

Inmunotipificación de linfocitos en mucosa gástrica de pacientes infectados por *H. pylori* en dos regiones geográficas con contraste en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico

Immunotyping of lymphocytes in the gastric mucosa of patients infected by *H. pylori* in two regions with contrast in the risk of developing gastric cancer

Luis Eduardo Bravo^a, Andrés Jenuer Matta^{a,b}, Diana Carolina Zambrano^{a,b}

^aDepartamento de Patología, Escuela de Medicina, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

^bFacultad de Ciencias de la Educación y del Deporte, Escuela nacional del Deporte. Cali, Colombia.

Recibido: 9 de febrero de 2021; Aceptado: 2 de enero de 2022

¿Qué se sabe del tema que trata este estudio?

La caracterización de las alteraciones iniciales ocasionadas por *H. pylori* no son posibles de evaluar por falta de especificidad de los síntomas, lo que hace poco probable la indicación de una endoscopia para evaluar la mucosa en individuos recientemente infectados.

¿Qué aporta este estudio a lo ya conocido?

La comparación de la respuesta inflamatoria en poblaciones con contraste en el riesgo de cáncer gástrico describe un patrón caracterizado por la carga bacteriana y aumento del daño al moco del epitelio, representando el daño de la bacteria al epitelio.

Resumen

En la infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) intervienen múltiples factores internos y externos al hospedero. Entre los factores internos, la respuesta inmune desempeña un papel fundamental en el proceso de presentación de antígenos, respuesta linfocítica y respuesta reguladora mediada por citoquinas que se asocian directamente con la progresión y pronóstico de la enfermedad. **Objetivo:** Comparar la respuesta inmune en mucosa gástrica de pacientes infectados por *H. pylori* en dos regiones geográficas con contraste en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico. **Pacientes y Método:** Se incluyeron 71 participantes con síntomas de dispepsia, se tomaron biopsias de diferentes regiones de la mucosa gástrica; la identificación de *H. pylori* se realizó por cultivo y reacción en cadena de la polimerasa del gen ureA. Para la caracterización de las alteraciones histopatológicas y la Inmunotipificación de linfocitos, se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón antihumanos específicos para cada antígeno: Linfocitos T: CD3 y CD8; Linfocitos B: CD20; Células Natural Killer: CD56; Macrófagos: CD68. **Resultados:** La prevalencia de *H. pylori* fue de 83,1%, Predominaron la gastritis crónica y la gastritis atrófica multifocal con metaplasia intestinal 63,4% y 22,5%, respectivamente. La respuesta

Palabras clave:
Helicobacter pylori;
Niños;
Cáncer;
Cáncer Gástrico;
Anatomía;
Histología.

celular se caracterizó principalmente por linfocitos polimorfonucleares, y reactividad positiva anti CD8 tanto en estroma como en el epitelio. **Conclusiones:** La gastritis atrófica multifocal fue más predominante en la región de alto riesgo de cáncer gástrico mientras que la gastritis no atrófica y la expresión de los antígenos CD3 y CD8 en el epitelio foveolar fue más alta en la región de bajo riesgo de cáncer gástrico.

Abstract

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection involves multiple factors internal and external to the host. Among the internal factors, the immune response plays a fundamental role in the process of antigen presentation, lymphocytic response and cytokine-mediated regulatory response that are directly associated with disease progression and prognosis. **Objective:** To compare the immune response in gastric mucosa of *H. pylori* infected patients in two regions comparing the risk of developing gastric cancer. **Patients and Method:** 71 participants with symptoms of dyspepsia were included. The samples for biopsies were collected from different regions of the gastric mucosa; the identification of *H. pylori* was carried out by culture and polymerase chain reaction (PCR) of the ureA gene. For the characterization of the histopathological alterations and the immunophenotyping of lymphocytes, anti-human mouse monoclonal antibodies specific for each antigen were used: T lymphocytes: CD3 and CD8; B lymphocytes: CD20; Natural Killer Cells: CD56; Macrophages: CD68. **Results:** The prevalence of *H. pylori* was 83.1%, the predominant types of gastritis were chronic gastritis and multifocal atrophic gastritis with intestinal metaplasia (63.4% and 22.5%, respectively). The cellular response was characterized mainly by polymorphonuclear lymphocytes and positive anti-CD8 reactivity both in stroma and epithelium. **Conclusions:** Multifocal atrophic gastritis was more prevalent in the high-risk region for gastric cancer (GC) while non-atrophic gastritis and the expression of CD3 and CD8 antigens in the foveolar epithelium was higher in the low-risk region.

Keywords:

Helicobacter pylori;
Children;
Cancer;
Gastric Cancer;
Anatomy;
Histology.

Introducción

La infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) incrementa el riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Sin embargo, el desarrollo de la neoplasia es el resultado final de un proceso prolongado, multifactorial precedido por lesiones histopatológicas precursoras y presumiblemente secuenciales en las cuales las alteraciones celulares se encuentran asociadas con anomalías en el microambiente gástrico^{1,2}.

H. pylori es un organismo con gran diversidad genómica y una elevada capacidad de colonizar simultáneamente el mismo tejido con múltiples cepas³. Aunque no se ha identificado una cepa mutagénica o carcinogénica, estudios inmunológicos y moleculares dividen a *H. pylori* en dos grupos basados en la presencia del antígeno *cagA* que usualmente es co-expresado con la citotoxina vacuolizante con mayor capacidad para producir daño en la mucosa gastroduodenal e inclusive incrementan el riesgo para adenocarcinoma gástrico^{4,5}.

En Colombia existen zonas con riesgo extremadamente alto para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico del tipo intestinal con tasas de prevalencia hasta 150/100.000 habitantes⁶, Pasto (alto riesgo para cáncer gástrico), en estas poblaciones, la infección por *H. pylori* tiene las características de una hiperendemia: la

prevalencia es del 52% a los 2 años de vida, se incrementa al 80% a los 9 años y en adultos se ha reportado la prevalencia del 93%⁷. Sin embargo, existen poblaciones en las cuales la prevalencia de la infección es muy alta pero las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer gástrico son muy bajas Tumaco (bajo riesgo para cáncer). Este fenómeno se observó primero en África y se denominó “enigma africano”⁸. En Colombia las costas Atlántica y Pacífica han registrado tasas muy bajas de cáncer gástrico a pesar de existir altas tasas de infección por *H. pylori*, lo que podría denominarse “el enigma costero”⁹.

Las causas que resultan en un efecto carcinogénico en unas poblaciones, pero no en otras son desconocidas. Se sabe que el tipo de gastritis crónica inducida por la infección varía considerablemente, los pacientes con ulcera duodenal, causada por *H. pylori* tienen una gastritis de predominio en el antro gástrico, sin pérdida de glándulas (atrofia), denominada gastritis no atrófica o gastritis antral difusa, y dichos pacientes, no tienen tasas elevadas de cáncer gástrico¹⁰. En otros pacientes la gastritis se acompaña de atrofia multifocal y metaplasia intestinal, dichos pacientes frecuentemente tienen ulcera gástrica alta y un riesgo elevado de cáncer gástrico¹¹.

Aunque se describe la influencia de factores genéticos¹², la evidencia epidemiológica en el hombre no

favorece una base genética como el factor que determine principalmente el cáncer gástrico. Por el contrario, los factores ambientales parecen tener una influencia predominante y actualmente se postula que la modulación de la respuesta inflamatoria inducida por la bacteria podría ser una de las principales responsables del resultado de la infección que puede conducir o no al desarrollo de enfermedad y cáncer¹³. El objetivo de esta investigación fue comparar la respuesta inmune en mucosa gástrica de pacientes infectados por *H. pylori* en dos regiones geográficas con contraste en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

Pacientes y Método

Diseño

Estudio descriptivo con 35 pacientes del Municipio de Pasto y 36 del Municipio de Tumaco. Se seleccionaron pacientes con síntomas de dispepsia, a quienes su respectivo médico había indicado una valoración endoscópica mediante un esofagogastroduodenoscopia como parte de sus procedimientos diagnósticos. Se obtuvo de cada paciente 7 biopsias como parte del examen de rutina (una biopsia se obtuvo en la curvatura mayor a 5 cm del píloro, cuatro de la curvatura menor inmediatamente por debajo de la incisura angularis y 2 de la parte media del cuerpo gástrico) que se usaron para identificación de *H. pylori* (por métodos microbiológicos y por métodos moleculares), también para evaluación histoquímica de la mucosa gástrica y para inmunotipificación de linfocitos en mucosa gástrica.

Aspectos Éticos

Esta investigación tuvo el aval del Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH) de la Universidad del Valle. El consentimiento informado se obtuvo de todos los participantes adultos y de los padres o representantes legales del menor, al igual que el asentimiento los niños.

Definición de infección

La identificación molecular es considerada la prueba Gold Standard para la identificación de *H. pylori*, por tal motivo en este estudio se realizaron pruebas moleculares, microbiológicas e inmunohistoquímicas para la identificación de *H. pylori*, sin embargo, se consideró a la identificación molecular como la prueba de referencia para establecer positividad para *H. pylori*.

Aislamiento y cultivo de *H. pylori*

Los fragmentos de mucosa gástrica fueron homogenizados en 200 µL de solución salina estéril 0,89%. El homogenizado se sembró en platos de agar Columbia (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) con

sangre desfibrinada de cordero al 7% más suplemento selectivo para *H. pylori* (Dent) e incubados en condiciones microaerofílicas (6% O₂, 6% CO₂, 88% N₂ usando CampyPak Plus envelop, BBL, Nashville, TN United States) a 37 °C durante 4 a 8 días¹⁴. Se consideraron como criterios para identificación del *H. pylori* la presencia de colonias translúcidas, no hemolíticas, convexas de 1-2mm que crecieron en ambiente microaerofílico. Las colonias compatibles con *H. pylori* se transfirieron a agar Columbia con sangre desfibrinada de cordero al 10%, para purificarlas e identificarlas mediante las pruebas de ureasa, catalasa, oxidasa, tinción de Gram¹⁵.

Extracción de ADN de aislados de *H. pylori*

De un cultivo puro en plato petri se transfirieron colonias a 1,0 ml de PBS 1X pH = 7,2, y se centrifugó a 13.000 RPM x 2 min. El botón celular se re-suspendió en 300µl de buffer de extracción (proteínasa K 100 µg/ml, dodecil sulfato sódico (SDS) 0,5%, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM, Tris-HCl 10 mM, pH = 8,0 y 276 µL de agua destilada), el botón celular se homogenizó y se llevó al bloque seco (Labnet®) a 56 °C por 18 h, posteriormente se inactivó la proteína K a 76 °C por 10 min y se adicionó NaCl 5M. Se agitó en vortex por 15 seg y posterior centrifugación a 13.000 rpm por 5 min. Al sobrenadante se le adicionaron 2 volúmenes etanol absoluto y se centrifugó a 13.000 RPM por 20 min a 4 °C. El decantado se precipitó por adición de 2 volúmenes de etanol absoluto al 70%, se mezcló y se centrifugó por 5 min a 13.000 RPM, se descartó el sobrenadante. El botón de ADN se secó por inversión del tubo por 10 min. El ADN precipitado se re-suspendió en 100 µl de buffer TE (Tris 10 mMol, EDTA 1 mMol) y se almacenó a -20 °C.

Identificación molecular de *H. pylori*

Se realizó mediante la amplificación por PCR del gen *ureA*¹⁶. Se adicionaron los siguientes reactivos a un tubo de 0,2 mL: 1X de buffer de PCR (Buffer green 5X Promega®), 1 µM de MgCl₂ (Promega®), 0,25 mM de dNTPs (desoxirribonucleosidos 5'-trifosfato - dATP, dCTP, dGTP y dTTP Promega®), 50 pmol/µL de cada cebador (sentido 3'-AAGACATCACTATCAACG-5'/ anti-sentido 5'-CCCGCTCGCAATGTCTAA-3'), 0,5 U de GoTaq ADN polimerasa (Promega®); y 25 ng de ADN genómico de *H. pylori* en un volumen final de 25 µL. La amplificación se realizó a 95 °C/2 min, seguida de 35 ciclos [95 °C/1 min, 54 °C/1 min y 72 °C/1 min] y una extensión final a 72 °C/15 min.

Electroforesis de amplicones

Todos los amplicones obtenidos en las reacciones de PCR descritas anteriormente se ejecutaron en gel de agarosa (SeaKim, FMC BioLabs) al 2%, teñido con

bromuro de etidio (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a 0,5 µg/mL, en una cámara de electroforesis (Fotodyne Inc., Hartland, WI, Estados Unidos). Este proceso fue realizado por una fuente de alimentación compacta EC-105 (Thermo Fisher Scientific Inc., Asheville, NC, Estados Unidos) a 75 V durante 40 min.

Histopatología

Cada fragmento obtenido para evaluación histológica fue fijado, procesado y examinado separadamente, con un protocolo de deshidratación de 2 hr, seguido de inclusión en parafina en las primeras 24 h. Durante el proceso de inclusión las biopsias fueron cuidadosamente orientadas para que el plano de la mucosa quedara perpendicular a la superficie de corte, garantizando una apropiada evaluación de todo el espesor de la mucosa. Se realizaron cortes histológicos de 5µm de grosor en micrótopo (Accu-Cut® SRM), y se llevaron a un portaobjeto previamente tratado con alcohol-ácido en el que se colocaron tres secciones de mucosa, que fueron fijados por calor a 56 °C durante toda la noche. Se realizaron las siguientes evaluaciones: severidad de la gastritis, depleción de moco, infiltración por polimorfo nucleares neutrófilos, presencia de células mononucleares y linfocitos intraepiteliales, daño epitelial y abundancia de *H. pylori*.

Evaluación histoquímica de la mucosa gástrica

Para determinar la presencia de *H. pylori* se utilizó la tinción de Giemsa modificada en busca de bacilos curvos y espiralados, a los casos negativos se les realizó la tinción Steiner modificada. Para evaluar la integridad y la cantidad de moco del epitelio superficial se realizó la coloración de Alcian Blue-PAS a pH 2,57. Cada uno de los fragmentos se evaluaron por separado y las alteraciones histopatológicas encontradas en la mucosa gástrica se graduaron de acuerdo con la escala visual análoga descrita por Dixon¹⁷⁻¹⁹.

Inmunotipificación de linfocitos en mucosa gástrica

Los antígenos leucocitarios presentes en el tejido linfóide asociado a la mucosa gástrica fueron identificados y caracterizados utilizando anticuerpos monoclonales de ratón antihumanos específicos para cada antígeno. Los marcadores que fueron evaluados incluyeron marcadores de células T: CD3(Dako® M7193, dilución de trabajo 1:400) y CD8 (Dako® M7103, dilución de trabajo 1:400), para caracterizar el infiltrado de células T y CD20((Dako® M0755, dilución de trabajo 1:200) para caracterizar las células B. Para identificar células Natural Killer se utilizó CD56((Dako® M7074, dilución de trabajo 1:400) y para identificar macrófagos CD68((Dako® M0814, dilución de trabajo 1:200). La mieloperoxidasa humana se marcó con el anticuerpo M0748 de Dako®, dilución de trabajo 1:2000. La

inmunohistoquímica se realizó aplicando la técnica de inmunoperoxidasa indirecta a temperatura ambiente (24 °C) en tres etapas. La peroxidasa endógena se bloqueó por incubación con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 min. Luego se incubaron las secciones histológicas durante 1 hora, con el anticuerpo monoclonal para antígenos leucocitarios humanos (CD3, CD8, CD20, CD56 y Mieloperoxidasa). Posteriormente las muestras de mucosa gástrica se re-incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-ratón (Dako, Carpintería, CA) durante 30 minutos a una dilución de 1:200, seguidos de la adición del complejo adivina-biotina-peroxidasa (Dako, Carpintería, CA) durante 30 minutos. Para detectar el producto final coloreado se utilizó hidroxidocloruro de diaminobencidina (DAB)H2021(Sigma, Saint Louis, MO). Las secciones se constataron con hematoxilina de Harris de acuerdo la metodología convencional.

Cuantificación de la respuesta de linfocitos en mucosa gástrica

De cada sujeto a estudiar se obtuvieron cuatro biopsias de mucosa gástrica (2 de antro y 2 de cuerpo) y de cada fragmento se colocarán tres secciones histológicas en cada lamina de evaluación. De esta manera, la evaluación para la cuantificación de linfocitos a cada uno de los pacientes se realizó en 12 secciones histológicas. En cada una de las secciones se tuvo en cuenta la cantidad y tipo de linfocitos (T, B, Natural Killer o Macrófago) encontrados en lámina propia, folículos linfoides y región intraepitelial, siguiendo el siguiente procedimiento: (para linfocitos intraepiteliales se cuantificaron el número y tipo de linfocitos vistos en una región que contenía 100 células epiteliales contiguas, para lamina propia se contaron la cantidad de linfocitos T y B encontrados en 11 áreas, cada una de 0.0025mm², para folículos linfoides se contaron la cantidad de linfocitos T y B encontrados en 8 áreas). La evaluación se realizó con un microscopio Olympus CH2, a un aumento de 400X. Para delimitar y cuantificar las áreas se utilizó una cuadrícula calibrada Eyepiece 5 x 5 mm (12-578Fisher®) y Stage Micrometer Glass Slide Calibration.

Análisis de datos

Este trabajo fue planificado para realizar una descripción de las características histopatológicas y tipo de antígeno leucocitario expresado en el tejido linfóide asociado a la mucosa gástrica. Los datos descriptivos de las variables estudiadas en los grupos se presentan como promedios, rangos y proporciones. Los promedios se reportaron para las distribuciones normales y las medianas para las variables no paramétricas. Las comparaciones entre grupos se hicieron utilizando la prueba de chi-cuadrado con programas estadísticos

derivados de procedimientos descritos por Snedecor y Cochran²⁰. La hipótesis nula fue rechazada a $p < 0,05$ y fue considerada límite a $p = 0,05-0,10$.

Resultados

Caracterización de las alteraciones histopatológicas según la ciudad de procedencia

La prevalencia de la colonización de mucosa gástrica por *H. pylori* estuvo ausente en 11,4% de las muestras correspondientes a Pasto comparada con un 16,9% de ausencia en las muestras de Tumaco.

La gastritis atrófica multifocal, considerada como lesión precursora del carcinoma gástrico, fue significativamente más frecuente en Pasto en comparación con Tumaco ($p = 0,55$) (tabla 1). No se encontraron diferencias en la prevalencia de la infección por *H. pylori*

como tampoco en los otros parámetros evaluados según el lugar de procedencia. En la figura 1, se evidencia la respuesta inflamatoria de tipo mixto con linfocitos, plasmocitos y polimorfonucleares (PMNN) ante la tinción de Hematoxilina-Eosina

Caracterización de la expresión de los antígenos leucocitarios según presencia de *H. pylori*

La expresión de mieloperoxidasa y del antígeno CD8 en los linfocitos fue significativamente más alta en la lámina propia de los pacientes en quienes no se identificó *H. pylori* durante la evaluación histopatológica ($p = 0,07$ y $p = 0,01$, respectivamente). La positividad para el resto de los marcadores fue similar para los leucocitos localizados en folículos linfoides, epitelio de cuellos glandulares y foveolar superficial tabla 2. En la figura 2, se observa la presencia de linfocitos CD20+ y células Natural Killer CD56+ en el epitelio glandular.

Tabla 1. Frecuencias relativas (N%) de las características histopatológicas de mucosa gástrica

Característica	Ciudad	Ausente	Leve	Moderado	Severo	Valor p
Polimorfonucleares neutrófilos en lámina propia	Pasto	2,9	8,6	25,7	62,9	0,176
	Tumaco	19,4	8,3	22,2	50,0	
Linfocitos en lamina propia	Pasto		2,9	68,6	28,6	0,319
	Tumaco	5,6	8,3	66,7	19,4	
Linfocitos en epiteliofoveolar	Pasto	82,9	14,3	2,9		0,366
	Tumaco	69,4	16,7	11,1	2,8	
Depleción de moco	Pasto	5,7	22,9	11,4	60,0	0,055
	Tumaco	22,2	5,6	16,7	55,6	
Gastritis crónica atrófica multifocal	Pasto	45,7	37,1	8,6	8,6	0,009
	Tumaco	80,6	11,1		8,3	
Metaplasia intestinal	Pasto	68,6	14,3	5,7	11,4	0,150
	Tumaco	86,1	11,1	2,8		
<i>H. pylori</i> .	Pasto	11,4	22,9	31,4	34,3	0,154
	Tumaco	16,9	14,1	31,0	38,0	

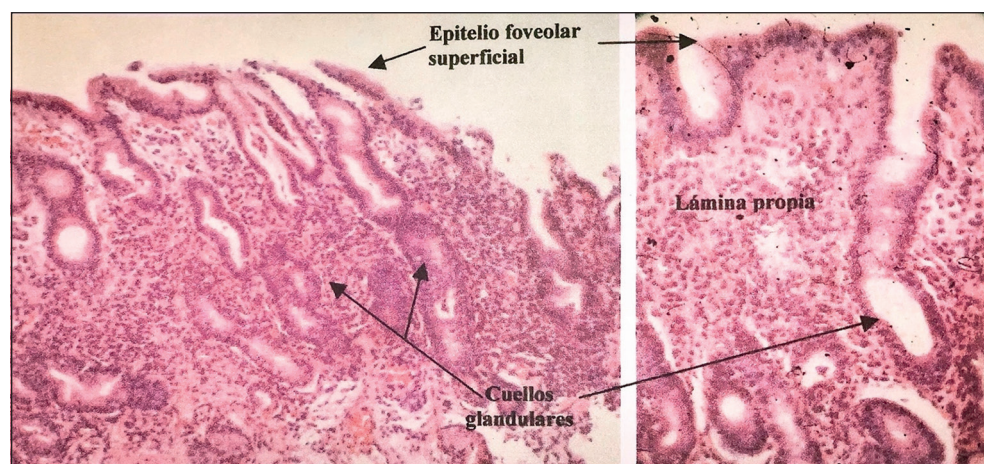


Figura 1. Tinción de Hematoxilina-Eosina de la mucosa gástrica antral, lámina propia y epitelios ganglionares donde se evidencia la respuesta inflamatoria de tipo mixto con linfocitos, plasmocitos y polimorfonucleares.

Tabla 2. Distribución de la inmunotipificación de los leucocitos en la mucosa gástrica según presencia de *H. pylori* y localización geográfica.

Lugar anatómico	H. pylori	Presencia de H. pylori						Localización geográfica						
		Linfocitos B	Linfocitos T	Natural killer	Macrófagos	Linfocitos CD8	Mieloperoxidasa	Ciudad	Linfocitos B	Linfocitos T	Natural killer	Macrófagos	Linfocitos CD8	Mieloperoxidasa
Epitelio foveolar	Positivo	0,0	14,6	1,84	0,75	15,6	2,6	Pasto	0,0	13,4	2,5	0,7	14,7	3,1
	Negativo	0,0	22,3	0,75	1,0	26,1	3,0	Tumaco	0,0	18,3	0,9	0,9	19,9	2,4
	Valor p.	1,0	0,12	0,33	0,67	0,23	0,69	Valor p.	1,0	0,03	0,27	0,29	0,06	0,89
Cuellos glandulares	Positivo	0,10	20,72	6,22	0,68	18,3	4,53	Pasto	0,02	20,9	5,1	0,7	16,6	3,6
	Negativo	0,0	19,50	5,08	0,50	16,2	3,91	Tumaco	0,13	20,2	6,9	0,6	19,2	5,2
	Valor p.	0,42	0,67	0,40	0,91	0,19	0,59	Valor p.	0,55	0,28	0,29*	0,96	0,46	0,35
Lámina propia	Positivo	75,08	824,0	112,00	361,41	410,6	236,0	Pasto	106,0	933,5	273,7	299,2	514,5	325,0
	Negativo	117,44	938,19	228,32	343,96	525,5	381,5	Tumaco	114,5	904,7	145,4	393,3	497,8	386,4
	Valor p.	0,18	0,24	0,012	0,71	0,01	0,07	Valor p.	0,72*	0,69*	0,06	0,007*	0,64*	0,31*
Folículos linfoides	Positivo	2700,9	2709,3	871,2	811,0	1261,4	846,1	Pasto	2909,3	2742,5	911,1	1103,1	1178,7	641,8
	Negativo	3326,5	2814,9	918,5	990,5	1226,4	652,6	Tumaco	3523,6	2850,1	909,9	821,1	1284,5	727,0
	Valor p.	0,73	0,42	0,83	0,84	0,58	0,58	Valor p.	0,60	0,72	0,64	0,87	0,28	0,43

Figura 2. Tinción inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales dirigidos para identificar linfocitos B CD20+ y anticuerpos monoclonales para identificación de células Natural Killer CD56+.

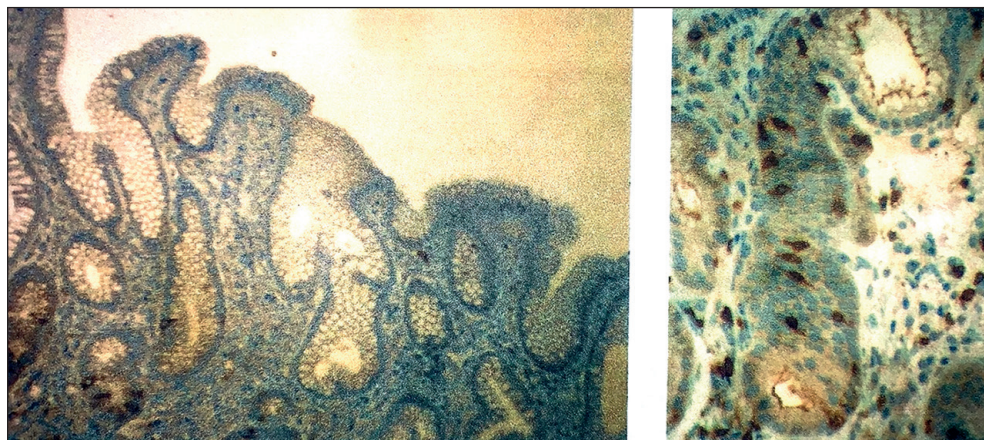
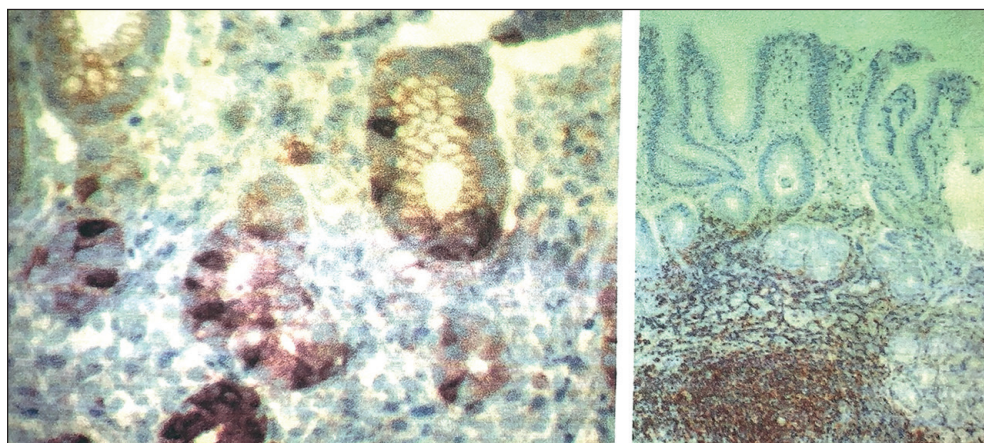


Figura 3. Tinción inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales para identificar Leucocitos CD3+ y CD8+.



Caracterización de la expresión de los antígenos leucocitarios según ciudad de procedencia (Pasto y Tumaco)

La expresión de los antígenos CD3 y CD8 en los leucocitos localizados en el epitelio foveolar fue más alta en Tumaco en comparación con Pasto ($p = 0,03$ y $p = 0,06$, respectivamente). Al evaluar la lámina propia, se encontró que en Pasto fueron más altos los linfocitos NK ($p = 0,06$) y linfocitos CD3. En Tumaco fue más frecuente la expresión de los siguientes antígenos: mieloperoxidasa y linfocitos B, pero solo en los macrófagos la diferencia fue significativa ($p = 0,007$) (tabla 2).

Finalmente, en la figura 3, se puede observar presencia de linfocitos CD8+ en el epitelio glandular de la mucosa gástrica antral y linfocitos CD3+ presentes en los folículos linfoides.

Discusión

El tipo de gastritis crónica inducida por la infección por *H. pylori* varía considerablemente, en nuestro es-

tudio se documentan dos regiones geográficas con alta prevalencia de infección por *H. pylori* que muestran contraste en el tipo de gastritis. En Tumaco fue más frecuente la gastritis no atrófica similar a la descrita en pacientes con ulcera duodenal causada por *H. pylori* que tiene una gastritis de predominio en el antro gástrico sin pérdida de glándulas (atrofia), denominada gastritis no atrófica o gastritis antral difusa, y se ha demostrado en otras investigaciones que dichos pacientes no presentarían tasas elevadas de cáncer gástrico¹⁰. En Pasto la gastritis predominante fue acompañada por atrofia multifocal y metaplasia intestinal, en estas condiciones puede ser frecuente la ulcera gástrica con riesgo elevado de cáncer gástrico²¹.

En Colombia existe gran variabilidad en la prevalencia de cáncer gástrico y las lesiones precursoras en las diferentes regiones con un exceso de frecuencia de cáncer gástrico y gastritis atrófica multifocal en las poblaciones de la región Andina, en comparación con la Costa Atlántica. Las ciudades localizadas en las regiones montañosas de Colombia tienen una prevalencia de gastritis atrófica multifocal significativamente ma-

por con respecto a la costa atlántica (25,9% vs 9,5%). De igual forma, en la región andina la prevalencia de cáncer gástrico es mayor que en la costa atlántica (11,1% vs 4,7%)⁹.

Al comparar los resultados de las dos regiones, llama la atención la similitud de los resultados. Las regiones costeras de nuestro país, Costa Atlántica y Pacífica tienen diferentes tipos de gastritis en comparación con la zona Andina. En una región geográfica delimitada como Nariño, el riesgo de cáncer gástrico y sus lesiones precursoras es generalizado y parece circunscribirse a la zona andina montañosa. En Tumaco al igual que en la Costa Atlántica es menor el riesgo de cáncer gástrico y de lesiones precursoras con un tipo de gastritis predominantemente no atrófica similar a la descrita en Norteamérica y países europeos. Aunque en estados unidos la etnia afrodescendiente de Luisiana tiene mayor riesgo de cáncer gástrico que el resto de norte América²², claramente vemos que la etnia tampoco hace la diferencia, porque la población blanca de europeos y norte americanos comparten el bajo riesgo de la población de etnia afrodescendiente de Colombia.

La presencia de *H. pylori* tampoco explica estas diferencias en la prevalencia de lesiones precursoras entre las regiones montañosas y costeras de Nariño. Para tratar de aclarar este enigma, se evaluaron en un diseño prospectivo, la distribución de los genotipos de *H. pylori* asociados a virulencia en estas dos poblaciones que muestran contraste en el riesgo de cáncer gástrico, pero prevalencia similar de infección por *H. pylori*¹¹. Se encontró que en pacientes provenientes de Pasto con alto riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico los genotipos de *H. pylori* asociados a cepas virulentas *cagA* positivos y *vacA* s1 y m1 positivos fueron significativamente más frecuentes que en Tumaco.

Los anteriores hallazgos sugieren que los genotipos de *H. pylori* asociados a fenotipos virulentos podrían explicar parcialmente las diferencias; otros factores como el polimorfismo genético humano y la dieta son sospechosos y podrían desempeñar un papel fundamental en el complejo proceso de carcinogénesis gástrica y deben ser objeto de futuras investigaciones.

A diferencia de intestino delgado y colon, en la mucosa gástrica normal no se describe tejido linfoide asociado a la mucosa²³; cuando está presente, usualmente está relacionado con los diferentes tipos de gastritis. Los leucocitos podrían jugar un papel fundamental en el proceso inflamatorio, hay pocos estudios orientados a caracterizar las subpoblaciones de leucocitos asociados, la respuesta inflamatoria en mucosa gástrica y en general muestran resultados controversiales. Las divergencias probablemente se expliquen por la dificultad en estandarizar los métodos de medición²³.

En la mucosa inflamada de intestino delgado y colon, la mayoría de las células intraepiteliales expresan

un fenotipo de linfocitos T probablemente citotóxico, mientras que en la lámina propia predomina el fenotipo de linfocitos T ayudador - inductor. Coincidiendo con estos hallazgos, los resultados de este estudio muestran en estómago una distribución de linfocitos similar a la descrita en el intestino, en los casos de gastritis asociada a infección por *H. pylori*²⁴. Tanto en las biopsias de cuerpo como de antro gástrico, las células intraepiteliales expresaron casi exclusivamente el fenotipo T probablemente citotóxico. En contraste, en los espacios extra epiteliales hubo mayor presencia de linfocitos B y del fenotipo T ayudador -inductor. Estos resultados difieren de otros estudios que describen un predominio de linfocitos CD4⁺ y concuerdan con cuantificaciones en las que se demuestra que la subpoblación de linfocitos CD8⁺ es el grupo predominante y que el número de células NK se encuentra aumentado en pacientes con gastritis asociada a la presencia de *H. pylori* coincidiendo, además, con un incremento en los niveles de interleuquinas IL-4 y IL-6²⁴.

En modelos murinos infectados con *H. felis*²⁵, se observa que la gastritis asociada está caracterizada por la presencia de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ y durante los experimentos de inmunización de los animales con ureasa se observó que el incremento de células CD8⁺ puede estar relacionado con la presencia de bacterias residuales en la superficie apical o entre las células epiteliales, esta observación es importante porque en el presente trabajo encontramos que en algunos casos en ausencia de *H. pylori* la respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica estaba asociada con linfocitos CD8⁺ y CD56⁺. Este hallazgo también podría indicar que se presentaron bacterias residuales no detectadas con la tinción histoquímica utilizada para evaluar *H. pylori* o que la respuesta inmune fue eficiente y logro controlar exitosamente la colonización de la bacteria y que puede tomar tiempo la resolución de la inflamación.

La caracterización de las alteraciones iniciales ocasionadas por la infección por *H. pylori* es imposible evaluar en humanos por la falta de especificidad de los síntomas asociados a los síntomas agudos y porque probablemente la mayoría de las adquisiciones de la infección pueden ser asintomáticas haciendo poco probable la indicación de una endoscopia que eventualmente nos ayudaría a evaluar la mucosa gástrica en los individuos que adquieren recientemente la infección. En el presente trabajo, en la mayoría de los especímenes de mucosa gástrica se encontró una respuesta inflamatoria con predominio de células mononucleares. En algunos era evidente el predominio de neutrófilos polimorfonucleares, pero en compañía de linfocitos, plasmocitos y macrófagos. Es evidente que el cuadro clínico de cronicidad ya estaba instalado y la presencia de PMNN, era una manifestación de un proceso de actividad aguda asociado probablemente a un con-

tacto continuo con las noxas que están produciendo la agresión. En modelos animales de gastritis inducida por *H. pylori* y *H. felis*, se describe que los neutrófilos predominan en los estadios iniciales de la infección y posteriormente los leucocitos mononucleares son las células predominantes. En humanos es muy difícil estudiar la gastritis temprana; en general se evalúan ya los procesos instalados y coinciden con los observado en los modelos murinos²⁶.

En el presente trabajo encontramos en forma significativa mayor actividad de células NK (CD56⁺) en el epitelio foveolar de pacientes con gastritis crónica atrófica y en lamina propia de mucosa gástrica de pacientes provenientes de Pasto. Estos resultados son importantes por la posibilidad de que las células NK contribuyan mediante un mecanismo de autoinmunidad en la etiopatogénesis de la gastritis atrófica multifocal. Las células NK son funcionalmente importantes en la defensa inicial contra muchos agentes infecciosos²⁷, su activación y la secreción asociada de IFN- γ (interferón gamma) juegan un papel importante en la activación de macrófagos por un mecanismo antígeno-independiente por que promueven la expansión de las células de respuesta T por un mecanismo dependiente de antígenos para formar en conjunto un perfil de respuesta de tipo Th1²⁷. Se considera que el contacto directo de los linfocitos y el *H. pylori* inducen la producción de IFN- γ y estimulan eficientemente la actividad de las células NK²⁸, probablemente por acción del lípido A de *H. pylori* que además induce producción de factor de necrosis tumoral alfa. Es paradójico que este tipo de lípido tenga potente actividad inmunológica y baja actividad de endotoxina²⁹. Las células CD56⁺ parecen muy importantes en la respuesta inmune de mucosa gástrica por que fueron detectadas en todos los compartimientos: epitelio foveolar y de cuellos glandulares, lámina propia y folículos linfoides, sin embargo, las inteleuquinas asociadas a su presencia podrían contribuir al daño celular y ser cofactores de la destrucción y atrofia glandular.

En conclusión, en nuestro estudio encontramos que el tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica se organiza predominantemente en forma difusa en lamina propia con frecuente formación de folículos linfoides. Nuestra comparación de la respuesta inflamatoria/ inmune en dos poblaciones con contra-

te en el riesgo de cáncer gástrico describe un patrón caracterizado por incremento de la carga bacteriana y aumento del daño al moco del epitelio, representando probablemente el daño directo de la bacteria al epitelio. La respuesta celular incluyó una respuesta aguda no específica caracterizada principalmente por PMNN, como también una respuesta inmune específica, especialmente de linfocitos T, tanto intraepiteliales como estroma. En Pasto fue más frecuente la gastritis atrófica multifocal y en Tumaco la gastritis no atrófica. Las respuestas inmunológicas a la infección por *H. pylori* muy probablemente están relacionadas con este resultado dicotómico.

Responsabilidades Éticas

Protección de personas y animales: Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos: Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado: Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo de: El Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular y el Laboratorio de Histopatología del Departamento de Patología de la Universidad del Valle, por facilitar sus instalaciones para el desarrollo de este estudio.

Referencias

- de Brito BB, da Silva FA, Soares AS, et al. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. *World J Gastroenterol*. 2019; 25(37):5578-5589. doi: 10.3748/wjg.v25.i37.5578.
- Correa P. The gastric microenvironment determines *Helicobacter pylori* colonization [editorial; comment]. *Am J gastroenterol*. 1995;90(9):1379-81.
- Matta AJ, Pazos AJ, Bustamante-Rengifo JA, Bravo LE. Genomic variability of *Helicobacter pylori* isolates of gastric regions from two Colombian populations. *World J Gastroenterol*. 2017;23(5):800-9. doi: 10.3748/wjg.v23.i5.800.
- Van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1999;116(4):823-30.
- Kim A, Servetas SL, Kang J, et al. *Helicobacter pylori* bab Paralog Distribution and Association with

- cagA, vacA, and homA/B Genotypes in American and South Korean Clinical Isolates. PLoS One 2015;10(8):e0137078. doi: 10.1371/journal.pone.0137078.
6. Cuello C, Correa P, Haenszel W, et al. Gastric cancer in Colombia. I. Cancer risk and suspect environmental agents. J Natl Cancer Inst 1976;57(5):1015-20.
 7. Rosero YL, Arévalo-Jaimes BV, Delgado MP, et al. Evaluation of *Helicobacter pylori* Infection and Clarithromycin Resistance in Strains From Symptomatic Colombian Children. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2018;67(5):601-4. doi: 10.1097/MPG.0000000000002016.
 8. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2018;68:394-424.
 9. Bravo LE, Muñoz N. Epidemiology of cancer in Colombia. Colomb Med. 2018;49(1):9-12. doi: 10.25100/cm.v49i1.3877.
 10. Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, et al. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. Gut. 2015;64(9):1353-67. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309252. Epub 2015 Jul 17.
 11. Caguazango JC, Pazos ÁJ. Microbiota according to gastric topography in patients with low or high risk of gastric cancer in Nariño, Colombia. Biomedica 2019; 39(Supl. 2):157-71. doi: 10.7705/biomedica.v39i4.4520.
 12. Guan E, Tian F, Liu Z. A novel risk score model for stomach adenocarcinoma based on the expression levels of 10 genes. Oncol Lett. 2020;19(2):1351-67. doi: 10.3892/ol.2019.11190.
 13. Javed S, Skoog EC, Solnick JV. Impact of *Helicobacter pylori* Virulence Factors on the Host Immune Response and Gastric Pathology. Curr Top Microbiol Immunol. 2019;421:21-52. doi: 10.1007/978-3-030-15138-6_2.
 14. Salih BA. *Helicobacter pylori* infection in developing countries: the burden for how long? Saudi J Gastroenterol. 2009;15(3):201-7. doi: 10.4103/1319-3767.54743.
 15. Dunn BE, Campbell GP, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem. 1990;265(16):9464-9.
 16. Pruszkowski J, Ziolkowski G, Gonciarz Z, Besser P. Isolation of *Helicobacter pylori* from gastric mucosa depending on the growth medium used. Med Dosw Microbiol 1994;46:305-11 [PMID: 7603132].
 17. Madan EK, Kemp J, Westblom TU, Subik M, Sexton S, Cook J. Evaluation of staining methods for identifying *Campylobacter pylori*. American J Clin Pathol. 1988;90(4):450-3.
 18. Garvey WF, Bigelow F. Modified steiner for the demonstration of spirochetes. J Histotechnol. 1985;8(1):15-7.
 19. Dixon MF, Yardle GJ, Correa P. Classification and grading of gastritis. The update sydney system. Am J Surg Pathol. 1996;29(10):1161-81.
 20. Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods. 6th. Ed. Ames IA. Iowa State University Press 1967.
 21. Archampong TN, Asmah RH, Richards CJ, et al. Gastro-duodenal disease in Africa: Literature review and clinical data from Accra, Ghana. World J Gastroenterol. 2019;25(26):3344-58. doi: 10.3748/wjg.v25.i26.3344.
 22. Ulanja MB, Beutler BD, Rishi M, et al. Influence of race and geographic setting on the management of gastric adenocarcinoma. J Surg Oncol. 2019; 120(2):270-9. doi: 10.1002/jso.25503.
 23. Tursi A, Gasbarrini G. Acquired gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT): a review with special emphasis on association with extra-gastric diseases and management problems of gastric MALT. J Clin Gastroenterol. 1999;29(2):133-7.
 24. Wu YY, Hsieh CT, Tsay GJ, et al. Recruitment of CCR6+ Foxp3+ regulatory gastric infiltrating lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis. Helicobacter. 2019;24(1):e12550. doi: 10.1111/hel.12550.
 25. Wu X, Li X, Dang Z, Jia Y. Berberine demonstrates anti-inflammatory properties in *Helicobacter pylori*-infected mice with chronic gastritis by attenuating the Th17 response triggered by the B cell-activating factor. J Cell Biochem. 2018;119(7):5373-81. doi: 10.1002/jcb.26681.
 26. Fox JG, Blanco M, Murphy JC, et al. Local and systemic immune responses in murine *Helicobacter felis* active chronic gastritis. Infect Immun. 1993;61(6):2309-15.
 27. Wan R, Wang ZW, Li H, et al. Human Leukocyte Antigen-G Inhibits the Anti-Tumor Effect of Natural Killer Cells via Immunoglobulin-Like Transcript 2 in Gastric Cancer. Cell Physiol Biochem. 2017;44(5):1828-41. doi: 10.1159/000485819.
 28. Yuçeyar H, Saruc M, Kokuludag A, Terzioğlu E, Goksel G, İsisag A. The systemic cellular immune response in the *Helicobacter pylori*-associated duodenal ulcer and chronic antral gastritis. Hepatogastroenterology 2002;49(46):1177-9.
 29. Ogawa T, Suda Y, Kashiwara W, Hayashi T, Shimoyama T, Kusumoto S. Immunobiological activities of chemically defined lipid A from *Helicobacter pylori* LPS in comparison with *Porphyromonas gingivalis* lipid A and *Escherichia coli*-type synthetic lipid A (compound 506). Vaccine. 1997;15(15):1598-605.