmunity: the role of *Helicobacter pylori* and molecular mimicry. **Trends Mol Med.** 10: 316-23, 2004.

60. a)D'Elios MM, Manghetti M, Almerigogna F, Amedei A, Costa F, Burroni D, Baldari CT, Romagnani S, Telford JL, Del Prete G. Different cytokine profile and antigen-specificity repertoire in *Helicobacter pylori*-specific T cell clones from the antrum of chronic gastritis patients with or

without peptic ulcer. **Eur J Immunol**. 27:1751–5, 1997.

61. b)D'Elios MM, Manghetti M, De Carli M, Costa F, Baldari CT, Burroni D, Telford JL, Romagnani S, Del Prete G. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. **J Immunol**. 158:962–7, 1997.

62. Dhakhwa R, Acharya IL, Shrestha HG, Joshi DM, Lama S, Lakhey M. Histopathologic study of chronic antral gastritis. **J Nepal Health Res Counc.** 10(1):57-60, 2012.

63. Di Tommaso A, Xiang Z, Bugnoli M, Pileri P, Figura N, Bayeli PF, Rappuoli R, Abrignani S, De Magistris MT. *Helicobacter pylori*-specific CD4+ T-cell clones from peripheral blood and gastric biopsies. **Infect Immun.** 63(3): 1102–6, 1995.

64. 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**. 20:1161-81, 1996.

65. Dore MP, Sepulveda AR, El-Zimaity H. Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep. Implications for transmission to humans. **Am J Gastroenterol**. 96: 1396-401, 2001.

66. Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, Van Vliet AH, Reindl W, Backert S, Saur D, Schmid RM, Rad R. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms. **J Infect Dis**. 194(10): 1346-55, 2006.

67. Dowsett SA, Archila L, Segreto VA, González CR, Silva A, Vastola KA, Bartizek RD, Kowolik MJ. *Helicobacter pylori* infection in indigenous families of Central America: aerostats and oral and fingernail carriage. **J Clin Microbiol**. 37: 2456-60, 1999.

68. Du MQ, Isaccson PG. Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment. **Lancet Oncol.** 3: 97-104, 2002.

69. Dubois A, Boren T. *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. **Cell Microbiol**. 9(5):1108–16, 2007.

70. Dwivedi M, Misra SP, Misra V. Nodular gastritis in adults: clinical features, endoscopic appearance, histopathological features, and response to therapy. **J Gastroenterol Hepatol**. 23: 943–947, 2008.

71. Ek C, Whary MT, Ihrig M, Bravo LE, Correa P, Fox JG. Serologic Evidence that Ascaris and Toxoplasma Infections Impact Inflammatory Responses to *Helicobacter pylori* in Colombians. **Helicobacter**. 17: 107–115, 2012.

72. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. The role of

interleukin-1 polymorphims in the pathogenesis of gastric cancer. **Nature**. 412(6842):99; 2001.

73. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature**. 404, 398–402, 2000.

74. El-Omar EM, Penman ID, Ardill JE, Chittajallu RS, Howie C, McColl KE. *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. **Gastroenterology.** 109(3):681-91, 1995.

75. El-Omar EM, Oien K, El-Nujumi A, Gillen D, Wirz A, Dahill S, Williams C, Ardill JE, McColl KE. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastric acid hyposecretion. **Gastroenterology**. 113(1):15-24, 1997.

76. Elitsur Y, Raghuverra A, Sadat T, Vaid P. Is gastric nodularity a sign for gastric inflammation associated with *Helicobacter pylori* infection in children? **J Clin Gastroenterol.** 30: 286–288, 2000.

77. Engstrand I, Scheynius A, Pahlson C, Grimelius I, Schwan A, Gustavsson S. Association of Campylobacter pylori with induced expression of class II transplantation antigens on gastric epithelial cells. **Infect Immun**. 57: 827-32, 1989.

78. Ernst PB, Peura DA, Crowe SE. The translation of *Helicobacter pylori* basic research to patient care. **Gastroenterology.** 130: 188-206, 2006.

79. Evans DJ Jr, Evans DG. *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. **Helicobacter**. 5: 183-95, 2000.

80. Faller G, Kirchner T. *Helicobacter pylori* and antigastric autoimmunity. **Pathologe.** 22: 25-30, 2001.

81. Fan XG, Chua A, Fan XJ, Keeling PW. Increased gastric production of interleukin-8 and tumor necrosis factor in patients with *Helicobacter pylori* infection. **J Clin Pathol**. 48, 133–6, 1995.

82. Fernando N, Holton J, Zulu I, Vaira D, Mwaba P, Kelly P. *Helicobacter pylori* infection in an urban African population. **J Clin Microbiol.** 39: 1323-7, 2001.

83. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, Capelinha AF, Quint W, Caldas C, van Doorn LJ, Carneiro F, Sobrinho-Simões M. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. **J Natl Cancer Inst.** 94(22):1680-7, 2002.

84. Follmer C. Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. **J Clin Pathol**. 63: 424-30, 2010.

85. Fox JG, Beck P, Dangler CA, Whary MT, Wang TC, Shi HN, Nagler-Anderson C. Concurrent

enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. **Nat Med.** 6(5): 536-542, 2000.

86. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. **J Clin Invest**. 117(1): 60-69, 2007.

87. Frenck RW Jr, Clemens J. Helicobacter in the developing world. **Microbes Infect.** 5: 705-13, 2003.

88. Fuenmayor-Boscán A, Cavazza ME, Beltrán H, Gallegos B, Inciarte AE, Botero L, Avila M. Infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con patología gastrointestinal benigna. **Rev Soc Ven Microbiol.** 22(1): 27-31, 2002.

89. Fuenmayor A, Hernández I, Paz A, Cavazza ME, Lizarzábal M. Nuevas evidencias sobre la utilidad diagnóstica de una fórmula no Comercial para la detección de la actividad de ureasa de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas. **Kasmera** 34:40-52, 2006.

90. Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimura H. Interleukin 1β polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrent in Japan. **Gastroenterology**. 123: 92–105, 2002.

91. Futagami S, Hiratsuka T, Suzuki K, Kusunoki M, Wada K, Miyake K, Ohashi K, Shimizu M, Takahashi H, Gudis K, Kato S, Tsukui T, Sakamoto C. Gammadelta T cells increase with gastric mucosal interleukin (IL)-7, IL-1beta, and *Helicobacter pylori* urease specific immunoglobulin levels via CCR2 upregulation in *Helicobacter pylori* gastritis. **J Gastroenterol Hepatol.** 21:32-40, 2006.

92. Gaffen SL. Biology of recently discovered cytokines: interleukin-17 a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis. **Arthritis Res Ther**. 6: 240-7, 2004.

93. Genta RM, Hamner HW, Graham DY. Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. **Hum Pathol**. 24 (6): 577-83, 1993.

94. Ghoshal UC, Chaturvedi R, Correa P. The enigma of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. **Indian J Gastroenterol**. 29:95-100, 2010.

95. Glynn K, Friedman C, Gold B, Khanna B, Hutwagner L, Lihoshi N, Revollo C, Quick R. Seroincidence of *Helicobacter pylori* of rural Bolivian children: acquisition and analysis of possible risk factors. **Clin Infect Dis.** 35: 1059-65, 2002.

96. Goh KL, Wong HT, Lim CH, Rosaida MS. Time trends in peptic ulcer, erosive reflux oesophagitis, gastric and oesophageal cancers in a multiracial Asian population. **Aliment Pharmacol Ther**. 29(7):774-80, 2009.

97. Gonzalez-Valencia G, Perez-Perez GI, Washburn RG, Blaser MJ. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the bactericidal activity of human serum. **Helicobacter.** 1: 28–33, 1996.

98. Goodman KJ, Correa P. The transmission of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. **Int J Epidemiol.** 35: 1300-3, 1995.

99. Goodman KJ, Correa P. Transmission of *Helicobacter pylori* among siblings. **Lancet.** 355: 358-62, 2000.

100. Goodwin CS, Armstrong JA, Marshall BJ. Campylobacter pyloridis, gastritis and peptic ulceration. **J Clin Pathol**. 39: 353-65, 1986.

101. Graham DY. *Helicobacter pylori* infection is the primary cause of gastric cancer. **J Gastroenterol**. 35 (Suppl 12):90–7, 2000.

102. Groenen MJ, Kuipers EJ, Hansen BE, Ouwendijk RJ. Incidence of duodenal ulcers and gastric ulcers in a Western population: back to where it started. **Can J Gastroenterol**.23(9):604-8, 2009.

103. Hardin F, Wright R. *Helicobacter pylori*: review and update. **Hosp Phys.** 23-31, 2002.

104. Hassall E, Dimmick JE. Unique features of *Helicobacter pylori* disease in children. **Dig Dis Sci**. 36:417–23, 1991.

105. Hassan Momtaz, Negar Souod, Hossein Dabiri, Meysam Sarshar. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. **World J Gastroenterol**. 18(17): 2105–11, 2012.

106. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochem J**. 374(Pt 1):1-20, 2003.

107. Hergueta P, Rojo JM, Gancedo P, Herrerías JM. Infección por *Helicobacter pylori* y patología extradigestiva. **Anal Sist Sanit Navarra**. 21 (Suppl 2): 61-5, 1998.

108. Holcombe C. *Helicobacter pylori*: the African enigma. **Gut**. 33 (4): 429-31, 1992.

109. Hong SN, Jo S, Jang JH, Choi J, Kim S, Ahn SY, Kim JH, Choe WH, Lee SY, Sung IK, Park HS, Shim CS. Clinical characteristics and the expression profiles of inflammatory cytokines/ cytokine regulatory factors in asymptomatic patients with nodular gastritis. **Dig Dis Sci**. 57(6):1486-95, 2012.

110. Hou L, El-Omar EM, Chen J, Grillo P, Rabkin CS, Baccarelli A, Yeager M, Chanock SJ, Zatonski W, Sobin LH, Lissowska J, Fraumeni JF Jr, Chow WH. Polymorphisms in Th1-type cell-mediated response genes and risk of gastric cancer. **Carcinogenesis.** 28(1):118-23, 2007.

111. Houghton J, Fox JG, Wang TC. Gastric cancer: laboratory bench to clinic. **J Gastroenterol Hepatol**. 17:495-502, 2002.

112. IARC. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans, vol 61. Schistosomes, liver flukes and H. pylori. **Lyon, France: IARC**.177-240, 1994.

113. Imai S, Fujita K. Molecules of parasites as immunomodulatory drugs. **Curr Top Med Chem**. 4(5): 539-52, 2004.

114. Ismail HF, Fick P, Zhang J, Lynch RG, Berg DJ. Depletion of neutrophils in IL-10(-/-) mice delays clearance of gastric Helicobacter infection and decreases the Th1 immune response to Helicobacter. **J Immunol**. 170:3782-9, 2003.

115. Israel DA, Peek RM. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. **Aliment Pharmacol Ther**. 15: 1271–90, 2001.

116. Karttunen R, Karttunen T, Ekre HP, MacDonald TT. Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. **Gut**. 36:341-5, 1995.

117. Kato I, Vivas J, Plummer M, Lopez G, Peraza S, Castro D, Sanchez V, Cano E, Andrade O, Garcia R, Franceschi S, Oliver W, Muñoz N. Environmental factors in *Helicobacter pylori*-related gastric precancerous lesions in Venezuela. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 13: 468-6, 2004.

118. Gobert AP, Mersey BD, Cheng Y, Blumberg DR, Newton JC, Wilson KT. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. **J Immunol**. 168 (12): 6002-6, 2002.

119. Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. *Helicobacter pylori* infection activates NF-κB in gastric epithelial cells. **Gastroenterology**. 113(4), 1099–109, 1997.

120. Khakoo SI, Lobo AJ, Shepherd NA, Wilkinson SP. Histological assessment of the Sydney classification of endoscopic gastritis. **Gut**. 35: 1172-5, 1994.

121. Khamri W, Walker MM, Clark P, Atherton JC, Thursz MR, Bamford KB, Lechler RI, Lombardi G. *Helicobacter pylori* stimulates dendritic cells to induce interleukin-17 expression from CD4+ T lymphocytes. **Infect Immun**. 78(2):845-53, 2010.

122. Khan S, Karim A, Iqbal S. Helicobacter urease: niche construction at the single molecule level. **J Biosci**. 34: 503-11, 2009.

123. Kim SG, Kim JS, Kim JM, Chae Jung H, Sung Song I. Inhibition of proinflammatory cytokine expression by NF-kappaB (p65) antisense oligonucleotide in *Helicobacter pylori*-infected mice. **Helicobacter**. 10(6):559-66, 2005.

124. Koh H, Noh TW, Baek SY, Chung KS. Nodular gastritis and pathologic findings in children and young adults with *Helicobacter*

pylori infection. **Yonsei Med J**. 48(2):240–6, 2007.

125. Kolibásová K, Tóthová I, Baumgartner J, Filo V. Eradication of *Helicobacter pylori* as the only successful treatment in Rosacea. **Arch Dermatol**. 132(11):1393, 1996.

126. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. *Helicobacter pylori* infection in gastric cancerogenesis. **J Physiol Pharmacol.** 60: 3-21, 2009.

127. Ladas SD, Rokkas T, Georgopoulos S, Kitsanta P, Liatsos C, Eustathiadou P, Karameris A, Spiliadi C, Raptis SA. Predictive factors and prevalence of follicular gastritis in adults with peptic ulcer and nonulcer dyspepsia. **Dig Dis Sci**. 44: 1156–1160, 1999.

128. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, Glupczynski Y. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. **J Clin Microbiol**. 33(10): 2752–2756, 1995.

129. Lamarque D, Tran Van Nhieu J, Breban M. What are the gastric modifications induced by acute and chronic *Helicobacter pylori* infection? **Gastroenterol Clin Biol**. 27(3 Pt 2):391-400, 2003.

130. Lehmann FS, Terracciano L, Carena I, Baeriswyl C, Drewe J, Tornillo L, De Libero G, Beglinger C. In situ correlation of cytokine secretion and apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 283(2), G481–8, 2002.

131. Lindholm C, Quiding-Järbrink M,Lönroth H, Hamlet A, Svennerholm AM. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjets. **Infect Immun**. 66 (12):5964-71, 1998.

132. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. **Nature**. 445 (7130):915–8, 2007.

133. Lopes AI, Quiding-Jarbrink M, Palha A, Ruivo J, Monteiro L, Oleastro M, Santos A, Fernandez A. Cytokyne expression in pediatric *Helicobacter pylori* infection. **Clin Diagn Lab Immunol**. 12 (8): 994-1002, 2005.

134. Ma A, Koka R, Burkett. Diverse functions of IL-2, IL-5 and IL-17 in lymphoid homeostasis. **Annu Rev Immunol**. 24: 657-79, 2006.

135. Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, Castro-Alves C, Campos ML, Van-Doorn LJ, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrino-Simoes M. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. **Gastroenterology**. 125 (2): 364–71, 2003.

136. Maghidman S, Cok J, Bussalleu A. Histopathological findings in nodular gastritis. Experience at the Cayetano Heredia National Hospital. **Rev Gastroenterol Peru**. 21:261–270, 2001.

137. Mahajan R, El-Omar EM, Lissowska J, Grillo P, Rabkin CS, Baccarelli A, Yeager M, Sobin LH, Zatonski W, Channock SJ, Chow WH, Hou L. Genetic variants in T helper cell type 1, 2 and 3 pathways and gastric cancer risk in a Polish population. **Jpn J Clin Oncol**. 38(9):626-33, 2008.

138. Makristathis A, Barousch W, Pasching E, Binder C, Kuderna C, Apfalter P, Rotter M, Hirschill A. Two enzyme immunoassays and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens from pediatric patients before and after eradication therapy. **J Clin Microbiol**. 38: 3710-4, 2000.

139. Martin HR, Shakya KP, Muthupalani S, Ge Z, Klei TR, Whary MT, Fox JG. Brugia filariasis differentially mod ulates persistent *Helicobacter pylori* gastritis in the gerbil model. **Microbes Infect**. 12 (10): 748-58, 2010.

140. Meining A, Bayerdörffer E, Müller P, Miehlke S, Lehn N, Hölzel D, Hatz R, Stolte M. Gastric carcinoma risk index in patients infected with *Helicobacter pylori*. **Virchows Arch**. 432(4):311-4, 1998.

141. Melvin D, Brooke M. **Métodos de laboratorio para el diagnóstico de parasitosis intestinales.** Editorial Iberoamericana, S.A. México. 1971. p.198.

142. Méndez-Castellano H. Estratificación Social; Método Graffar Modificado. **Arch Ven Pueric Ped**. 49:93-104, 1986.

143. Merino D, Galván M, Fabre A, Balbachán S, Miranda O, Gorodner J, Alonso J. *Helicobacter pylori* infection in children from Northeast Argentina: seroprevalence and its relation with nutritional status and socio-sanitary conditions. **Rev Enf Emerg**.4: 24-9, 2002.

144. Meyer F, Wilson KT, James SP. Modulation of innate cytokine responses by products of *Helicobacter pylori*. **Infect Immun**. 68(11): 6265–72, 2000.

145. Michetti P, Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ, Neutra MR. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen Salmonella typhimurium. **Infect Immun**. 60: 1768–92, 1992.

146. Milman N, Rosenstock S, Andersen L, Jorgensen T, Bonnevie O. Serum ferritin, hemoglobin, and *Helicobacter pylori* infection: a seroepidemiologic survey comprinsing 2794 Danish adults. **Gastroenterology**. 115: 268-74, 1998.

147. Miyaji H, Azuma T, Ito S, Abe Y, Gejyo F, Hashimoto N, Sugimoto H, Suto H, Ito Y, Yamazaki Y, Kohli Y, Kuriyama M. *Helicobacter pylori* infection

occurs via close contact with infected individuals in early childhood. **J Gastroenterol Hepatol**. 15(3):257-62, 2000.

148. Miyamoto M, Haruma K, Yoshihara M, et al. Five cases of nodular gastritis and gastric cancer: a possible association between nodular gastritis and gastric cancer. **Dig Liver Dis**. 34: 819–820, 2002.

149. Miyamoto M, Haruma K, Yoshihara M, Hiyama T, Sumioka M, Nishisaka T, Tanaka S, Chayama K. Nodular gastritis in adults is caused by *Helicobacter pylori* infection. **Dig Dis Sci**. 48(5):968-75, 2003.

150. Miwa H, Go MF, Sato N. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: the Asian enigma. **Gastroenterol**. 97(5):1106-12, 2002.

151. Mohammed Mahdy Khalifa, Radwa Raed Sharaf, Ramy Karam Aziz. *Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen? **Gut Pathog**. 2: 2, 2010.

152. Montecucco C, De Bernard M. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophilactivating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. **Microbes Infect**. 5: 715-21, 2003.

153. Montecucco C, Rappuoli R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2: 457-66, 2001.

154. Moran AP, Lindner B, Walsh EJ. Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. **J Bacteriol**. 179(20):6453-63, 1997.

155. Moreau E, Chauvin A. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. **J Biomed Biotechnol**, 2010.

156. Muñoz N, Kato I, Peraza S, Lopez G, Carrillo E, Ramirez H, Vivas J, Castro D, Sanchez V, Andrade O, Buiatti E, Oliver W. Prevalence of precancerous lesions of the stomach in Venezuela. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 5(1):41-6, 1996.

157. Necchi V, Candusso ME, Tava F, Luinetti O, Ventura U, Fiocca R, Ricci V, Solcia E. Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**. 132(3):1009–23, 2007.

158. Nilsson C, Skoglund A, Moran AP, Annuk H, Engstrand L, Normark S. Lipopolysaccharide diversity evolving in *Helicobacter pylori* communities through genetic modifications in fucosyltransferases. **PLoS One**. 3: e3811, 2008.

159. Noach LA, Bosma NB, Jansen J, Hoek FJ, van Deventer SJ, Tygat GN. Mucosal tumor necrosis factor-α, interleukin-1β, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori*

infection. **Scand J Gastroenterol**. 29, 425–9, 1994.

160. Offerhaus GJ, Price AB, Haot J, ten Kate FJ, Sipponen P, Fiocca R, Stolte M, Dixon MF. Observer agreement on the grading of gastric atrophy. **Histopathology**. 34 (4):320- 5, 1999.

161. Ohara H, Isomoto H, Wen CY, et al. Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule 1 on vascular endothelium of gastric mucosa in patients with nodular gastritis. **World J Gastroenterol**. 9:2701–5, 2003.

162. O'Keeffe J, Moran AP. Conventional, regulatory, and unconventional T cells in the immunologic response to *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**. 13(1):1-19, 2008.

163. Orsini B, Vivas JR, Ottanelli B, Amedei A, Surrenti E, Galli A, Milani S, Pinzani P, Del Prete G, Surrenti C, Baldari CT, Touati E, D' Elios MM. Human gastric epithelium produces IL-4 and IL-4delta2 isoform only upon *Helicobacter pylori* infection. **Int J Immunopathol Pharmacol**. 20(4):809-18, 2007.

164. Ortiz D, Daoud G, Daoud N, Cavazza ME, Urrestarazu MI, Rodríguez N, Correnti, M, Ávila M. Evaluación de los niveles de IgA secretora en saliva de niños con *Helicobacter pylori*. **Arch Venezol Pueric Ped.** 65: 44-9, 2001.

165. Palli D, Masala G, Del Giudice G, Plebani M, Basso D, Berti D, Numans ME, Ceroti M, Peeters PH, Bueno de Mesquita HB, Buchner FL, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Krogh V, Saieva C, Vineis P, Panico S, Tumino R, Nyrén O, Simán H, Berglund G, Hallmans G, Sanchez MJ, Larrãnaga N, Barricarte A, Navarro C, Quiros JR, Key T, Allen N, Bingham S, Khaw KT, Boeing H, Weikert C, Linseisen J, Nagel G, Overvad K, Thomsen RW, Tjonneland A, Olsen A, Trichoupoulou A, Trichopoulos D, Arvaniti A, Pera G, Kaaks R, Jenab M, Ferrari P, Nesi G, Carneiro F, Riboli E, Gonzalez CA. CagA+ *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk in the EPIC-EURGAST study. **Int J Cancer**. 120(4): 859-67, 2007.

166. Parsonnet J, Shmuely H, Haggerty T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. **JAMA**. 282(23):2240-5, 1999.

167. Peek RM Jr, Fiske C, Wilson KT. Role of Innate Immunity in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Malignancy. **Physiol Rev**. 90(3): 831–58, 2010.

168. Pellicanò A, Imeneo M, Leone I, Larussa T, Luzza F. Enhanced activation of cyclooxygenase-2 downregulates Th1 signaling pathway in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. **Helicobacter**. 12(3):193-9, 2007.

169. Pellicano R, Oliaro E, Fagoonee S, Astegiano M, Berrutti M, Saracco G, Smedile A, Repici A, Leone N, Castelli A, Luigiano C, Fadda M, Rizzetto M. Clinical and biochemical parameters related to

cardiovascular disease after *Helicobacter pylori* eradication. **Int Angiol**. 28(6):469-73, 2009.

170. Perrone M, Correnti M, Berroteran A, López T, Avila M, Cavazza ME, Lecuna V. La placa dental como reservorio de *Helicobacter pylori*. **Rev Soc Ven Microbiol.** 27(2): 95-9, 2007.

171. Perrone M. Gonzalez-Valencia G. Camorlinga M. Correnti M. Cavazza M.E. Lecuna, V. Torres J. Identificación de genotipos de *Helicobacter pylori*, provenientes de muestras de placa dental en la población venezolana. **Acta Odontológica Venezolana**. 44(1): 58-63, 2006.

172. Piñero R, Plasencio A, Ávila M, Urrestarazu MI, Serrano N, Correnti M, Cavazza M.E. *Helicobacter pylori* en niños de "El Clavo", una población rural venezolana. **Gen**. 54: 12-7, 2000.

173. Platanias LC. Mechanisms of type-I and type-II-interferon-mediated signaling. **Nat Rev Immunol**. 5:375-86, 2005.

174. Polk DB, Peek RM. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. **Nat Rev Cancer**. 10(6):403–14, 2010.

175. Portal-Celhay C., Pérez-Pérez GI. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. **Clin Sci**. 110(3):305-14, 2006.

176. Prieto G, Polanco I, Larrauri J, Rota L, Lama R, Carrasco S. *Helicobacter pylori* infection in children: clinical, endoscopic, and histologic correlations. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. 14(4):420-5, 1992.

177. Rafeey M, Jafari Rouhi AH, Gassemi BA, Rouhi AJ. Relationship between endoscopic nodular gastritis and *Helicobacter pylori* infection in children. **Indian J Gastroenterol**. 23: 138–139, 2004.

178. Raghavan S, Quiding-Järbrink M. Immune modulation by regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-associated diseases. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**. 12(1):71-85, 2012.

179. Rathinavelu S, Kao JY, Zavros Y, Merchant JL. *Helicobacter pylori* outer membrane protein 18 (Hp1125) induces dendritic cell maturation and function. **Helicobacter**. 10: 424-32, 2005.

180. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, Atherton JC. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. **Gastroenterology**. 133(3): 926-36, 2007.

181. Robinson K, Argent RH, Atherton JC. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**. 21:237-59, 2007.

182. Robinson K, Louglin MF, Potter R, Jenks PJ. Host adaptation and immune modulation are mediated

by homologous recombination in *Helicobacter pylori*. **J Infect Dis**. 191: 579–587, 2005.

183. Roma-Giannikou E, Shchrbakov PL. Infection for *Helicobacter pylori* in pediatrics. **Helicobacter**.7 (Suppl 1): 50-5, 2002.

184. Romero-Adrián T, Leal-Montiel J, Monsalve-Castillo F, Mengual-Moreno E, García McGregor E, Perini L, Antúnez A. *Helicobacter pylori*: Bacterial factors and the role of citokines in the immune response. **Curr Microbiol**. 60: 143-155, 2010.

185. Rothenbacher D, Brenner H. Burden of *Helicobacter pylori* and H. pylori-related diseases in developed countries: recent developments and future implications. **Microbes Infect**. 5: 693-703, 2003.

186. Rothenbacher D, Winkler M, Gonser T, Adler G, Brenner H. Role of infected parents in transmission of *Helicobacter pylori* to their children. **Pediatr Infect Dis J**. 21(7):674-9, 2002.

187. Rubin CE. Are there three types of *Helicobacter pylori* gastritis? **Gastroenterology**. 112: 2108-10, 1997.

188. Rugge M, Genta RM. Staging and grading of chronic gastritis. **Hum Pathol**. 36 (3): 228-33, 2005.

189. Ruggiero P. *Helicobacter pylori* and inflammation. **Curr Pharm Des**. 16; 4225-4236, 2010.

190. Ruiz-Palacios GM, Calva JJ, Pickering LK, Lopez-Vidal Y, Volkow P, Pezzarossi H, West MS. Protection of breast-fed infant against Campylobacter diarrhea by antibodies in human milk. **J Pediatr**. 116(5): 707–13, 1990.

191. Sabbi T, Dall'Oglio L, De Angelis P, Torroni E, Colistro F, Azzolina M, Santoni A, Di Ciommo V, Benedetto M. Utility of a stool antigen test to detect the incidence of *Helicobacter pylori* infection and familial and community enviromental risk factors for this infection in pediatric age. **Pediatr Med Chir**. 34(2):89-95, 2012.

192. Sacco F, Bruce MG, McMahon BJ, Bruden D. A prospective evaluation of 200 upper endoscopies performed in Alaska Native persons. **Int J Circumpolar Health**. 66(2):144-52, 2007.

193. Saldinger PF, Porta N, Launois P, Louis JA, Waanders GA, Bouzouréne H, Michetti P, Blum AL, Corthésy-Theulaz IE. Immunization of BALB/c mice with Helicobacter urease B induces a T helper 2 response absent in Helicobacter infection. **Gastroenterology**. 115(4):891-7, 1998.

194. Sathar MA, Gouws E, Simjee AE. Seroepidemiological study of *Helicobacter pylori* infection in South African children. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 91: 393-5, 1997.

195. Sawai N, Kita M, Kodama T, Tanahashi T, Yamaoka Y, Tagawa Y, Iwakura Y, Imanishi J. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. **Infect Immun**. 67(1):279-85, 1999.

196. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. **Cell.** 140: 821-32, 2010.

197. Serrano C., Diaz MI, Valdivia A, Godoy A, Peña A, Rollan A, Kirberg A, Hebel E, Fierro J, Klapp G, Venegas A, Harris PR. Relationship between *Helicobacter pylori* virulence factors and regulatory cytokines as predictors of clinical outcome. **Microbes Infect**. 9(4): 428-34, 2007.

198. Shi Y, Liu XF, Zhuang Y, Zhang JY, Liu T, Yin Z, Wu C, Mao XH, Jia KR, Wang FJ, Guo H, Flavell RA, Zhao Z, Liu KY, Xiao B, Guo Y, Zhang WJ, Zhou WY, Guo G, Zou QM. *Helicobacter pylori*-induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice. **J Immunol**. 184(9):5121-9, 2010.

199. Shirai M, Arichi T, Nakazawa T, Berzofsky A. Persistent infection by H. pylori down-modulates virus-specific CD8 cytotoxic T-cell response and prolongs viral infection. **J Infect Dis**. 177: 72-80, 1998.

200. Smolka AJ, Backert S. How *Helicobacter pylori* infection controls gastric acid secretion. **J Gastroenterol**. 47(6):609-18, 2012.

201. Sokmensuer C, Koral Onal I, Yeniova O, Ersoy O, Aydinli M, Yonem O, Harmanci O, Demir Onal E, Altinok G, Batman F, Bayraktar Y. What are the clinical implications of nodular gastritis? Clues from Hhistopathology. **Dig Dis Sci**. 54:2150–2154, 2009.

202. Speiran K, Bailey DP, Fernando J, Macey M, Barnstein B, Kolawole M, Curley D, Watowich SS, Murray PJ, Oskeritzian C, Ryan JJ. Endogenous suppression of mast cell development and survival by IL-4 and IL-10. **J Leukoc Biol**. 85(5):826-36, 2009.

203. Stein M, Rappuoli R, Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. **Proc Natl Acad Sci USA**. 97: 1263-8, 2000.

204. Strömberg E, Edebo A, Svennerholm AM, Lindholm C. Decreased epithelial cytokine responses in the duodenal mucosa of *Helicobacter pylori*-infected duodenal ulcer patients. **Clin Diagn Lab Immunol**. 10 (1): 116-24, 2003.

205. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. **N Engl J Med**. 10; 347(15): 1175-86, 2002.

206. Sung JJ, Kuipers EJ, El-Serag HB. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Aliment**

Pharmacol Ther. 29(9):938-46, 2009.

207. Taylor JM, Ziman ME, Canfield DR, Vajdy M, Solnick JV. Effects of a Th1 versus a Th2 biased immune response in protection against *Helicobacter pylori* challenge in mice. **Microb Pathog**. 44(1): 20–7, 2008.

208. Terebiznik MR, Vazquez CL, Torbicki K, Banks D, Wang T, Hong W, Blanke SR, Colombo MI, Jones NL. *Helicobacter pylori* VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. **Infect Immun**. 74(12): 6599-614, 2006.

209. Tindberg Y, Bengstsson C, Granath F, Blennow M, Nyren O, Granstrom M. *Helicobacter pylori* infection in Swedish school children: lack of evidence of child to child transmission outside the family. **Gastroenterology**. 121: 310-6, 2001.

210. Torres J, Pérez G, Ximenez C, Muñoz L, Camorlinga M, Ramos F, Gomez A, Muñoz O. The association of intestinal parasitosis and *Helicobacter pylori* infection in children and adults from a Mexican community with high prevalence of parasitosis. **Helicobacter**. 8: 179 – 85, 2003.

211. Torres VJ, Ivie SE, McClain MS, Cover TL. Functional properties of the p33 and p55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. **J Biol Chem**. 280: 21107-14, 2005.

212. Tummala, S., Keates, S. and Kelly, C. P. Update on the immunologic basis of *Helicobacter pylori* gastritis. Curr. Opin. **Gastroenterol.** 20, 592–597, 2004.

213. Ubukata H, Nagata H, Tabuchi T, Konishi S, Kasuga T, Tabuchi T. Why is the coexistence of gastric cancer and duodenal ulcer rare? Examination of factors related to both gastric cancer and duodenal ulcer. **Gastric Cancer**. 14(1):4-12, 2011.

214. Uehara A., Okumura T, Sekiya C, Okamura K, Takasugi Y, Namiki M. Interleukin-1 inhibits the secretion of gastric acid in rats: possible involvement of prostaglandin. **Biochem Biophys Res Commun**. 162: 1578-84, 1989.

215. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. **N Engl J Med**. 345(11):784-9, 2001.

216. Uyanikoğlu A, Danalioğlu A, Akyüz F, Ermış F, Güllüoğlu M, Kapran Y,Demır K,Ozdıl S, Beşişik F, Boztaş G, Mungan Z, Kaymakoğlu S. Etiological factors of duodenal and gastric ulcers. **Turk J Gastroenterol**. 23(2):99-103, 2012.

217. Vega-Ramos B, Rodríguez-Moguel L. *Helicobacter pylori*. Its relationships and morphological controversies. **Rev**

Gastroenterol Mex. 65(4 Suppl 2):34-40, 2000.

218. Versalovic J. *Helicobacter pylori*: Pathology and diagnostic strategies. **Am J Clin Pathol**. 119: 403-12, 2003.

219. Vieth M, Stolte M. Elevated risk for gastric adenocarcinoma can be predicted from histomorphology. **World J Gastroenterol**. 12(38):6109-14, 2006.

220. Muñoz N, Plummer M, Vivas J, Moreno V, De Sanjose S, Lopez G, Oliver W. A case-control study of gastric cancer in Venezuela. **Int J Cancer**. 93, 417–423, 2001.

221. Wang AY, Peura DA. The prevalence and incidence of *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer disease and upper gastrointestinal bleeding throughout the world. **Gastrointest Endosc Clin N Am**. 21(4):613-35, 2011.

222. Wang YH, Wu JJ, Lei HY. The autophagic induction in *Helicobacter pylori*-infected macrophage. Exp Biol Med. 234: 171-80, 2009.

223. Waye J, Geenen J, Fleischer D, eds. **Techniques in therapeutic Endoscopy**. New York: Gower Medical Publishing Ltd. 74pp, 1987.

224. Weyermann M, Adler G, Brenner H, Rothenbacher D. The mother as source of *Helicobacter pylori* infection. **Epidemiology**. 17(3):332-4, 2006.

225. Whary MT, Fox JG. Th1-mediated pathology in mouse models of human disease is ameliorated by concurrent Th2 responses to parasite antigens. **Curr Top Med Chem**. 4(5): 531-8, 2004.

226. Whary MT, Sundina N, Bravo LE, Correa P, Quinones F, Caro F, Fox JG. Intestinal helminthiasis in Colombian children promotes a Th2 response to *Helicobacter pylori*: possible implications for gastric carcinogenesis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 14(6):1464-9, 2005.

227. Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. **Gastroenterology**. 133(1):288-308, 2007.

228. Windle HJ, Ang YS, Athie-Morales V, McManus R, Kelleher D. Human peripheral and gastric lymphocyte responses to *Helicobacter pylori* NapA and AphC differ in infected and uninfected individuals. **Gut**. 54: 25-32, 2005.

229. Wizla-Derambure N, Michaud L, Ategbo S. Familial and community environmental risk factors for *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. 33: 58-63, 2001.

230. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Imanishi J. *Helicobacter pylori* cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa.

Gastroenterology. 110(6):1744-52, 1996.

231. Yamaoka Y. Increasing evidence of the role of *Helicobacter pylori* SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. **J Infect Dev Ctries**. 2: 174-81, 2008.

232. Yamauchi K, Choi IJ, Lu H, Ogiwara H, Graham DY, Yamaoka Y. Regulation of IL-18 in *Helicobacter pylori* infection. **J Immunol**. 180: 1207-16, 2008.

233. Yan SL, Wu ST, Chen CH, Hung YH, Yang TH, Pang VS, Yeh YH. Mucosal patterns of *Helicobacter pylori*-related gastritis without atrophy in the gastric corpus using standard endoscopy. **World J Gastroenterol**. 16(4): 496-500, 2010.

234. Yuan W, Li Yumin, Yang Kehu, Ma Bin, Guan Quanlin, Wang D, Yang L. Iron deficiency anemia in *Helicobacter pylori* infection: meta-analysis of randomized controlled trials. **Scand J Gastroenterol.** 45(6):665-76, 2010.

235. Zambon CF, Basso D, Navaglia F, Belluco C, Falda A, Fogar P, Greco E, Gallo N, Rugge M, Di Mario F, Plebani M. Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome. **Cytokine**. 29: 141-52, 2005.

236. Zhang C, Yamada N, Wu YL, Wen M, Matsuhisa T, Matsukura N. Comparison of *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal histological features of gastric ulcer patients with chronic gastritis patients. **World J Gastroenterol**. 11(7):976-81, 2005.

ANEXOS