

Biomarcadores evolutivos de cáncer gástrico en Nariño

Evolutionary biomarkers of gastric cancer in Nariño

Alvaro Pazos M, PhD^{1,2*}, Renato Pantoja G, PhD (c)³, Kevin Guzman, BSc^{1,2}

¹ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia

² Grupo de Investigación Salud Pública, Centro de Estudios en Salud (CESUN), Universidad de Nariño, Pasto, Colombia

³ Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria, Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia

Recibido: Agosto 01 de 2023

Aceptado: Noviembre 20 de 2023

*Correspondencia del autor: Alvaro Pazos M

E-mail: alpazmo@yahoo.com

<https://doi.org/10.47499/revistaaccb.v1i35.285>

Resumen

Objetivo: Dilucidar el papel de la coevolución del genoma humano y de *Helicobacter pylori* en la patogénesis gástrica en población de Nariño-Colombia. **Materiales y Métodos:** Se aisló *Helicobacter pylori* de biopsias gástricas obtenidas de 292 pacientes con enfermedad gástrica de Nariño. El diagnóstico histológico se realizó por la clasificación de Sydney. Se incluyeron 252 cepas de *H. pylori* para el análisis MLST, que las asignó a poblaciones ancestrales (hpAfrica1, hpAfrica2, hpEurope, hpEAsia). Para los análisis evolutivos humanos se utilizó ImmunoChip y el software STRUCTURE para determinar proporciones de ascendencia por comparación con 712 secuencias globales de base MLST de *H. pylori* (<http://pubmlst.org/helicobacter>). **Resultados:** Las cepas de *H. pylori* en Nariño se derivan de cuatro poblaciones ancestrales: África (AA1), Europea (AE1 y AE2) y Asia Oriental (AEA). Los aislamientos contenían fracciones sustanciales de ascendencia africana AA1 en la costa, y europea, AE2 en la región montañosa. Debido a que la población de montaña tenía un mínimo de ascendencia africana del huésped, nos preguntamos si AA1 aumentaba la gravedad de las lesiones gástricas en los sujetos con baja ascendencia africana. Tal escenario podría significar una coadaptación interrumpida: disrupción de la coevolución humano-*H. pylori*. Cuando consideramos a las 56 personas con menos del 17,6% de ascendencia africana, encontramos que todas las personas que portaban *H. pylori* con >19,8% de ascendencia africana AA1, $n = 20$ tenían lesiones severas. **Conclusión:** Las relaciones coevolutivas humano-*H. pylori* son biomarcadores importantes de enfermedad gástrica, y la interrupción de estas relaciones desenlazan lesiones gástricas más avanzadas en Nariño.

Palabras clave: Biopsias gástricas, Coevolución, Ancestros, Disrupción, Lesiones gástricas (*DeCS*).

Abstract

Objective: To elucidate the role of the coevolution of the human genome and *Helicobacter pylori* in gastric pathogenesis in a population from Nariño-Colombia. **Materials and Methods:** *Helicobacter pylori* was isolated from gastric biopsies obtained from 292 patients with Nariño gastric disease. The histological diagnosis was made by the Sydney classification. 252 *H. pylori* isolates were included for MLST analysis, which assigned them to ancestral populations (hpAfrica1, hpAfrica2, hpEurope, hpEAsia). Immunochip was used for human evolutionary analyses. STRUCTURE software to determine ancestry proportions by comparison with 712 global *H. pylori* MLST base sequences (<http://pubmlst.org/helicobacter>). **Results:** The *H. pylori* strains in Nariño derive from four ancestral populations: African (AA1), European (AE1 and AE2), and East Asian (AEA). The isolates contained substantial fractions of AA1 African ancestry on the coast, and AE2 European ancestry in the mountains. Because the mountain population had minimal African ancestry of the host, we wondered if AA1 increased the severity of gastric lesions in subjects of low African ancestry. Such a scenario could signify disrupted coadaptation: disruption of human-*H. pylori* coevolution. When we considered the 56 individuals with less than 17.6% African ancestry, we found that all individuals carrying *H. pylori* with >19.8% AA1 African ancestry, ($n = 20$) had severe lesions. **Conclusion:** Human and *H. pylori* coevolutionary relationships are important biomarkers of gastric disease, and disruption of these relationships results in more advanced gastric lesions in Nariño-Colombia.

Keywords: Gastric biopsies, Coevolution, Ancestry, Disruption, gastric lesions, Genetic mixtures

Introducción

Helicobacter pylori coloniza la mucosa gástrica de aproximadamente la mitad de la población mundial. Aunque todas las personas infectadas desarrollan inflamación gástrica, solo una pequeña fracción (<1%) desarrolla adenocarcinoma gástrico, que representa el 10% de la mortalidad mundial relacionada con el cáncer (1, 2). La prevalencia de la infección por *H. pylori* en una población generalmente no predice la incidencia de secuelas clínicas graves, lo que sugiere que la variación genética del huésped y del patógeno, así como los factores ambientales y dietéticos, desempeñan un papel importante (3-6). Sin embargo, estos factores analizados de forma aislada no han proporcionado explicaciones adecuadas para la variabilidad en los resultados de la infección.

Desde que acompañó a *Homo sapiens* fuera de África, *H. pylori* ha evolucionado junto con poblaciones humanas geográficamente definidas (7). Tanto la teoría evolutiva como las comparaciones empíricas predicen que los patógenos crónicos con transmisión vertical o familiar, como *H. pylori*, deberían volverse menos vi-

rulentos con el tiempo (8-10). De hecho, la mayoría de las infecciones por *H. pylori* son bien toleradas por los humanos, provocando solo una inflamación de bajo grado en la mayoría de los portadores adultos, y posiblemente confiriendo protección contra el asma y algunos trastornos esofágicos (11-13). Sin embargo, *H. pylori* también puede transmitirse horizontalmente, especialmente en condiciones asociadas a la pobreza comunes en el países en desarrollo (14). En tales situaciones, la infección con múltiples cepas puede ser más común que en los países desarrollados (15). Debido a que se sabe que *H. pylori* es altamente recombinante (16), la infección con múltiples cepas puede llevar a la transferencia horizontal de genes de segmentos que no han coevolucionado con sus hospedadores, interrumpiendo la selección de reducción de virulencia (17-19). Por lo tanto, en regiones donde los seres humanos están altamente mezclados, como en América del Sur, la relación humano-*H. pylori* puede ser menos probable que refleje un complejo adaptado y de virulencia reducida.

En muchas partes de América del Sur y Centro América, la incidencia de cáncer gástrico es mayor en áreas

montañas que en regiones costeras (20). Para explorar si este fenómeno puede explicarse por la variación genética del huésped y del microorganismo, aprovechamos un laboratorio natural que consiste en dos comunidades colombianas que tienen una prevalencia prácticamente idéntica de infección por *H. pylori* (~90%), pero tasas de incidencia extremadamente diferentes de cáncer gástrico. La tasa de incidencia de cáncer gástrico reportada en la ciudad de Tuquerres en los Andes de Colombia (~150 por 100,000) es aproximadamente 25 veces mayor que en la ciudad de Tumaco, a solo 200 km de distancia en la costa (~6 por 100,000) (21). Además, las personas de las montañas muestran una mayor incidencia de lesiones gástricas precancerosas (22).

Los análisis de mezcla de *H. pylori* se han utilizado para describir la historia evolutiva de las bacterias en relación con las migraciones humanas (23-25). En el presente estudio, ampliamos estos análisis para dilucidar el papel que la mezcla en *H. pylori* y los humanos ha desempeñado en la enfermedad gástrica (es decir, las puntuaciones histopatológicas), evaluando explícitamente si la variación en los ancestros tanto del huésped como del patógeno y su coevolución afectan las trayectorias y el riesgo de la enfermedad.

Materiales y métodos

Participantes del estudio

Se reclutaron hombres y mujeres de dos ubicaciones en el Departamento de Nariño, Colombia: de Tumaco, en la costa del Pacífico ($n = 151$, 72 hombres) y de Tuquerres, en la cordillera de los Andes ($n = 141$, 66 hombres). Las edades oscilaban entre 18 y 65 años (media de $40,7 \pm 11,8$). Los criterios de inclusión fueron presentar síntomas dispépticos que justificaran una endoscopia del tracto gastrointestinal superior. Se excluyeron de este estudio a los pacientes tratados con inhibidores de la bomba de protones, antagonistas de los receptores H2 o antimicrobianos en el mes previo a la endoscopia. También se excluyeron a los pacientes con enfermedades crónicas como diabetes, enfermedad cardíaca o gastrectomía previa. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes. Los comités de ética de los hospitales participantes, la Universidad del Valle en Cali, Colombia, y la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Vanderbilt aprobaron todos los protocolos del estudio.

Histopatología

Se tomaron muestras de biopsia de la mucosa gástrica de todos los participantes del antro gástrico (curvatura

mayor, a menos de 3 cm del píloro), la incisura angular (curvatura menor) y el cuerpo (pared anterior media) para la histopatología. Una biopsia adicional del antro de cada participante se congeló en glicerol/tioglicolato para el cultivo posterior de organismos de *H. pylori*. Todas las endoscopias fueron realizadas por un gastroenterólogo experimentado. Las biopsias congeladas se enviaron en hielo seco a la Universidad Vanderbilt en Nashville, TN y se almacenaron a -80°C .

Una biopsia de cada uno de los tres sitios gástricos se fijó en formalina tamponada y se embebió en parafina para la histopatología. Después de la tinción con H&E, las muestras de personas de 40 años o más (77 de Tumaco; 49 de Tuquerres) fueron evaluadas de forma independiente por dos patólogos ciegos a la información sobre la procedencia de las muestras. Las categorías diagnósticas se basaron en el sistema Sydney actualizado para la gastritis (26) y la Clasificación Internacional de Padova para la displasia (27). Los casos con diagnósticos discordantes fueron revisados hasta llegar a un consenso. Se asignaron valores ordinales de 1 a 6 de la siguiente manera: 1 = normal, 2 = gastritis no atrófica, 3 = gastritis atrófica multifocal sin metaplasia intestinal (MAG), 4 = metaplasia intestinal (MI), 5 = displasia y 6 = carcinoma. También se ha demostrado que las diferencias morfológicas dentro de estos diagnósticos categóricos están asociadas con el riesgo de cáncer gástrico (28-30). Por lo tanto, se implementó un sistema de puntuación más detallado para tener en cuenta estas diferencias. Dentro de la categoría de MAG, la presencia de atrofia indefinida (bordeada) elevó la puntuación a 3,25, la atrofia leve a 3,5, la atrofia moderada a 3,75 y la atrofia grave a 4,0 (31). Las puntuaciones de MI se aumentaron de dos maneras. Primero, se evaluó la extensión de la sección de biopsia que mostraba MI como $<30\%$, entre 30% y 60% o $>60\%$ y se le asignó un valor correspondiente de 0,2, 0,4 o 0,6, respectivamente. El segundo ajuste se basó en el tipo de MI y se determinó mediante tinción especial con ácido periódico de Schiff/azul de Alcian y diamina de hierro alto/azul de Alcian, según se describe anteriormente, cuando fue necesario (31). La MI completa, la MI incompleta predominante mixta, la MI completa predominante mixta y la MI incompleta se asignaron valores de 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4, respectivamente. Se sumaron los dos conjuntos de medidas para crear una puntuación final de MI que oscilaba entre 4,3 y 5,0. Las puntuaciones de displasia se refinaron asignando una puntuación de 5,25 para la categoría de displasia indefinida, 5,5 para displasia de bajo grado y 5,75 para displasia de alto grado. El siste-

ma de puntuación detallada de histopatología se utilizó para los análisis estadísticos, excepto cuando se indique lo contrario.

Cultivo, genotipado y tipificación por secuenciación multilocus de *Helicobacter pylori*

H. pylori se cultivó a partir de las biopsias antrales como se describe previamente (32). Los pellets bacterianos obtenidos a partir de colonias individuales de *H. pylori* (una por sujeto, excepto en 13 residentes de Tumaco, de los cuales se identificaron dos cepas distintas por persona) se digirieron con proteinasa K y se aisló el ADN mediante extracción de fenol/cloroformo y precipitación con etanol. Cada cepa se sometió a análisis de MLST) y se examinó la presencia de *cagA* como se describe anteriormente (33).

Caracterización de la ascendencia de *H. pylori*

Para 288 cepas, se amplificaron por PCR y se secuenciaron en ambas cadenas fragmentos de siete genes housekeeping (*atpA*, *efp*, *ureI*, *ppa*, *mutY*, *trpC* y *yphC*), que oscilan entre 398 y 627 pb por gen para un total de 3.406 pb, como se describió previamente (32). Sobre la base de las diferencias en la frecuencia alélica en estos genes centrales, estudios anteriores (23, 24) han utilizado el algoritmo bayesiano STRUCTURE (34, 35) para asignar aislados de *H. pylori* de múltiples sitios geográficos a una de las siete poblaciones distintas (hpAfrica1, hpAfrica2, hpEurope, hpEAsia, hpNEAfrica, hpAsia2 o hpSahul). Se recuperó un conjunto de 712 secuencias utilizadas en estos estudios anteriores de una base de datos de MLST (<http://pubmlst.org/helicobacter>), que abarcaba las siete poblaciones globales, incluidos los subconjuntos conocidos de hpAfrica1 (hspWAfrica y hspSAfrica) y hpEAsia (hspEAsia, hspMaori y hspAmerind). Después de alinear las secuencias colombianas ($n = 288$) con estas secuencias de la base de datos de MLST, se demostró en ejecuciones preliminares de STRUCTURE (versión 2.3) que los dos grupos altamente aislados, hpAfrica2 y hpSahul, no mostraron evidencia de superposición ancestral con las cepas colombianas. En consecuencia, se excluyeron las secuencias de hpAfrica2 y hpSahul del análisis, lo que dio como resultado un conjunto final de 1.477 sitios polimórficos derivados de las 638 secuencias restantes de la base de datos de MLST, 156 secuencias de Tumaco y 132 de Tuquerres. El modelo de mezcla de STRUCTURE asigna proporciones de ascendencia a cada muestra individual en los K grupos ancestrales inferidos. La opción de vinculación de este modelo tiene en cuenta la posición cromosómica de los polimorfismos, incorporando en las

estimaciones de ascendencia el desequilibrio de ligamiento que se espera después de la mezcla de poblaciones. Estudios anteriores han utilizado este modelo para caracterizar seis grupos ancestrales en aislados de *H. pylori* distribuidos globalmente: AA1, AEA, AE1, AE2 y también dos grupos, AA2 de muestras de hpAfrica2 y un grupo aislado de muestras de hpSahul, que son raros o inexistentes en muestras colombianas. Nuestros análisis con $K = 4$ maximizaron la probabilidad del modelo y generaron la mayor consistencia de agrupamiento al asignar fracciones a AA1, AEA, AE1 o AE2 en todas las muestras. Las representaciones gráficas de la estructura de la población se crearon utilizando DISTRUCT (36).

Caracterización de la ascendencia humana de los participantes

El ADN humano de 242 participantes del estudio (122 de Tumaco y 120 de Tuquerres) se extrajo de muestras de sangre utilizando kits Puregene (Qiagen). El ADN se genotipó utilizando Immunochip (37), una plataforma que contiene 196.524 SNPs de la mayoría de los genes conocidos por estar involucrados en trastornos inmunológicos. Para enriquecer los SNPs en equilibrio de ligamiento, se eliminaron los SNPs en desequilibrio de ligamiento utilizando PLINK (umbral $r^2 > 0,1$) (38). Los análisis preliminares con STRUCTURE (modelo de mezcla) revelaron que la probabilidad del modelo se maximizaba en $K = 3$, con la distribución de los tres grupos ancestrales inferidos coincidiendo con las proporciones esperadas de ascendencia europea, africana y amerindia en ambas ubicaciones (39, 40). Para validar estos resultados y refinar las estimaciones de ascendencia, se fusionaron los siguientes grupos de referencia con los datos existentes utilizando el conjunto de herramientas de PLINK: todos los individuos no relacionados de las poblaciones HapMap europea (CEU) y africana (YRI) (Fase 2, versión 23) tomados de archivos alojados en el sitio web de PLINK (41); la población española ibérica (IBS) del Proyecto 1000 Genomas (42); y el subconjunto H952 de las poblaciones Karitania, Surui y colombianas en el Proyecto de Diversidad Genómica Humana (43, 44). El conjunto final de datos contenía 5.947 SNP y 514 individuos. El modelo de mezcla de STRUCTURE (asumiendo frecuencias alélicas correlacionadas) se ejecutó 10 veces (50.000 iteraciones después de una fase de calentamiento de 50.000 iteraciones) con los ajustes predeterminados y fue supervisado por información de la población de referencia. Se utilizó CLUMPP para recopilar las ejecuciones repetidas y calcular las medias de la ascendencia individual (45). Se realizó un PCA complementario de la

ancestría humana utilizando el programa R SNPRelate (46). Antes del PCA, el conjunto combinado de datos de genotipo de las poblaciones fundadoras colombianas y YRI, CEU y asiáticas orientales (CHB + JPT) se redujo a 30.735 SNPs utilizando un umbral de LD de 0,5 en el entorno R utilizando SNPRelate.

Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva de ascendencia para 242 sujetos humanos y 288 cepas colombianas de *H. pylori* (de 275 sujetos). De estos, 233 coincidieron y se utilizaron para calcular correlaciones de Pearson por pares entre la ascendencia humana (africana, europea, amerindia) y la ascendencia de *H. pylori* (AA1, AEA, AE1, AE2). También se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para validar las correlaciones de Pearson, ya que las pruebas de Shapiro-Wilk revelaron falta de normalidad en algunas ascendencias. Los análisis de regresión que evalúan la dependencia de la histopatología de la ascendencia humana y de *H. pylori* se basan en datos de individuos de 40 años en adelante ($n = 121$). Debido a que cinco de los individuos (todos de la costa) contribuyeron con dos cepas cada uno al análisis, se implementaron modelos lineales mixtos. Se utilizó la regresión ordinal, un enfoque no paramétrico, en los puntajes discretos de histopatología para determinar si la probabilidad de aumentos categóricos en los puntajes variaba significativamente con las proporciones de ascendencia, asumiendo que las probabilidades proporcionales se probaron mediante la prueba de Brant. Se construyó un modelo lineal mixto multivariable paso a paso para evaluar si la ascendencia humana y de *H. pylori*, su interacción y el estado de *cagA* podían explicar la asociación conocida entre la histopatología y la zona de residencia. Los residuos se sometieron a prueba de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Se utilizó STATA 11 (StataCorp LP) para todos los análisis.

Aspectos éticos

El proyecto se ampara en la resolución N° 008430 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; considerando los aspectos éticos en la investigación con seres humanos, con la aplicación de un consentimiento informado a la población de estudio. En cuanto a los participantes del desarrollo de la investigación fueron

informados previamente de la finalidad, los riesgos y beneficios de la elaboración del proyecto para el cual se colectaron las muestras (biopsias gástricas y muestras de sangre), teniendo en cuenta que su participación fue voluntaria y que los resultados fueron y serán confidenciales y serán utilizados con el único fin de desarrollar investigaciones como la aquí planteada.

Resultados

Al examinar la genética del huésped en las comunidades de montaña y costeras y producto del análisis de mezcla de datos genotípicos humanos de alta densidad reveló un clúster ancestral africano predominante en la población costera (proporción media de $0,58 \pm 0,23$; $n = 122$), con una ascendencia amerindia significativa ($0,23 \pm 0,13$) y europea ($0,19 \pm 0,13$) (Figura 1A y C). En contraste, la población de montaña era principalmente amerindia ($0,67 \pm 0,12$; $n = 120$), con una ascendencia europea significativa ($0,31 \pm 0,11$) y una proporción insignificante de ascendencia africana ($0,03 \pm 0,02$, Figura 1A y D). Las estimaciones de la ascendencia amerindia y europea tenían una distribución aproximadamente normal en la cohorte de montaña (prueba de Shapiro-Wilk, $P > 0,37$), mientras que todas las distribuciones costeras estaban sesgadas ($P < 0,001$ para todas las pruebas). La falta de normalidad en las proporciones de mezcla de los individuos de la costa es consistente con migraciones recientes y/o apareamientos no aleatorios. También se utilizó un análisis de componentes principales (PCA) para evaluar la ascendencia humana, y mostró un patrón similar a los análisis de mezcla. Encontramos que las cepas de *H. pylori* en Colombia se derivan de cuatro poblaciones ancestrales: África (AA1), Europea (AE1 y AE2) y Asia Oriental (AEA) (Figura 1B, E y F). Aunque la mayoría de los aislamientos contenían fracciones sustanciales de ascendencia africana y europea, AA1 predominaba en la costa, y AE2 predominaba en la región montañosa (consultar la leyenda de la Figura 1 para las proporciones). De manera consistente con el reemplazo que realizaron las cepas de origen amerindio a partir de las cepas asiático orientales de *H. pylori*, observamos que el clúster ancestral principal en las montañas es AE2, el clúster más común en el sur de Europa y no el clúster derivado de cepas asiáticas AEA, que se esperaría en una población humana de origen amerindio. Esta observación indica una transferencia reciente de cepas de *H. pylori* de europeos a amerindios después de la colonización.

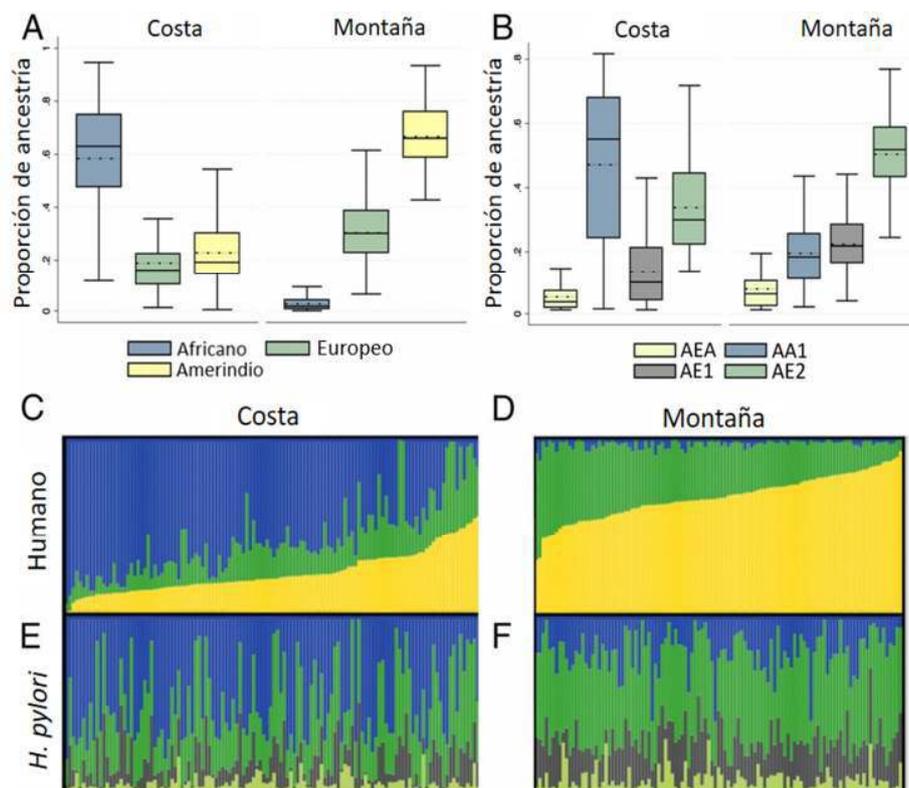


Figura 1. Ancestría humana y de *H. pylori*. (A) Distribuciones de ancestría humana de los participantes del estudio colombiano de la región costera de Tumaco ($n = 122$) y la región montañosa de Túquerres ($n = 120$). Las líneas negras indican las proporciones medianas de ancestría; las líneas punteadas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

En la Figura 2. Se observa la relación entre el ancestría de *H. pylori* y la ancestría Amerindia humana. La proporción de Ancestría Europea de *H. pylori* (AE2) correlaciona positivamente con la proporción de Ancestría Amerindia del huésped. La Ancestría Africana de *H. pylori* (AA1) correlaciona negativamente con la Ancestría Amerindia del huésped. Las elipses de densidad del 90% están delimitadas por el área sombreada en cada gráfico. El eje menor más ancho de la elipse inferior indica que AA1 está más disperso que AE2 en los amerindios ($n = 233$).

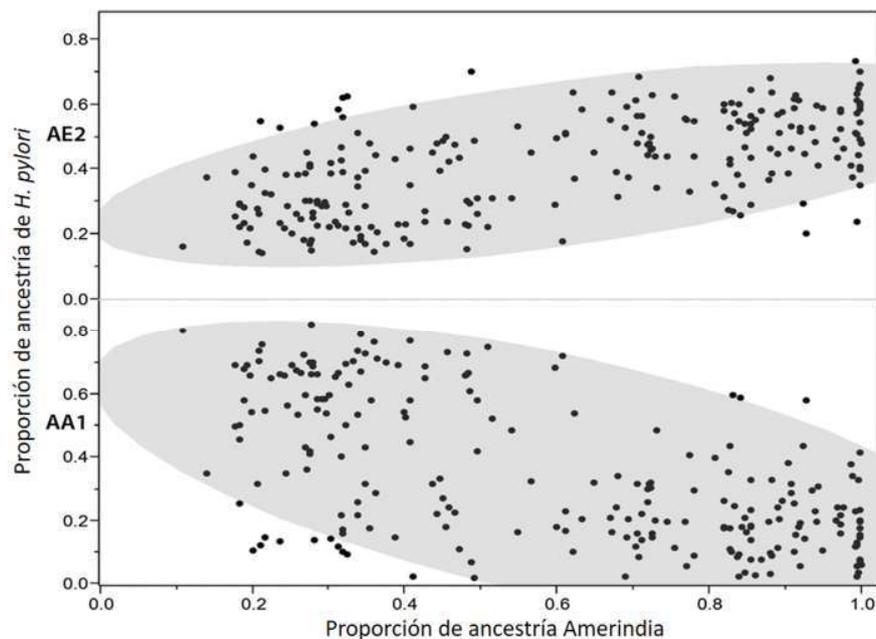


Figura 2. Relación entre el Ancestría de *H. pylori* y la Ancestría Amerindia humana

Ninguno de los cuatro clústeres ancestrales de *H. pylori* se asoció con la histopatología en los análisis univariados de la cohorte completa. Sin embargo, en un análisis de la cohorte de montaña, los clústeres AA1 y AE2 mostraron efectos altamente significativos pero opuestos. AA1 se asoció con resultados histopatológicos de severidad en las lesiones gástricas y AE2 se asoció con bajas puntuaciones histológicas de alteraciones gástricas ($\beta = 3,38$, $P = 0,002$ y $\beta = -3,42$, $P = 0,012$, respectivamente). La regresión ordinal de las puntuaciones discretas de histopatología confirmó estos resultados (valores de P correspondientes de 0,009 y 0,023 para AA1 y AE2, respectivamente). Debido a que la población de mon-

taña tenía un mínimo de ancestría africana del huésped, nos preguntamos si AA1 aumentaba la gravedad de las lesiones gástricas en todos los sujetos con baja ancestría africana del huésped, independientemente del área de residencia. Tal escenario podría significar una coadaptación interrumpida: disrupción de la coevolución humano-*H. pylori*. Cuando consideramos a las 56 personas con menos del 17,6% de ancestría africana (el décil más bajo de ancestría africana del huésped en la costa), encontramos que todas las personas que portaban *H. pylori* con >19,8% de ancestría AA1 ($n = 20$) tenían lesiones más severas que la gastritis sola, independientemente de la ubicación ($P < 0,001$; Figura 3).

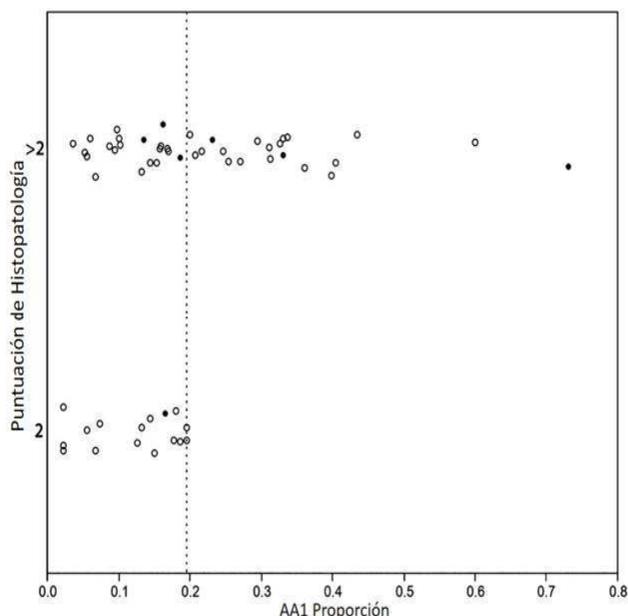


Figura 3. Todos los sujetos con proporciones bajas de ancestría africana del huésped (<17,6%, el décil más bajo en la costa) y que portaban una cepa de *H. pylori* con >19,8% de ancestría AA1 (línea punteada) presentaron lesiones gástricas avanzadas (puntuaciones histopatológicas >2), sin importar el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

Discusión

Tanto los genomas de *H. pylori* como los humanos presentaron altos niveles de mezcla de ancestría, pero las proporciones ancestrales difirieron significativamente según la región. La población de montaña tenía solo una pequeña cantidad de ancestría africana para el huésped (~3%), pero una gran proporción de ancestría AA1 de *H. pylori* (~20%). La mayor proporción de ancestría de *H. pylori* en las montañas era europea. Alguno de las ancestría AA1 en las montañas puede haberse originado a partir de cepas que alguna vez portaron esclavos de origen africano occidental. Sin embargo, dado los componentes europeos (AE1 y AE2) en las cepas de montaña, es probable que la mayoría del AA1 se derive de cepas adquiridas de los españoles después de su conquista de las Américas en el siglo XV. Falush *et al.* documentaron una media de ~17% de AA1 en 37 cepas españolas (23).

En América Latina, algunas cepas de poblaciones indígenas aisladas son exclusivamente amerindias, con afinidades a subtipos de *H. pylori* de Asia oriental (47, 48). Sin embargo, en comunidades mestizas donde las poblaciones amerindias se han mezclado con las poblaciones europeas introducidas, hay evidencia de que las cepas amerindias han sido reemplazadas por cepas eu-

ropeas con una ventaja competitiva, lo que representa una excepción al patrón de transmisión vertical/familiar (49, 50). Nuestros resultados son consistentes con un reemplazo general de *H. pylori* amerindias por cepas ancestrales europeas (como se muestra por la baja presencia de AEA y la alta presencia de AE2) y correlaciones significativas entre AE2 y el ancestría amerindia del huésped. En contraste, mostramos en la población costera una alta correlación entre el ancestría africana del huésped y AA1, lo que es consistente con la transmisión vertical/familiar.

Dado que nuestro enfoque actual utilizó muestras emparejadas y examinó la mezcla de ancestría, pudimos evaluar cómo la coevolución podría haber afectado la enfermedad gástrica. Anteriormente, caracterizamos la ancestría de las cepas de *H. pylori* en estas comunidades utilizando la reconstrucción filogenética sin el análisis de mezcla (32). Sin embargo, pasar por alto la mezcla en los aislamientos de *H. pylori* representa una simplificación excesiva, al igual que designar a los residentes humanos de estas comunidades mezcladas como únicamente africanos o únicamente amerindios. La tipificación convencional de cepas habría pasado por alto la ancestría AA1 en *H. pylori* de las montañas que, en nuestros análisis, fue una evidencia crítica para

detectar una interacción. Notablemente, el efecto de la interacción entre el ancestro amerindio del huésped y AA1 fue aproximadamente cinco veces mayor que el efecto de *cagA* ($\beta = 5,08$ frente a $0,98$). Incluimos el estado de *cagA* en nuestro análisis, ya que es un factor de virulencia conocido de *H. pylori* asociado con un mayor riesgo de gastritis grave y lesiones premalignas y malignas (51, 52, 53); previamente se ha demostrado que *cagA* difiere en prevalencia en los dos lugares, con una mayor prevalencia en las montañas (22). Pudimos replicar esta diferencia y también demostrar que *cagA* por sí solo no podía explicar la diferencia en el riesgo de lesiones premalignas entre las poblaciones, mientras que la interacción entre la ascendencia del huésped y la ascendencia de *H. pylori* sí explicaba estas diferencias, ya sea que *cagA* se incluyera o no en el modelo. Sin embargo, la presencia de un gen *cagA* no necesariamente proporciona información sobre la funcionalidad de *CagA*, que depende de muchos factores que no se evaluaron en el presente estudio (54, 55). En contraste con *cagA*, que fue un factor de riesgo para la histopatología premaligna independiente de todas las demás variables, la ubicación geográfica y la ascendencia humana no predijeron de forma independiente el resultado de la enfermedad en un modelo lineal mixto multivariado generalizado con la interacción incluida.

Conclusión

Concluimos que tanto la genética humana como la de *H. pylori* influyen en la susceptibilidad y patogenicidad, pero dependen en gran medida del contexto. El efecto de la ascendencia humana en la histopatología depende de la ascendencia de la cepa de *H. pylori* infectante, y viceversa. Nuestros datos cumplen con las condiciones esenciales para respaldar un modelo de coevolución (56) en el cual un resultado fenotípico debe ser el resultado de una interacción genotipo-por-genotipo entre especies, con los genotipos reflejando cambios adaptativos en lugar de procesos aleatorios o deriva genética.

Nuestros hallazgos indican que la información sobre la mezcla de *H. pylori*, especialmente en el contexto de

la ascendencia humana, puede tener implicaciones clínicas significativas, como se ha anticipado en estudios anteriores de Falush et al. (23). Por ejemplo, según nuestros datos actuales, un paciente en el percentil 95 de ascendencia amerindia (82,6%) tiene un perfil de riesgo muy diferente según el porcentaje de AA1 en la cepa de *H. pylori* infectante; un 73,1% de AA1 (percentil 95) predice una puntuación de histopatología de 4,8 [intervalo de confianza del 95% (IC), 3,5-6,1], mientras que un 5,6% de AA1 (percentil quinto) predice una puntuación de histopatología de 3,1 (IC 95% 2,6-3,6). En contraste, un paciente en el percentil quinto de ascendencia amerindia (10,5%) albergando *H. pylori* con un 73,1% de AA1 presentará una puntuación de histopatología de solo 2,4 (IC 95% 2,0-2,8), según nuestro modelo. Estos resultados pueden ser relevantes para el "enigma africano", es decir, la relativamente baja incidencia de cáncer gástrico en África a pesar de la alta prevalencia de infección por *H. pylori* (3, 22, 57). La variación genómica del huésped y del patógeno es más predictiva de la histopatología cuando se analizan juntas que cuando se analizan por separado, y se puede utilizar para informar los esfuerzos de prevención para erradicar *H. pylori* en aquellos con mayor riesgo. En resumen, las relaciones coevolutivas son determinantes importantes de la enfermedad gástrica, y la interrupción de estas relaciones y los resultados adversos para la salud pueden reflejar un legado continuo de la colonización europea.

Agradecimientos

Agradecimientos a la Universidad de Nariño VIIS y al Grupo de Investigación Salud Pública de esta institución por proporcionar las herramientas científicas esenciales para llevar a cabo esta investigación con éxito.

Conflicto de interés y financiaron

Los autores de esta investigación manifiestan no tener ningún conflicto de intereses.

Esta investigación fue financiada por Universidad de Nariño, la Universidad del Valle y MinCiencias-Colombia, BPIN 2020000100111.

Referencias

1. Peek RM, Jr., Blaser MJ (2002) *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2(1):28-37.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al (2020) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71(3):209-49.
3. Holcombe C (1992) *Helicobacter pylori*: The African enigma. *Gut* 33(4):429-31.
4. Chiba T, Seno H, Marusawa H, Wakatsuki Y, Okazaki K (2006) Host factors are important in determining clinical outcomes of *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol* 41(1):1-9.
5. Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H (2004) Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 9 (Suppl 1):1-6.
6. Ghoshal UC, Chaturvedi R, Correa P (2010) The enigma of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Indian J Gastroenterol* 29(3):95-100.
7. Moodley Y, Linz B, Bond RP, Nieuwoudt M, Soodyall H, Schlebusch CM, et al (2012) Age of the association between *Helicobacter pylori* and man. *PLoS Pathog* 8(5): e1002693.
8. Bull JJ, Molineux IJ, Rice WR (1991) Selection of benevolence in a host-parasite system. *Evolution* 45(4):875-82.
9. Agnew P, Koella JC (1997) Virulence, parasite mode of transmission, and host fluctuating asymmetry. *Proc Biol Sci* 264(1378):9-15.
10. Messenger SL, Molineux IJ, Bull JJ (1999) Virulence evolution in a virus obeys a tradeoff. *Proc Biol Sci* 266(1417):397-404.
11. Blaser MJ, Chen Y, Reibman J (2008) Does *Helicobacter pylori* protect against asthma and allergy? *Gut* 57(5):561-7.
12. Carroll IM, Khan AA, Ahmed N (2004) Revisiting the pestilence of *Helicobacter pylori*: Insights into geographical genomics and pathogen evolution. *Infect Genet Evol* 4(2):81-90.
13. Ferrández A, Benito R, Arenas J, María García A, Sopeña F, et al (2000) CagA-positive strains of *Helicobacter pylori* may protect against Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 95(9):2206-11.
14. Schwarz S, Morelli G, Kusecek B, Manica A, Balloux F, et al. (2008) Horizontal versus familial transmission of *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog* 4(10): e1000180.
15. Ghose C, Perez-Perez GI, van Doorn LJ, Domínguez-Bello MG, Blaser MJ (2005) High frequency of gastric colonization with multiple *Helicobacter pylori* strains in Venezuelan subjects. *J Clin Microbiol* 43(6):2635-41.
16. Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Achtman M, et al. (1998) Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(21):12619-24.
17. Galvani A (2003) Epidemiology meets evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol* 18(3): 132-9.
18. Herre EA (1993) Population structure and the evolution of virulence in nematode parasites of fig wasps. *Science* 259(5100):1442-5.
19. Stewart AD, Logsdon JM, Jr., Kelley SE (2005) An empirical study of the evolution of virulence under both horizontal and vertical transmission. *Evolution* 59(4):730-9.
20. Torres T, Correa P, Ferreccio C, Hernandez-Suarez G, Herrero R, Morgan RD, et al. (2013) Gastric cancer incidence and mortality is associated with altitude in the mountainous regions of Pacific Latin America. *Cancer Causes Control* 24(2): 249-56.
21. Correa P, Piazuelo B, Epplein M (1976) Gastric cancer in Colombia. III. Natural history of precursor lesions. *J Natl Cancer Inst* 57(5):1027-35.
22. Bravo LE, van Doorn LJ, Realpe JL, Correa P (2002) Virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori*: Do they explain the African enigma? *Am J Gastroenterol* 97(11): 2839-42.
23. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Yamaoka Y, et al. (2003) Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 299(5612):1582-5.
24. Moodley Y, Linz B, Yamaoka Y, Windsor HM, Breurec S, Achtman M, et al. (2009) The peopling of the Pacific from a bacterial perspective. *Science* 323(5913):527-30.

25. Wirth T, Xiaoyan W, Wang X, Linz B, Achtman M (2004) Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: Lessons from Ladakh. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(14): 4746-51.
26. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P (1996) Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 20(10):1161-81.
27. Rugge M, Correa P, Dixon M, Hattori T, Leandro G, Lewin K, et al. (2000) Gastric dysplasia: The Padova international classification. *Am J Surg Pathol* 24(2):167-76.
28. Ohata H, Kitauchi S, Yoshimura N, Mugitani K, Iwane M, Ichinose M, et al. (2004) Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. *Int J Cancer* 109(1):138-43.
29. Filipe M, Muñoz N, Matko I, Kato I, Pompe V, Prijon T, et al. (1994) Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: A cohort study in Slovenia. *Int J Cancer* 57(3):324-9.
30. González C, Pardo M, Ruiz J, Alonso P, Bonet C, Garcia R, et al. (2010) Gastric cancer occurrence in preneoplastic lesions: A longterm follow-up in a high-risk area in Spain. *Int J Cancer* 127(11):2654-60.
31. Mera R, Fontham E, Bravo L, Bravo J, Piazuelo M, Correa P, et al. (2005) Long term follow up of patients treated for *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 54(11):1536-40.
32. de Sablet T, Piazuelo M, Shaffer C, Schneider B, Asim M, Correa P, et al. (2011) Phylogeographic origin of *Helicobacter pylori* is a determinant of gastric cancer risk. *Gut* 60(9):1189-95.
33. Sicinschi L, Correa P, Bravo L, Peek R, Wilson K, Schneider B, et al. (2012) Non-invasive genotyping of *Helicobacter pylori* *cagA*, *vacA*, and *hopQ* from asymptomatic children. *Helicobacter* 17(2):96-106.
34. Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164(4):1567-87.
35. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2):945-59.
36. Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes* 4:137-8.
37. Cortes A, Brown MA (2011) Promise and pitfalls of the ImmunoChip. *Arthritis Res Ther* 13(1):101.
38. Purcell S, Neale B, Brown K, Thomas L, Ferreira M, Sham P, et al. (2007) PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81(3):559-75.
39. Wang S, Lewis Jr. C, Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Ruiz A, et al. (2007) Genetic variation and population structure in native Americans. *PLoS Genet* 3(11): e185.
40. Wang S, Ray N, Rojas W, Parra M, Bedoya G, Linares A, et al. (2008) Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet* 4(3): e1000037.
41. International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437(7063):1299-1320.
42. Altshuler D, Durbin R, Abecasis G, Bentley D, Chakravarti A, Wilson R and 1000 Genomes Project Consortium (2012) An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491(7422):56-65.
43. Rosenberg NA (2006) Standardized subsets of the HGDP-CEPH Human Genome Diversity Cell Line Panel, accounting for atypical and duplicated samples and pairs of close relatives. *Ann Hum Genet* 70(Pt 6):841-7.
44. Cavalli-Sforza LL (2005) The Human Genome Diversity Project: Past, present and future. *Nat Rev Genet* 6(4):333-40.
45. Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23(14):1801-6.
46. Zheng X, Levine D, Shen J, Gogarten S, Laurie C, Weir B, et al. (2012) A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. *Bioinformatics* 28(24):3326-8.
47. Camorlinga M, Perez G, Gonzalez G, Mendoza I, Peñaloza R, Ramos I, et al. (2011) *Helicobacter pylori* genotyping from American indigenous groups shows novel Amerindian *vacA* and *cagA* alleles and Asian, African and European admixture. *PLoS ONE* 6(11): e27212.

-
48. Kersulyte D, Kalia A, Gilman R, Mendez M, Herrera P, Cabrera L, et al. (2010) *Helicobacter pylori* from Peruvian amerindians: Traces of human migrations in strains from remote Amazon, and genome sequence of an Amerind strain. *PLoS ONE* 5(11): e15076.
 49. Kersulyte D, Mukhopadhyay A, Velapatiño B, Su W, Pan Z, Garcia C, et al. (2000) Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *J Bacteriol* 182(11):3210-18.
 50. Domínguez M, Pérez M, Bortolini M, Salzano F, Pericchi L, Linz B. (2008) Amerindian *Helicobacter pylori* strains go extinct, as european strains expand their host range. *PLoS ONE* 3(10): e3307.
 51. Tummuru MKR, Cover TL, Blaser MJ (1993) Cloning and expression of a high molecular mass major antigen of *Helicobacter pylori*: Evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 61(5):1799-1809.
 52. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, et al. (1993) Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(12):5791-5.
 53. Noto JM, Peek RM, Jr. (2012) The *Helicobacter pylori* cag pathogenicity Island. *Methods Mol Biol* 921:41-50.
 54. Olbermann P, Josenhans C, Moodley Y, Uhr M, Stamer C, Vauterin M, et al. (2010) A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *PLoS Genet* 6(8): e1001069.
 55. Hatakeyama M (2011) Anthropological and clinical implications for the structural diversity of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. *Cancer Sci* 102(1):36-43.
 56. Woolhouse ME, Webster JP, Domingo E, Charlesworth B, Levin BR (2002) Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat Genet* 32(4):569-77.
 57. Campbell D, Warren B, Thomas J, Figura N, Telford J, Sullivan P. (2001) The African enigma: Low prevalence of gastric atrophy, high prevalence of chronic inflammation in West African adults and children. *Helicobacter* 6(4):263-7.