



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Farmàcia
i Ciències de l'Alimentació

Treball Final de Grau

Grau de Farmàcia

Influència de la infecció per *Helicobacter pylori* en la microbiota gàstrica

Maryia Shahayeva Saitova

Àmbit principal: **Microbiologia**

Àmbits secundaris: Biologia Molecular i Fisiologia

Departament de Biologia, Sanitat i Medi ambient

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Universitat de Barcelona

Barcelona, juny 2025





Aquesta obra està subjecta a una llicència Creative Commons

*Dedicado a todos los integrantes de la sección de **Microbiología de la Facultad de Farmacia**, por haberme aceptado tan gratamente, y sobre todo motivado a encauzar mi, hasta entonces, desastrosa trayectoria académica.*

*Gratitud eterna a **Morsi** por ayudarme en todo, ser mi tercer jefe, honesto como él solo y siempre estar ahí quejándose de todo y todos. Un crack...de mecha corta.*

*Especial mención a mi **Amiga**, por aguantarme más de lo debido, aunque tampoco considero que haya sido taaaaaaaaaaaaaaaaaaaaan pesada <3. Me has curtido demasiado.*

Resum

El present treball combina una revisió exhaustiva amb un estudi experimental per conèixer com la infecció per *Helicobacter pylori* pot remodelar la microbiota gàstrica. L'objectiu principal és descriure aquesta modulació i posar èmfasi en les conseqüències d'aquesta. De manera complementària es caracteritza també la microbiota de pacients sans i es posen a punt metodologies moleculars aplicables al diagnòstic precoç.

En la part experimental s'analitzaren tretze biòpsies gàstriques d'antrè i/o cos procedents de pacients amb simptomatologies gàstriques diverses prèvies. Després de l'extracció del DNA, s'amplifica el gen 16S rRNA, es verifica per electroforesi i se seqüencia amb l'equip d'*Illumina MiSeq*. Posteriorment, les lectures se sotmeten a filtratge, eliminació de quimeres i agrupació en unitats taxonòmiques operatives al 97 % amb el software *Mothur*. Paral·lelament, una qPCR dirigida al gen *cpn60*, calibrada amb estàndards *gBlock*, quantifica les còpies bacterianes de les mostres seqüenciades.

Els resultats mostren una reducció significativa de la riquesa i la diversitat alfa en mostres infectades, així com una separació clara en l'anàlisi de beta diversitat; *Helicobacter pylori* esdevé dominant i desplaça gèneres com *Streptococcus* i *Lactobacillus*.

La combinació de la seqüenciació del 16S rDNA i l'assaig de qPCR per *cpn60* ofereix un retrat filogenètic i quantitatiu d'alta resolució, capaç de detectar disbiosi precoç i estratificar el risc clínic. La contribució més destacada del projecte és, precisament, la integració del marcador *cpn60* en el flux de detecció del patogen, oferint un mètode alternatiu, sensible i transferible a la pràctica diagnòstica.

Paraules clau: *Helicobacter pylori*, microbiota gàstrica, *cpn60*, qPCR, 16S rDNA

Abstract

This is an in-depth review and experimental study of how *Helicobacter pylori* infection can remodulate the gastric microbiota. The main objective is to describe this modulation and to emphasise the consequences of this modulation. In a complementary way, the microbiota of healthy patients is also characterised and some molecular methodologies for early diagnosis are developed.

In the experimental part, thirteen gastric biopsies of the antrum and/or body from patients with various previous gastric symptoms were analysed. After DNA extraction, the 16S rRNA gene is amplified, verified by electrophoresis and sequenced with the *Illumina MiSeq* equipment. Subsequently, the reads are subjected to filtering, chimera removal and clustering into 97% operational taxonomic units with the *Mothur* software. In parallel, an qPCR targeting the *cpn60* gene, calibrated with *gBlock* standards, quantifies the bacterial copies of some of the sequenced samples.

Results show a significant reduction in richness and alpha diversity in infected samples as disease stages progress, as well as a clear separation in beta diversity analysis; *Helicobacter pylori* becomes dominant and displaces genera such as *Streptococcus* and *Lactobacillus*.

The combination of 16S rRNA gene sequencing and qPCR assay targetting *cpn60* provides a high-resolution phylogenetic and quantitative portrait, and seems capable of detecting early dysbiosis. The most relevant contribution of the project is precisely the integration of the *cpn60* marker into the pathogen detection workflow, offering an alternative, sensitive and transferable method for diagnostic practice.

Key words: *Helicobacter pylori*, gastric microbiota, *cpn60*, qPCR, 16S rDNA

Integració d'àmbits

Aquest treball aborda la interacció entre *Helicobacter pylori* i l'estómac humà des d'una perspectiva multidisciplinària que integra microbiologia, biologia molecular i fisiologia.

Partint de la microbiologia, caracteritzem la comunitat bacteriana gàstrica mitjançant seqüenciació del gen 16S rRNA. Aquest enfocament ens va permetre identificar les espècies dominants en condicions de presència i absència d'*Helicobacter pylori*. Aquest sembla reduir la riquesa i altera la composició dels comensals habituals, modificant els índexs de diversitat alfa i beta.

A continuació, en l'àmbit de la biologia molecular, s'han dut a terme tot un seguit de tècniques moleculars com la PCR convencional i qPCR dirigides al gen *cpn60*, un marcador que permet quantificar amb precisió la càrrega bacteriana total d'*Helicobacter pylori* en les mostres assajades. Gràcies a aquestes dades quantitatives, establim correlacions entre l'abundància del patògen i diferents estats clínics, com la dispèpsia, gastritis o càncer gàstric.

Finalment, des de la perspectiva de la fisiologia, s'han estudiat l'estat patogènic i la resposta inflamatòria local per a connectar directament les variacions en la microbiota amb la funció gàstrica i la simptomatologia produïda per *Helicobacter pylori*. Aquesta integració metodològica de diversos àmbits obre camins per al desenvolupament de biomarcadors de diagnòstic primerenc i el disseny de tractaments personalitzats que restaurin l'equilibri de l'ecosistema gàstric.

Objectius de Desenvolupament Sostenible (ODS)

Aquest Treball de Fi de Grau s'emmarca en l'Objectiu de Desenvolupament Sostenible 3 (Salut i Benestar), ja que ofereix noves eines per prevenir, diagnosticar i tractar una infecció per *Helicobacter pylori*, que afecta prop del 50% de la població mundial. En caracteritzar de forma combinada la microbiota gàstrica (seqüenciació parcial del gen 16S rRNA) i la càrrega absoluta quantificada d'*Helicobacter pylori* (a través d'un assaig de qPCR del gen *cpn60*), el treball proporciona un mètode de diagnòstic alternatiu i sensible comparat amb els cultius convencionals, sovint lents i tècniques diagnòstiques que ofereixen falsos negatius en estadis primerencs de la colonització. Aquesta millor capacitat de detecció afavoreix la millora de la cobertura sanitària universal (meta 3.8), ja que permet identificar portadors asimptomàtics abans que apareguin complicacions com úlceres o càncer gàstric, i dissenyar estratègies terapèutiques personalitzades que preservin la microbiota beneficiosa i redueixin la resistència als antibiòtics.

Paral·lelament, la recerca incideix directament en l'Objectiu 6 (Aigua Neta i Sanejament), perquè posa en evidència la ruta de transmissió oral-oral i fecal-oral d'*Helicobacter pylori*, estretament lligada a la qualitat de l'aigua i a la higiene alimentària. Adaptant els mateixos protocols moleculars desenvolupats per a biòpsies, és possible monitorar la presència del bacteri en mostres ambientals d'aigua, aliments o superfícies. Aquesta capacitat analítica dona suport a la meta 6.1 (accés universal a aigua potable segura).

ÍNDEX

1. Introducció.....	1
1.1 Context històric	1
1.2 Característiques fenotípiques d' <i>Helicobacter pylori</i>	2
1.3 Localització gàstrica d' <i>H. pylori</i> i el seu impacte clínic	3
1.4 Epidemiologia i prevalença d' <i>H. pylori</i>	4
1.5 Mecanismes de virulència d' <i>H. pylori</i>	5
1.6 Estratègies diagnòstiques en <i>H. pylori</i>	7
2. Objectius.....	8
3. Materials i mètodes	8
3.1. Part teòrica	8
3.2. Part experimental	8
3.2.1. Mostres de biòpsies gàstriques	8
3.2.2. Subcultius i extracció de DNA genòmic	9
3.2.3. Amplificació per PCR i comprovació en gel d'agarosa	9
3.2.4. Seqüenciació i tractament de dades	10
3.2.5. Detecció d'infecció oculta d' <i>H. pylori</i> per qPCR	11
4. Resultats i discussió.....	13
4.1. Caracterització de la microbiota gastrointestinal	13
4.2. Microbiota gastrointestinal	14
4.2.1. Composició de la microbiota intestinal i gàstrica en pacients sans.....	14
4.3. Impacte de la infecció per <i>H. pylori</i> en la microbiota gàstrica.....	15
4.3.1. Associació i impacte d' <i>H. pylori</i> en estadis patològics no metaplàstics	17
4.3.2. <i>H. pylori</i> i càncer gàstric	19
4.4. Anàlisi de la microbiota de biòpsies gàstriques per seqüenciació parcial del 16S rDNA ..	22
4.4.1. Anàlisi de la diversitat alfa.....	22
4.4.2. Anàlisi de la diversitat beta	25
4.5. El gen <i>cpn60</i> com a marcador d'infecció oculta d' <i>H. pylori</i>	25
4.5.1. Anàlisi de dades.....	26
5. Conclusions	28
6. Bibliografia	29

1. Introducció

1.1 Context històric

“Denominem dogma a aquell principi fonamental, veritat universal i indiscutible o afirmada com a tal, exempta de ser sotmesa a proves de veracitat”

Anònim

La consideració de l'estómac com a òrgan estèril ha sigut un dels dogmes entre la comunitat científica més internalitzats i sostinguts en el temps (1). El característic pH baix semblava impossibilitar el creixement i la supervivència de bacteris en el medi àcid estomacal, delimitant molt la recerca i interès en els àmbits de patologies gàstriques (2). Malgrat l'escepticisme de la comunitat científica, molts investigadors van intentar fer front a l'impossible.

No va ser fins la dècada dels anys vuitanta quan el patòleg australià Robin Warren i el gastroenteròleg Barry Marshall van observar per primera vegada un bacteri present en gran quantitat a la mucosa gàstrica de pacients amb gastritis crònica i úlceres duodenals. Van aconseguir publicar les seves troballes, presentant evidències que un bacteri, inicialment classificat com a *Campylobacter pyloridis*, era capaç de colonitzar l'estómac humà i estava associat amb la inflamació gàstrica. Inicialment, aquest microorganisme es va incloure provisionalment dins del gènere *Campylobacter* ja que compartia característiques importants com la forma en espiral, la microaerofília i certs requisits a l'hora de cultivar-lo. Tanmateix, presentava dos trets diferencials clau: flagels lofòtrics i una activitat ureasa extraordinàriament elevada.

Posteriorment, la seqüenciació del gen 16S rRNA i l'anàlisi del percentatge de guanina i citosina en el DNA bacterià van portar a la reclassificació del bacteri en un gènere nou, amb *Helicobacter pylori* com a espècie tipus (3).

Malgrat l'escepticisme inicial de la comunitat científica, llur perseverança els va permetre demostrar la relació causal entre *Helicobacter pylori* i diverses patologies gàstriques. S'ha pogut observar que és l'agent etiològic causant d'aproximadament el 50% de les infeccions gàstriques en adults. Avui en dia, es considera demostrat que *Helicobacter pylori* juga un rol crucial en la patogènesi de la gastritis crònica, malaltia ulcerosa pèptica, limfoma MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma*) gàstric i adenocarcinoma gàstric (3), comportant la seva inclusió com a agent carcinogen tipus 1 per l'OMS l'any 1994 (4). Addicionalment, s'han pogut associar diversos trastorns extra-gastrointestinals (5,6), com l'anèmia ferropènica o immunocitopènia idiopàtica, amb la infecció per *Helicobacter pylori*.

Si bé aproximadament el 90% dels individus afectats romanen asimptomàtics durant gran part de la seva vida (7), la infecció per *Helicobacter pylori* pot suposar complicacions considerables de difícil tractament atès el creixent augment de resistències als antibiòtics en els darrers anys. Com a resultat, la comunitat científica ha mostrat un interès creixent en la interacció d'*Helicobacter pylori* amb la resta de la microbiota gastrointestinal. Comprendre

la dinàmica d'aquesta interrelació pot ser essencial per a obtenir millores en el diagnòstic primerenc, la identificació de nous biomarcadors i el desenvolupament de teràpies innovadores que poden fer front a la resistència als antibiòtics.

1.2 Característiques fenotípiques d'*Helicobacter pylori*

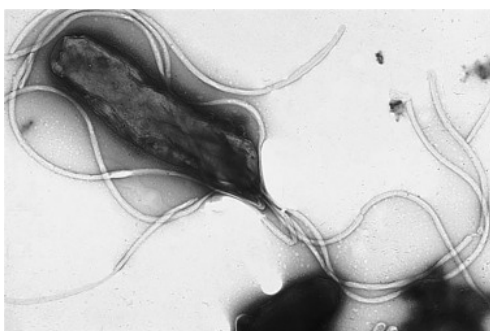


Figura 1. Morfologia d'*Helicobacter pylori* capturada amb microscopi electrònic de transmissió.

Font: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/pylorus>

Helicobacter pylori, referit com *H. pylori* d'ara endavant, pertany a la família *Helicobacteraceae*, ordre *Campylobacterales*, classe *Epsilonproteobacteria*, inclòs en el fílum *Pseudomonadota* (nom actual que ha substituït *Proteobacteria*) (8). Està caracteritzat per ser un bacil gramnegatiu helicoidal amb una mida de 0,5 µm a 3 µm. En tractar-se d'un bacteri mòbil, presenta de 2 a 6 flagels lofòtrics (**Figura 1**), essencials per la seva mobilitat (9).

Encara que *H. pylori* sigui principalment conegut per la seva estructura helicoidal, en condicions d'estrès pot adoptar una forma coccoide que tot i continuar com a viable, no és cultivable (**Figura 2**) (9). Aquesta adaptació li confereix una major probabilitat de supervivència en condicions desfavorables (10), com pot ser en presència d'antibiòtics, pH alcalí, temperatures elevades, etc.

El seu creixement *in vitro* és força lent, amb un període d'incubació d'entre 4 a 7 dies, en condicions de microaerofília (2-5% O₂) i elevades concentracions de CO₂ (5-10% CO₂) (11). Els medis rics en nutrients i suplementats amb sang o sèrum boví fetal (5-10%) són sovint els més utilitzats (12), amb una temperatura òptima d'incubació de 37 °C. El seu creixement és òptim a pH neutre. Diversos autors han observat que les soques d'*H. pylori* necessiten els aminoàcids arginina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina i valina per poder multiplicar-se (13,14). És remarcable considerar que aquests aminoàcids coincideixen amb els essencials pels humans. A més, el bacteri requereix piruvat, tiamina i hipoxantina, així com certs metalls (principalment ferro, zinc i magnesi) per a optimitzar el seu creixement (15).

Per altra banda, les necessitats nutritives i el metabolisme d'*H. pylori* difereixen substancialment entre l'estómac i les condicions *in vitro*. Un exemple clar és la ureasa, un enzim

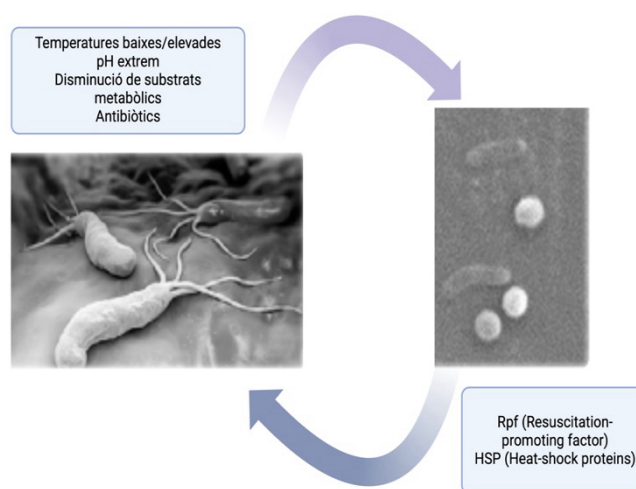


Figura 2 Condicions externes que afavoreixen el canvi morfològic en *H. pylori* (11).

Font: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060293>

que incorpora níquel: resulta essencial perquè el bacteri colonitzi l'estómac, però no és necessària per créixer en medis de cultiu. Per això, el níquel sembla ser un cofactor prescindible *in vitro* (15). Així mateix, l'adquisició de ferro pel bacteri depèn de l'entorn de creixement: en medis de cultius capta el ferro lliure disponible, mentre que a l'epiteli gàstric el ferro és obtingut a partir de l'hemoglobina o transferrina (16).

1.3 Localització gàstrica d'*H. pylori* i el seu impacte clínic

La colonització per *H. pylori* és selectiva per l'epiteli gàstric (17). Indueix majoritàriament una gastritis crònica activa, detectada histològicament i considerada com a principal factor desencadenant de lesions malignes (17); però aquesta no sempre és simptomàtica (18).

Resulta especialment rellevant en el desenvolupament de la patologia la localització de la infecció (**Figura 3**). Aquelles gastritis predominants a l'antra gàstric, produeixen un augment de la secreció d'àcid estomacal per part de les cèl·lules parietals (19). L'increment en la secreció de la gastrina, comporta úlceres esofàgiques, gàstriques, duodenals i reflux gastroesofàgic (20). En canvi, en gastritis predominants al cos gàstric (pangastritis), la inflamació s'estén gairebé per tota la superfície estomacal, comportant atròfia gàstrica per inflamació crònica i hipoclorhídria (21).

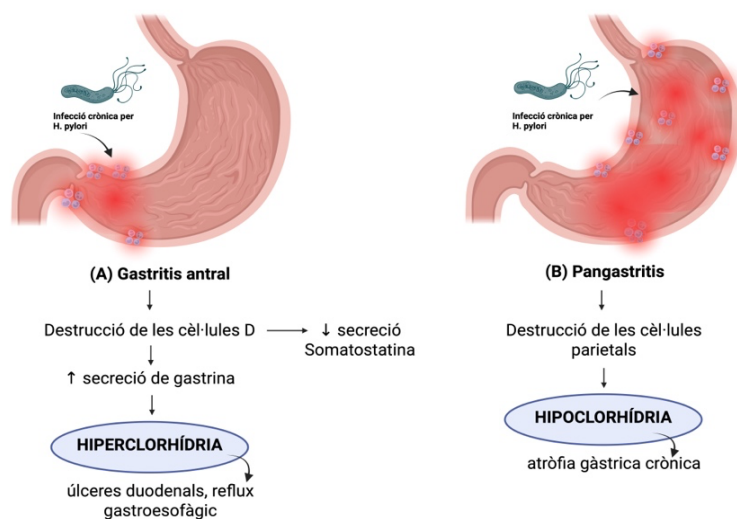


Figura 3. Representació esquemàtica del tipus de gastritis antral i del cos gàstric.

(A) Gastritis predominant antral amb colonització de l'antra i el duodè proximal. (B) Gastritis predominant del cos gàstric, l'extensió comprèn gairebé tot l'estómac.

Font: elaboració pròpia, adaptat de Liao *et al.* (20).

Aquestes complicacions poden acabar desencadenant càncer gàstric (22,23). L'adenocarcinoma gàstric representa el tipus histològic predominant en el càncer gàstric i engloba dues morfologies diferenciades: el carcinoma de tipus intestinal i el carcinoma de tipus difús.

El carcinoma de tipus intestinal consisteix en un conjunt de cèl·lules tumorals cohesives que presenten unions en els espais intercel·lulars i que s'organitzen de manera tubular o glandular. Presenta un desenvolupament conegut com la «cascada de Correa», que comporta el pas d'un epiteli gàstric normal fins a un estat de carcinoma invasiu (24). Aquest procés seqüencial, il·lustrat a la **Figura 4**, en el qual la infecció crònica per *H. pylori* impulsa majoritàriament el seu avanç (25), fa que existeixin etapes de control histològiques que permeten ser detectades mitjançant l'endoscòpia i la biòpsia.

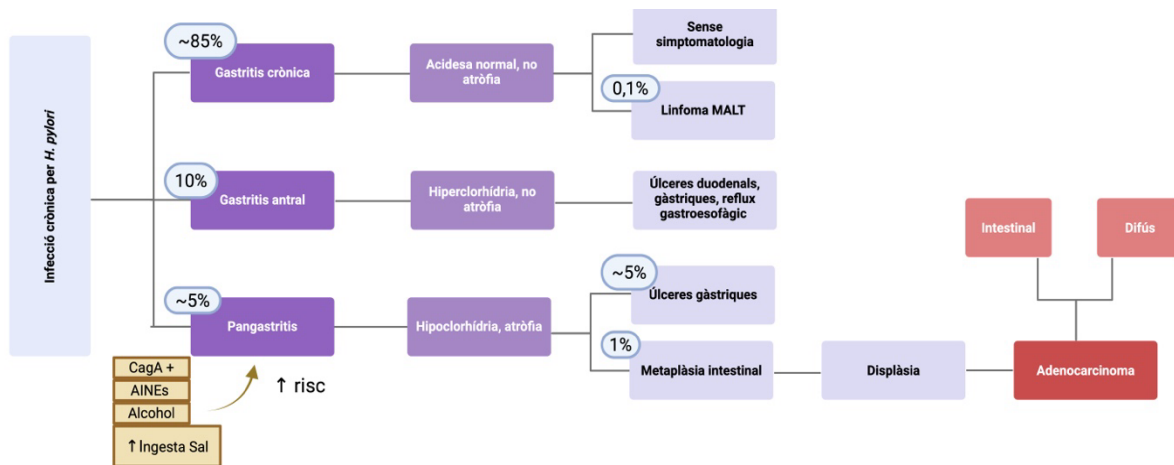


Figura 4. Representació esquemàtica dels principals resultats clínics de la infecció per *H. pylori*. S' il·lustra els diferents passos en l'evolució dintre de la denominada *cascada de Correa* (23). Font: Adaptat de Correa P. (24)

L'altre subtipus, el difús, està conformat per un grup de cèl·lules no cohesives, sovint molt disperses. Es tracta de tumors que no tenen una coberta glandular i que no segueixen la seqüència escalonada de lesions precursoras descrites per al carcinoma de tipus intestinal. Aquest tipus de carcinoma sembla estar més relacionat amb la inflamació activa crònica (26).

1.4 Epidemiologia i prevalença d'*H. pylori*

La infecció per *H. pylori* representa un repte global, aproximadament el 44,3% de la població mundial està infectada, considerant-se una de les infeccions més freqüent en humans (27). Aquest bacteri mostra variació genètica i diversitat al·lèlica, on un mateix individu podria estar infectat amb diverses soques d'*H. pylori* alhora. En zones epidèmiques amb una gran incidència, la taxa d'infecció mixta resulta significativa (28).

Zamani *et al.* (27) en la seva revisió sistemàtica posen de manifest una notable disparitat en els índexs de contagi per *H. pylori*, aconseguint diferències de fins a deu vegades entre diferents estats. La prevalença més elevada es va localitzar a Llatinoamèrica i el Carib, i la més reduïda a Amèrica del Nord, seguint un esquema que exhibeix índexs més alts en països en vies de desenvolupament. Àsia i Europa van mostrar una variabilitat particularment extensa dins de cada continent. Té major prevalença en països en vies de desenvolupament (29,30), fet que pot ser atribuït a pitjors condicions de vida, a causa del nivell socioeconòmic i l'alimentació (31).

Malgrat no haver-hi una evidència absoluta, sembla que el mètode de transmissió més comú és mitjançant les rutes oral-oral o fecal-oral, per consum d'aigua o menjar contaminat (7). Aquesta relació amb l'aigua i el menjar ha comportat la involucració per part de diversos estudis en la detecció de la càrrega bacteriana en mostres salivals i de la cavitat bucal (32,33). Aksit Bıçak *et al.* (34) van detectar *H. pylori* en mostres de placa dental i saliva fins i tot entre aquells individus que van donar negatiu per al patògen a través de proves

diagnòstiques invasives, així com en el grup de control. Aquesta manca de concordança entre la colonització oral i la gàstrica indica que el bacteri podria habitar la boca independentment d'una infecció gàstrica, donant suport a la hipòtesi que la cavitat oral pot servir com un reservori significatiu per a aquest patògen.

La infecció normalment ocorre durant la infantesa. Tot i això, la manifestació és més usual en persones adultes que en nens, segurament a causa d'una major exposició amb el transcurs dels anys. No es va observar una diferència significativa entre sexes a escala mundial, encara que certs estudis apunten a una major freqüència en homes (27).

1.5 Mecanismes de virulència d'*H. pylori*

La virulència d'*H. pylori* resulta força heterogènia i multifactorial. Un cop colonitza la mucosa gàstrica, la combinació de factors de virulència bacterians, factors fisiològics propis de l'hoste i condicions ambientals són clau en l'evolució de la malaltia (35) i, alguns d'ells, són potencials dianes terapèutiques per futurs tractaments d'erradicació.

L'estómac resulta especialment desafiant per la colonització bacteriana. A l'intestí gros, que presenta un pH neutre o lleugerament alcalí, la càrrega bacteriana és més elevada; en canvi, la producció d'àcid gàstric a l'estómac, ocasiona un pH d'1-2, limitant severament la seva colonització. De fet, la supervivència d'*H. pylori* al lumen estomacal és de només uns minuts i ha de migrar ràpidament cap a la superfície epitelial gàstrica.

De manera similar a l'intestí, la capa mucosa a l'estómac forma una barrera física contra la penetració bacteriana. La morfologia cel·lular i la motilitat flagel·lar li confereixen la possibilitat de migració a través d'aquesta, ja que els flagels es troben recoberts per una beina proteica, protegint el flagell contra la glicosilació de la flagel·lina a baix pH (36). S'ha observat que quan la proteïna estructural FlaA és glicosilada, hi ha certa alteració en la motilitat de la soca, comportant una remarcable davallada de la càrrega i colonització bacteriana com ja va suggerir Asakura *et al.* (37) en el seu estudi.

La supervivència en ambient àcid es veu afavorida gràcies a l'enzim més abundant en *H. pylori*, la ureasa. La hidròlisi de la urea en amoní i diòxid de carboni (**Figura 5**), comporta un augment de pH en les proximitats del bacteri, promovent la seva supervivència i facilitant la seva motilitat fins la capa mucosa, ja que es creu que la forma cel·lular helicoidal afavoreix la motilitat a través de medis viscosos, resultants de l'acció de la ureasa sobre les mucines gàstriques (38,39).

És mitjançant proteïnes de la membrana externa, també anomenades adhesines, que es produeix la seva adhesió a l'epiteli gàstric (7). La unió de proteïnes com poden ser la BabA, SabA o OipA, evita que el bacteri sigui eliminat per moviments peristàltics o desprendiment del moc. Presenta un paper clau en la resposta proinflamatòria de l'hoste (40). Diversos estudis han remarcat la possible implicació d'aquestes adhesines en el desenvolupament de l'adenocarcinoma gàstric, l'úlcera pèptica o gastritis crònica (41,42). L'associació íntima

d'aquestes amb l'epiteli gàstric és un factor més en la promoció d'una infecció estable, tot comportant al mateix temps una major inflamació d'aquest.

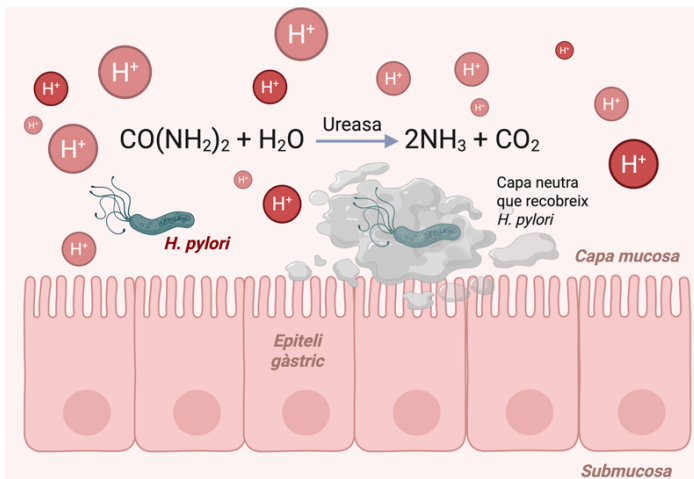


Figura 5. Esquema del procés de colonització per *H. pylori*. *H. pylori* utilitza l'enzim ureasa per a descompondre la urea en amoníac i diòxid de carboni. L'amoniac generat captura protons (H^+) del suc gàstric, convertint-se en amoni (NH_4^+) i elevat així el pH en els voltants del bacteri, neutralitzant l'àcid proximal. Font: elaboració pròpia.

A més, la vacuolització, un procés desencadenat per l'adhesina VacA, causa la formació de porus a la membrana cel·lular, compromentent llur polaritat. Aquest mecanisme no només altera la funció cel·lular, sinó que també genera inflamació (com la proliferació de $TNF-\alpha$ o $IL-6$) i activa senyals que poden promoure l'apoptosi o la inhibició de la proliferació de les cèl·lules T. VacA es troba present en totes les soques d'*H. pylori* (7), però amb diferent grau de virulència depenent de la variant al·lèlica del gen que presenten les soques.

Un altre factor clau en la patogènia és l'oncoproteïna CagA, la qual és injectada a les cèl·lules epitelials a través del sistema de secreció de tipus IV present a l'illa de patogenicitat *CagPAI* (**Figura 6**) (43). Un cop penetra les cèl·lules, altera el transport vesicular i els processos d'autofàgia. La seva translocació a les cèl·lules dendrítiques produeix la supressió de la resposta immune de l'hoste, augmentant la secreció de citocines proinflamàtores (44) i creant un entorn que afavoreix la persistència del bacteri a l'estómac. *CagPAI* no es troba present en totes les soques, comportant que aquelles soques CagA-positives siguin més virulentes i tinguin un pitjor pronòstic mèdic (45,46).

Un cop instaurada la infecció, *H. pylori* també promou la seva persistència a través del lipopolisacàrid (LPS) i de les proteïnes de superfície bacteriana. Aquestes permeten l'alliberament de mediadors proinflamatoris com $IL-1\beta$, $IL-8$ i espècies reactives d'oxigen (ROS) per part de monòcits i macròfags. A més, *H. pylori* és capaç d'induir directament la secreció d' $IL-8$ per part de les cèl·lules epitelials gàstriques (47). L'alliberament d'aquests factors estimula l'expressió dels antígens CD11b/CD18 als leucòcits, cosa que facilita l'adhesió i la migració leucocitària cap al teixit gàstric inflammat i condueix al desenvolupament de gastritis atròfica crònica (47,48).

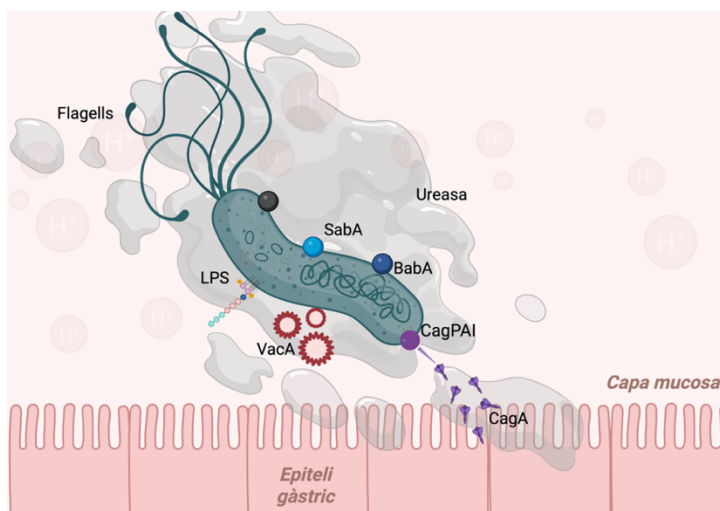


Figura 6. Mecanismes de virulència i patogènesi d'*H. pylori*.
Font: elaboració pròpia.

1.6 Estratègies diagnòstiques en *H. pylori*

Davant la sospita de malaltia gàstrica o la necessitat de descartar-la és recomanable el diagnòstic de la infecció per *H. pylori* (49). Les proves diagnòstiques poden classificar-se de manera general en mètodes no invasius i invasius.

Els mètodes no invasius són més accessibles, millor tolerats i menys costosos. A més, són mètodes d'elecció en pacients joves, asimptomàtics o en estudis epidemiològics. Per altra banda, en presència de signes o símptomes d'alarma (pèrdua excessiva de pes, disfàgia, sagnat gastrointestinal, vòmits persistents, anèmia ferropènica...), està indicada la realització d'endoscòpia i posterior biòpsia gàstrica. Les biòpsies obtingudes de l'antre són generalment adequades per a finalitats diagnòstiques; no obstant això, es recomana la realització de biòpsies addicionals del cos gàstric en els casos en què la teràpia d'inhibidors de la bomba de protons (IBP) o antibiòtics no s'ha suspès amb suficient antelació, per possibles discrepàncies en els resultats. Els diferents mètodes diagnòstics de la infecció per *H. pylori* i les seves característiques estan recollits a la **Taula annexa 1** (veure Annex).

En la pràctica clínica, és recomanable la concordança de resultats en almenys dos mètodes diagnòstics per tal de confirmar o descartar la infecció (20). Això és a causa de la presència de possibles falsos negatius, ja que cap tècnica diagnòstica presenta un 100% de sensibilitat ni és considerada com a *Gold Standard*. També s'ha de tenir en consideració que el rendiment de les proves diagnòstiques és afectat per medicaments com els IBP, sals de bismut i antibiòtics, afectant la seva sensibilitat. Per altra banda, algunes proves tampoc no estan exemptes de falsos positius, com la prova de la ureasa, on bacteris productors d'aquest enzim com *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* o *Staphylococcus aureus* podrien donar un fals positiu.

2. Objectius

A continuació es presenta un treball documentat que conté una part teòrica bibliogràfica combinada amb una part experimental, on l'objectiu principal és conèixer com la infecció per *H. pylori* modula la microbiota gàstrica. Per assolir-ho s'han plantejat els següents objectius secundaris:

- ◆ Realitzar una revisió bibliogràfica sobre la microbiota gàstrica, establir els possibles fílums predominants en pacients sans.
- ◆ Caracteritzar la interacció entre la microbiota gàstrica i la colonització per *H. pylori*.
- ◆ Identificar quines modificacions tant taxonòmiques com funcionals es produeixen en una infecció per *H. pylori*.
- ◆ Posada a punt de diferent metodologia per la detecció d'*H. pylori* per mètodes no invasius.
- ◆ Amplificar i seqüenciar parcialment el gen 16S rRNA a partir de DNA de biòpsies gàstriques.
- ◆ Analitzar la microbiota gastrointestinal a partir dels resultats de seqüenciació.

3. Materials i mètodes

3.1. Part teòrica

Per la cerca teòrica es van consultar diverses fonts bibliogràfiques com articles, revisions d'articles, llibres, revistes i recursos web; focalitzant-se en la microbiota gàstrica i, més específicament, en la influència i modulació d'aquesta a causa de la presència d'*H. pylori*. Concretament, es van utilitzar bases de dades com *PubMed (Medline)*, *Scopus*, *Springer Link* o *SciELO*.

En la recerca preliminar es van usar conceptes molt genèrics com "*Helicobacter pylori*" i "gut microbiome". Posteriorment, es van formular cerques bibliogràfiques més específiques amb combinació de paraules clau com *H. pylori* [AND] gastric cancer, entre d'altres. Tota la bibliografia s'ha recopilat fent servir el gestor bibliogràfic *Zotero* amb citacions adaptades a l'estil Vancouver.

3.2. Part experimental

3.2.1. Mostres de biòpsies gàstriques

Per al present estudi es va analitzar el DNA de tretze biòpsies gàstriques (**Taula 1**), obtingudes per la Unitat de Gastroenterologia de la Corporació Sanitària Parc Taulí (Sabadell, Barcelona). Aquestes mostres corresponen a sis pacients amb gastritis histològica, als quals se'ls va realitzar una endoscòpia per obtenir biòpsies de l'antre i cos gàstrics, amb signatura prèvia del consentiment informat. Dos dels pacients patien

esofagitis (B790 i B911) i un presentava, a més, úlcera duodenal (B790). Els altres, classificats com a estómac normal, no mostraven patologia (B788, C004, C006, C011). Les biòpsies B788, B911 i C011 corresponien a pacients amb histologia per *H. pylori* negativa. S'ha volgut incloure una mostra d'un lot antic de biòpsies, on el pacient presentava una neoplàsia antral T3, la mostra correspon a B247S.

Taula 1. Mostres de biòpsies obtingudes per l'estudi.

Mostres	Tipus de mostra	Localització	Edat	Sexe	Diagnòstic endoscòpic	Motiu endoscòpia	Histologia per gastritis	Histologia per <i>H. pylori</i>
B788	B788A	Antre	42	M	Normal	Epigastralgia	Positiu	Negatiu
	B788C	Cos					Positiu	Positiu
B790	B790A	Antre	62	M	Esofag II+Úlcus duodenal	Epigastr+Det Hpy	Positiu	Positiu
	B790C	Cos					Positiu	Positiu
B911	B911A	Antre	53	M	Esofagitis A	Epigastralgia	Positiu	Negatiu
	B911C	Cos					Positiu	Negatiu
C004	C004A	Antre	49	M	Normal	Epigastralgia	Positiu	Positiu
	C004C	Cos					Positiu	Positiu
C006	C006A	Antre	50	F	Normal	Dispepsia	Positiu	Positiu
	C006C	Cos					Positiu	Positiu
C011	C011A	Antre	56	M	Normal	Dispepsia	Positiu	Negatiu
	C011C	Cos					Positiu	Negatiu
B247	B247S	Antre	63	M	Neoplàsia antral T3	NA	NA	Positiu

3.2.2. Subcultius i extracció de DNA genòmic

Les soques van ser subcultivades en plaques d'agar sang Columbia (*Oxoid*) o d'agar Brucella (*BD Diagnostics*) amb un 10% de sèrum boví fetal (*Invitrogen*), incubades en microaerofília a 37° C durant 3 o 5 dies. Per procedir amb les extraccions prèviament es va preparar una suspensió amb Ringer de tot el creixement de la placa.

Inicialment, per l'extracció del DNA de les mostres es va seguir el protocol d'extracció establert en el kit comercial HigherPurity Bacterial DNA Isolation Kit (*Canvax Reagents SL*), però no es va aconseguir cap extracció amb suficient puresa i quantitat, inclús després de diversos intents amb modificacions del protocol. Per aquest motiu, es va optar per un altre kit d'extracció, que va ser el NZY Tissue gDNA Isolation Kit (*NZYTech*), amb el qual sí que es van poder fer les extraccions de DNA de les soques. Per cada 1,5 ml de suspensió cel·lular en Ringer es van obtenir 100 µL de DNA, la concentració del qual es va determinar amb un espectrofotòmetre NanoDrop One (*Nano-Drop Technologies*).

3.2.3. Amplificació per PCR i comprovació en gel d'agarosa

Les mesclades de les PCR per a un volum total de 20 µl van ser: 2 µl de Solució PCR-KCl 500 mM, Tris/HCl pH 8v0 15 mM, MgCl₂ 15 mM (*Applied Biosystems*) 0,5 µl dNTPs 10 mM (*Amersham Biosciences*), 1 µl de cada encebador a una concentració de 10 µM (*Isogen Lifescience*), 0,2 µl AmpliTaq Gold DNA polymerase 5 U/µl (*Applied Biosystems*) i DNA (≈ 250 ng). Es van provar diverses combinacions, descrites a la **Taula 2**, tant de cicles de la

PCR com d'encebadors universals dissenyats per amplificar la regió V3–V4 del gen 16S rRNA i també de la *cpn60*. El termociclador utilitzat va ser el Prime Thermal Cycler (*Techne*).

Els amplicons positius es van verificar mitjançant electroforesi amb un gel d'agarosa. Es va preparar un gel d'agarosa al 1,5%. Així, es van dissoldre 1,2 g d'agarosa (*Pronadisa*) en 80 ml de solució TAE 1×, escalfant fins a la seva completa dissolució. Després es van afegir 1,5 µL de GelRed (*Biotium 41003*), es va barrejar i es va abocar en la cubeta amb la pinta per a formar els pouets.

Taula 2. Encebadors i combinatòria de cicles de PCR assajats.

En vermell es marquen els diferents canvis realitzats per tal d'optimitzar l'amplificació. En groc es troben marcades les combinacions definitives d'encebadors i cicles de PCR amb que es van realitzar els assajos definitius.

Objectiu	Encebador	xNº cicles - desnaturalització inicial/xNº cicles desnaturalització, alineament, extensió / xNº cicles extensió final
<i>cpn60</i>	(M279 [100µM] + M280 [100µM]) + (M1612 [100µM] + M1613 [100µM]) (ratio 1:3)	x1 cicle - 95°C (5 min) / x40 cicles [95° C (30 s), 60° C (30 s), 75°C (30 s)] / x1 cicle 72°C (2 min) x1 cicle- 95°C (5 min) / x40 cicles [95° C (30 s), 60° C (30 s), 75°C (30 s)] / x1 cicle 72°C (5 min) x1 cicle - 95°C (5 min) / x40 cicles [95° C (30 s), 52° C (30 s), 75°C (30 s)] / x1 cicle 72°C (5 min) x1 cicle - 95°C (5 min) / x40 cicles [95° C (30 s), 54° C (30 s), 75°C (30 s)] / x1 cicle 72°C (5 min) x1 cicle - 95°C (5 min) / x40 cicles [95° C (30 s), 57° C (30 s), 75°C (30 s)] / x1 cicle 72°C (5 min) x1 cicle - 95°C (5 min) / x35 cicles [95° C (45 s), 60° C (45 s), 75°C (45 s)] / x1 cicle 72°C (2 min) x1 cicle - 95°C (5 min) / x40 cicles [95° C (30 s), 50° C (30 s), 75°C (30 s)] / x1 cicle 72°C (2 min)
	(M279 (10µM) + M280 (10µM))	x1 cicle - 95°C (5 min) / x40 cicles [95° C (30 s), 60° C (30 s), 75°C (30 s)] / x1 cicle 72°C (2 min)
	(M1612 (10µM) + M1613 (10µM))	x1 cicle - 95°C (5 min) / x40 cicles [95° C (30 s), 60° C (30 s), 75°C (30 s)] / x1 cicle 72°C (2 min)
	cpn 156 (10µM) + cpn 956 (10µM)	x1 cicle - 95°C (5 min) / x35 cicles [95° C (1 min), 54° C (1 min), 75°C (1 min)] / x1 cicle 72°C (2 min)
	cpn 855 (10µM) + cpn 956 (10µM)	x1 cicle - 95°C (5 min) / x40 cicles [95° C (30 s), 50° C (30 s), 72°C (30 s)] / x1 cicle 72°C (5 min)
16s rDNA	B515 (10µM) + B785b (10µM)	x1 cicle - 95°C (5 min) / x25 cicles [95° C (40 s), 48° C (2 min), 72°C (1 min)] / x1 cicle 72°C (7 min)
	B515 (10µM) + B785a (10µM)	x1 cicle - 95°C (5 min) / x25 cicles [95° C (40 s), 48° C (2 min), 72°C (1 min)] / x1 cicle 72°C (7 min)
	B341 (10µM) + B785a (10µM)	x1 cicle - 95°C (5 min) / x25 cicles [95° C (40 s), 55° C (2 min), 72°C (1 min)] / x1 cicle 72°C (7 min)

Per carregar el gel, cada mostra es va preparar barrejant 5 µL de l'amplicó amb 0,5 µL de solució de càrrega de DNA 6x NZYDNA loading dye (*NZYTech*). Es van dipositar 6 µL d'aquesta mescla en cada pouet, així com 5 µL del marcador de pesos molecular d'1 kb (*Real escala nº 1, Durviz*) com a referència. La separació es va dur a terme amb la font d'alimentació PS300B 300 (*Hofer*) a 100 V. La visualització de les bandes es va realitzar gràcies a una làmpada de llum blava Slite 140S (*Dragonfly*).

Les mostres positives es van purificar afegint 2 µL de ExoSAP-IT™ Express (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*) per cada 5 µL de producte de PCR. La mescla es va homogeneïtzar al vòrtex i es va incubar en un cicle de 4 min a 37°C, seguit d'1 min a 80°C. El DNA purificat es va quantificar amb NanoDrop One (*NanoDrop Technologies, USA*).

3.2.4. Seqüenciació i tractament de dades

Per a la seqüenciació es van preparar 20 µL de DNA purificat (≈ 200 ng/µL) que van ser tractats per part de *Macrogen, Inc.*, per la realització de la seqüenciació mitjançant la plataforma de seqüenciació *Illumina Miseq*.

Posteriorment, es va fer el tractament de dades mitjançant la plataforma d'anàlisi de dades *Mothur* (50). Les seqüències en brut van ser sotmeses a un filtre de qualitat i l'eliminació de seqüències quimèriques. Les seqüències úniques es van agrupar en les diferents unitats taxonòmiques operatives (OTU). És a dir, aquelles seqüències amb una similitud igual o major al 97% van ser agrupades a la mateixa OTU, comparades amb la base de dades *SILVA 138.2* (51) que conté totes les seqüències de referència del gen 16S rRNA de totes les soques tipus bacterianes.

A partir de la taula “*shared*” generada, que recull els comptatges d'OTUs per mostra, es va calcular la diversitat alfa amb l'índex de Shannon (50), que reflecteix la riquesa i l'equitat de la comunitat en cada biòpsia.

Per estudiar la diversitat beta, es va estimar la dissimilitud de Bray-Curtis entre totes les parelles de mostres (50), obtenint una matriu de distàncies que quantifica com són de diferents els perfils microbians d'una mostra respecte una altra. Aquesta matriu es va importar a R, on es va generar un mapa de calor jerarquitzat. Els colors posen de manifest blocs de mostres amb composicions similars i, alhora, destaquen els salts bruscos quan un estat patològic altera profundament la microbiota.

3.2.5. Detecció d'infecció oculta d'*H. pylori* per qPCR

Aquest assaig permet mesurar l'increment del senyal fluorescent, proporcional a la quantitat de DNA generat en cada cicle de PCR. Entenem com a cicle al moment en què la fluorescència travessa un llindar prèviament establert (*threshold cycle*, Ct). Com més gran sigui la quantitat inicial de la mostra diana a detectar, menor serà el Ct. La relació entre fluorescència i quantitat de producte amplificat permet una quantificació exacta de les molècules diana.

Per la quantificació i detecció s'ha elaborat un estàndard de concentració coneguda, *gBlock*, que corresponia a un fragment de 903 pb del gen *cpn60* d'*H. pylori* sintetitzat per a nosaltres per *Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT)*. Aquest va ser dissenyat a partir de l'alineament de 43 seqüències de soques d'*H. pylori* de diferent origen. En rebre'l, el DNA sintètic es va resuspendre en 100 µL TE buffer (*Invitrogen*), quedant així a una concentració de 4,72 ng/µL i es va emmagatzemar a una temperatura de -20 °C per a ús a llarg termini. Per tal de confirmar aquesta concentració del *gBlock*, es va mesurar la concentració per fluorimetria, amb el model *Quantus Fluorimeter (Promega)* seguint el protocol establert.

És necessari conèixer el nombre de còpies de DNA sintètic per microlitre de cada *gBlock* per poder fer-lo servir com un estàndard, amb el que posteriorment s'obté una corba patró que ens permet interpolar les dades de les mostres d'interès. Les còpies gèniques es van calcular mitjançant la fórmula, il·lustrada a la **Figura 7**, descrita per Godornes *et al.* (52):

$$\frac{\text{Còpies gèniques}}{\mu\text{L}} = \frac{\text{Concentració de DNA, gblock} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \right) \cdot 10^{-9} \cdot 6,022 \times 10^{23} \left(\frac{\text{molècules}}{\text{mol}} \right)}{\text{mida del fragment (pb)} \cdot 660 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)}$$

Figura 7. Càlcul del número de còpies gèniques per μL . $6,022 \times 10^{23}$ (molècules/mol) correspon al número d'Avogadro, la mida del fragment és la llargada del DNA sintetitzat en parells de bases (bp) i 660 correspon a la unitat de massa atòmica (UMA), que indica el pes mitjà d'un parell de bases del DNA (g/mol).

$$\frac{4,72 \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \right) \cdot 10^{-9} \cdot 6,022 \times 10^{23} \left(\frac{\text{molècules}}{\text{mol}} \right)}{903 \text{ bp} \times 660 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)} = 4,8 \times 10^9 \text{ còpies gèniques}/\mu\text{L}$$

Procedim calculant els μL de *gBlock* necessaris per partir d'una concentració inicial de 10^{11} còpies gèniques en 1000 μL i poder fer les dilucions seriades.

$$\frac{10^{11} \text{ còpies gèniques}}{\text{còpies gèniques}/\mu\text{L}} = \frac{10^{11} \text{ còpies gèniques desitjades}}{4,8 \times 10^9 \text{ còpies gèniques}/\mu\text{L}} = 20,97 \mu\text{L}$$

A continuació es van preparar una sèrie de dilucions seriades 1/10 amb aigua de grau PCR (*Roche*) i els μL de *gBlock* calculats prèviament. Aquestes sèries van comprendre concentracions de 10^{-2} a 10^{11} còpies per μL .

En el cas de les mostres de biòpsies, les reaccions de qPCR, amb un volum final de 25 μL , contenen: 12,5 μL de TaqPath BactoPure Microbial Detection Master Mix (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*), 0,5 μL de la sonda cpn-881 6-FAM/ZEN (IDT) a 12,5 μM (IDT), 1 μL de cada encebador (cpn-855 i cpn-956) a 10 μM , 9 μL de TE buffer (*Invitrogen*) i 1 μL del DNA de la mostra. La preparació en el cas dels estàndards roman la mateixa a excepció de que s'utilitza 10 μL de cada dilució com a substitut de les biòpsies. Els diferents encebadors, sonda i condicions del termociclador usats es recullen en la **Taula 3**. Tots els processos se'n van dur a terme amb l'equip QuantStudio 3 (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*).

Taula 3. Sonda, encebadors i condicions de la qPCR assajades

Objectiu	Sonda	Seqüència de la sonda	
cpn60	cpn-881	5'-/56-FAM/TAACCGGYG/ZEN/GTCAAGTYATYAGCGAAGA/3IABkFQ/-3'	
	Encebador	Seqüència de l'encebador	
	cpn-956	5'- GCTTTGCCTAAAACTCYACTT-3'	
	cpn-855	5'-AGARATGCTMAAGACATCGC-3'	
Condicions del cicle	Temperatura (°C)	Temps	Cicles
Desnaturalització inicial	95	5 min	x 1
Desnaturalització	95	15 s	
Alineament	50	30 s	x 35
Extensió	60	30 s	

Les dades en brut obtingudes a partir de l'assaig de la qPCR es van analitzar utilitzant la plataforma *Thermo Fisher Connect* i el software *Applied Biosystems CopyCaller*. L'anàlisi dels resultats es van realitzar a partir d'ajustaments manuals. El nombre de còpies va ser determinat mitjançant l'ús del mètode de la corba estàndard. S'ha aplicat el model estadístic $\Delta\text{CT} = K - \log 1 + E \text{ CN}$, on K és una constant, E és l'eficiència de la PCR assajada i CN és el nombre de còpies en un rang de $[1, \infty]$ (53). Les corbes generades es visualitzaren en escala logarítmica. Amb aquesta corba va ser possible calcular la quantitat de còpies gèniques detectades en cada mostra de biòpsia per interpolació.

4. Resultats i discussió

Per assolir els objectius establerts s'ha dut a terme una cerca bibliogràfica que ha permès entendre quina és la implicació de la infecció per *H. pylori* en la modulació de la microbiota gastrointestinal. La primera part d'aquest apartat presenta els resultats derivats de la bibliografia. La segona part descriu els resultats obtinguts a través d'una anàlisi de seqüències gèniques de mostres de biòpsies gàstriques. A més, s'han fet posteriors proves de detecció que han permès complementar i comparar amb la informació exposada prèviament.

4.1. Caracterització de la microbiota gastrointestinal

La caracterització microbiana és sustentada principalment per tècniques de cultiu i mètodes moleculars. La dificultat de simular amb precisió les condicions de vida dels microorganismes en el seu hàbitat *in vivo* i llurs sinèrgies metabòliques dificulten l'estudi dels bacteris del tracte gastrointestinal, comportant que només una petita proporció resulten cultivables *in vitro* (54). Davant el repte d'estudiar amb més detall aquests microorganismes, l'ús de tècniques moleculars encapçala la llista de mètodes més emprats per aquesta finalitat.

Les tècniques moleculars possibiliten la identificació dels organismes a partir de similituds genètiques, on destaca el gen que codifica la subunitat 16S de l'RNA ribosòmic (54). Aquest gen presenta una longitud d'aproximadament 1540 pb amb 9 regions hipervariables (V1-V9), claus per a distingir les diferents espècies, i altres regions altament conservades (**Figura 8**), que possibiliten el disseny d'encebadors universals (55). Per

exemple, els encebadors utilitzats en aquest treball amplifiquen regions variables V3-V4 del gen 16S rRNA (≈ 465 pb) a partir de DNA extret directament de la mostra de les biòpsies. Els fragments amplificats, una vegada seqüenciats permeten caracteritzar la comunitat bacteriana coexistent, amb la possibilitat d'identificar les espècies presents en una mostra.

Per assignar les seqüències obtingudes a unitats taxonòmiques específiques (famílies, gèneres i espècies), s'utilitzen les OTUs, que agrupen les seqüències basant-se en percentatges de similitud de nucleòtids. L'enfocament més habitual empra el llindar del 97%: totes les seqüències del gen 16S rRNA que comparteixen almenys aquest

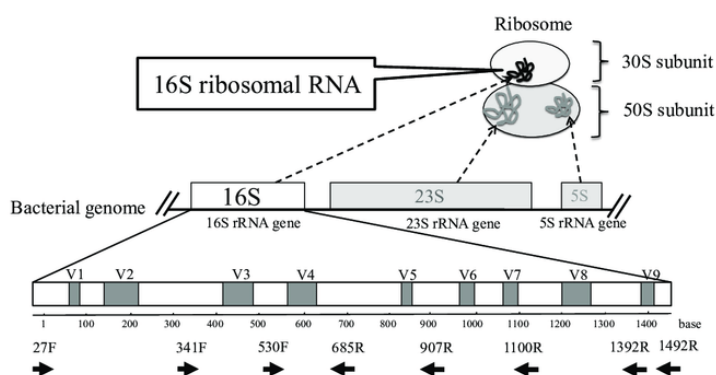


Figura 8. Esquema del complex ribosòmic i gen 16S rRNA.

Les bandes blanques i grises indiquen regions conservades i regions hipervariables respectivament.

Font: Fukuda *et al.* (54)

percentatge amb una seqüència de referència (com la base de dades SILVA 138.2) s'assignen a la mateixa espècie (OTU al 97 %) (56).

4.2. Microbiota gastrointestinal

La microbiota gastrointestinal, sovint anomenada *superorgan*, comença a desenvolupar-se ja en el període gestacional a través d'interaccions entre la microbiota materna i el sistema immunitari (57). La microbiota gastrointestinal humana interactua tant amb si mateixa com amb l'individu, afavorint el desenvolupament del sistema immunitari i l'homeòstasi, influint així en la salut i la malaltia.

Aquest complex ecosistema comprèn una gran varietat de microorganismes, incloent-hi bacteris, fongs, virus i arqueus, que coexisteixen en el tracte digestiu (58). L'intestí comprèn la diversitat més gran de microorganismes, sent la majoria bacteris anaerobis, encara que hi ha algunes espècies aeròbies presents, especialment en el cec (59).

L'estómac, en contrast amb l'intestí, alberga una microbiota menys diversa a causa del seu baix pH, donant com a resultat una càrrega microbiana molt més baixa (10^2 – 10^4 CFU/mL a l'estómac *versus* 10^{10} – 10^{12} CFU/mL a l'intestí) (60). La microbiota gàstrica no es troba tan extensament estudiada com la intestinal. Alguns estudis recents han començat a caracteritzar la microbiota específica de l'estómac, revelant que la major part d'aquesta colonitza sobretot l'antre i/o cos estomacal (61–63).

Tot i això, la microbiota no roman homogènia a tota la cavitat gàstrica. Variacions tant en la riquesa com en la diversitat es poden trobar entre la mucosa, el suc gàstric i inclús entre antre i cos estomacals. Per exemple, el suc gàstric conté sobretot bacteris de fílums específics com *Bacillota* (abans *Firmicutes*), *Bacteroidota* (abans *Bacteroidetes*) i *Actinobacteriota* (abans *Actinobacteria*). No obstant això, aquestes dades no capten realment tota la composició de bacteris a l'estómac, ja que els bacteris transitoris provinents de la cavitat oral no colonitzen la mucosa gàstrica (64). Així mateix, sembla que la riquesa d'espècies al cos estomacal és notablement més elevada que a l'antre, malgrat no mostrar diferències significatives (65). Diversos factors poden influir en la composició de la microbiota gàstrica, com els patrons dietètics, la ubicació geogràfica, l'ús de fàrmacs (com els IBP o els antibiòtics) i probiòtics, i, sobretot, la infecció per *H. Pylori*.

La presència d'*H. pylori* és un dels principals disruptors de la diversitat de la microbiota gàstrica i pot alterar significativament l'entorn gàstric. Aquest desequilibri, o disbiosi, pot donar lloc a una estimulació immunitària contínua, inflamació crònica i, fins i tot, promoure el desenvolupament de carcinoma gàstric (66).

4.2.1. Composició de la microbiota intestinal i gàstrica en pacients sans

En un intestí sa, la microbiota està dominada pels fílums *Bacteroidota* i *Bacillota*, seguits per *Pseudomonadota*, *Fusobacteriota* (abans *Fusobacteria*), *Mycoplasmata* (abans *Tenericutes*), *Actinobacteriota*, i *Verrucomicrobiota* (abans *Verrucomicrobia*), constituint al voltant del 90% de la població microbiana (67). No obstant això, la composició de la

microbiota intestinal és altament influenciada per factors ambientals, hàbits dietètics i condicions metabòliques com l'obesitat, la diabetis tipus 1 o la malaltia inflamàtòria intestinal (68). Per altra banda, teràpies antibiòtiques, l'ús a llarg termini d'IBP i infeccions per patògens com *H. pylori* alteren significativament la microbiota intestinal (69,70).

Estudis de seqüenciació massiva han permès identificar els cinc filums predominants en un estómac sa (**Taula 4**): *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota* i *Fusobacteriota* (61,63,71). *H. pylori*, classificat dins *Pseudomonadota*, sembla ser el bacteri gàstric més comunament identificat (60,63,72). Bik *et al.* (63) en el seu estudi avalua 1.833 soques aïllades de biòpsies gàstriques, on troba que la mucosa gàstrica està colonitzada pels cinc filums més predominants mencionats prèviament, dels quals s'han caracteritzat 128 filotips diferents. Així mateix, Llorca *et al.* (73) suggereixen que *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Bacteroidota* i *Actinobacteriota* són els filums dominants en la microbiota gàstrica sana, encara que amb percentatges variables. D'altra banda, altres estudis indiquen que en pacients negatius per a *H. pylori*, els filums més abundants en la microbiota gàstrica són *Bacillota*, *Bacteroidota* i *Actinobacteriota* (74).

Taula 4. Filums i gèneres més predominants a l'estómac.

Fílum	Gèneres predominants
<i>Pseudomonadota</i>	<i>Haemophilus</i>
	<i>Helicobacter</i>
	<i>Actinobacillus</i>
	<i>Neisseria</i>
<i>Bacillota</i>	<i>Streptococcus</i>
	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Staphylococcus</i>
	<i>Lactococcus</i>
	<i>Veillonella</i>
<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotella</i>
	<i>Porphyromonas</i>
<i>Actinobacteriota</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Fusobacteriota</i>	<i>Fusobacterium</i>

Investigacions dutes a terme per Ndegwa *et al.* (75) exposen que els sis gèneres que es troben amb major freqüència en un estómac sa són: *Streptococcus* (*Bacillota*, 24%), *Prevotella* (*Bacteroidota*, 23%), *Veillonella* (*Bacillota*, 6%), *Fusobacterium* (*Fusobacteriota*, 5%), *Haemophilus* (*Pseudomonadota*, 4%), *Neisseria* (*Pseudomonadota*, 4%) i *Gemella* (*Bacillota*, 4%), fet que també sustenta l'estudi dut a terme per Rajilić-Stojanović *et al.* (76), on els gèneres més freqüents van ser *Neisseria*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Veillonella* i *Streptococcus*.

No obstant això, els resultats obtinguts pels mètodes de seqüenciació massiva de la microbiota gàstrica poden estar certament limitats per les característiques de la tècnica, la qual, per exemple, no permet la discriminació entre bacteris procedents de la cavitat oral i que es troben de pas cap a l'intestí, d'aquells que representen realment una colonització crònica de la mucosa gàstrica (77). Per tant, hi ha un cert debat sobre si els resultats obtinguts en són realment representatius.

4.3. Impacte de la infecció per *H. pylori* en la microbiota gàstrica

Malgrat que la infecció per *H. pylori* tingui una prevalença global propera al 50%, el 80% d'aquestes romanen asimptomàtics. Tot i això, *H. pylori* continua sent un factor de risc important per a moltes patologies gàstriques. Els mecanismes de virulència associats a *H. pylori* no sols impliquen efectes directes sobre la mucosa gàstrica, sinó també dany tissular

indirecte, com pot ser l'alteració de la composició microbiana de l'estómac, reduint la prevalença de bacteris beneficiosos i permetent el creixement de bacteris potencialment patògens. En esdevenir numèricament superior, *H. pylori* esdevé dominant a l'estómac i monopolitza els nutrients disponibles (urea, aminoàcids), tot augmentant el pH local i creant un ambient hostil per a molts comensals tolerants a l'àcid. L'estómac passa d'un ecosistema multiespècie a un quasi monocultiu (78). Simultàniament, *H. pylori* injecta CagA, produeix VacA i ROS. Tot plegat, aquests processos mantenen una gastritis crònica no atròfica. Després de dècades, el dany i la proliferació de les cèl·lules mare condueixen a un teixit que es torna atròfic i, en alguns casos, desenvolupa metaplàsia intestinal i carcinoma (79).

Sembla plausible estimar que bacteris diferents d'*H. pylori* també tinguin implicació en la patogènesi de la malaltia gàstrica, tant de forma sinèrgica com competitiva. No obstant això, la naturalesa d'aquesta interacció i el seu paper en la carcinogènesi gàstrica encara no està esclarida. Un dels supòsits estableix que la infecció a llarg termini per *H. pylori*, que condueix a l'atròfia gàstrica i a un estat d'aclorhídria, afavoreix el creixement excessiu d'espècies diferents d'*H. pylori*. Aquests bacteris poden induir la transformació maligna col·laborant en la inflamació i la generació de compostos nitrogenats, com N-nitrosamines i òxid nítric, que són perjudicials per al DNA i també produir més ROS. Per exemple, *Veillonella parvula* i *Haemophilus parainfluenzae* poden augmentar la concentració de nítrid en el suc gàstric a causa de la seva activitat de reducció de nitrats, podent causar la metilació del DNA de les cèl·lules epitelials (80).

S'ha pogut observar com la colonització gàstrica persistent per *H. pylori* acostuma a potenciar una regulació a la baixa de la diversitat alfa, és a dir, la varietat de microorganismes presents en una mateixa mostra disminueix. L'estudi presentat per Ndewga *et al.* (75) exposa, mitjançant l'anàlisi de l'índex de Shannon, com un estómac amb presència d'*H. pylori* presenta una menor diversitat alfa. Aquest fet podria ser explicat per la presència de les oncoproteïnes del patògen, especialment CagA, que ja havia mostrat potencial per ser un disruptor de l'entorn gàstric i inductor de la disbiosi gàstrica (81).

Respecte a la diversitat beta, aquella que ens permet comparar la diversitat entre dos o més mostres, s'observa que quan *H. pylori* colonitza la mucosa gàstrica, hi guanya predomini de manera aclaparadora sobre els altres microorganismes gàstrics. Encara que tant els individus *H. pylori* positius com els negatius comparteixen els principals filums colonitzadors, és l'abundància relativa la que presenta diferències com diversos estudis han assenyalat (61,63,82). Els individus *H. pylori* positius van mostrar una major proporció de *Pseudomonadota*, fet que pot ser atribuït en gran mesura al propi augment d'*H. pylori*. Altres alteracions de la microbiota observades van ser uns nivells reduïts de *Actinobacteriota*, *Bacteroidota* i *Bacillota* (63,73,82,83) que, juntament amb la presència dominant d'*H. pylori*, provoquen efecte dòmino sobre la fisiologia gàstrica, empitjorant el pronòstic de la infecció. Els principals efectes de la disminució d'aquests filums davant l'augment *H. pylori* es troben descrits a la **Taula 5**, exposada a continuació.

Taula 5. Efectes fisiològics desencadenants en l'hoste a causa de la disminució dels filums Actinobacteriota, Bacteroidota, Bacillota i augment d'*H. pylori*.

Alteració	Pèrdua funció fisiològica	Efectes sobre l'hoste
↓ Actinobacteriota (per ex. <i>Bifidobacterium</i>)	Síntesi d'acetat i vitamines B. Components antiinflamatoris	- Dèficit de metabòlits tròfics i antioxidants que comporta un epitel·li més vulnerable; menor regulació immunitària local, desencadenant inflamació crònica (84,85).
↓ Bacteroidota (per ex. <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i>)	Degradació de polisacàrids i producció de propionat/succinat. Inducció de cèl·lules T reguladores.	- Disminució d'àcids grassos de cadena curta. - pH intraluminal menys controlat, augment de la permeabilitat gàstrica i activació de vies inflamatòries que afavoreixen la metaplàsia (85,86).
↓ Bacillota (per ex. <i>Lactobacillus</i>)	Producció de butirat i pèptids antimicrobians. Manteniment de l'acidesa local gàstrica.	- Menor reparació epitel·li a causa de la disminució de butirat. - Pèrdua de competència davant patògens, causant el sobrecreixement de <i>Pseudomonadota</i> i <i>Streptococcus</i> . Generació de compostos nitrogenats cancerígens (87,88).
↑ <i>H. pylori</i>	Neutralització de l'àcid protector de l'estómac.	- Atròfia de les cèl·lules parietals, amb hipoclorhídria perllongada. - Proliferació de factors com CagA/VacA que indueixen inflamació i dany cel·lular. - Secreció de ROS que dificulta la reparació del DNA. - Major probabilitat de mutacions i predomini del patògen en el nínxol gàstric que impedeix la colonització de bacteris beneficiosos (7,47).

4.3.1. Associació i impacte d'*H. pylori* en estadis patològics no metaplàstics

L'ancoratge d'*H. pylori* al revestiment gàstric activa la resposta inflamatòria. El sistema immunitari innat pot alterar l'epitel·li gàstric de diverses maneres, entre elles mitjançant la inducció de citocines proinflamatòries, sobretot IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF- α , mitjançant l'activació de NF- κ B i AP-1 (84). Paral·lelament, els factors de virulència bacterians (CagA, VacA, ureasa, LPS...) generen estrès oxidatiu i pertorben la integritat de les unions estretes de les cèl·lules epitel·lials gàstriques. El resultat combinat és l'apoptosi, necrosi i descamació de l'epitel·li superficial, amb infiltració de neutròfils i limfòcits (85). Si l'hoste és incapaç d'eliminar la infecció, la lesió es perpetua i es converteix en una inflamació crònica que, amb el temps, altera profundament el nínxol gàstric. Aquest estat premaligne es coneix com a atròfia gàstrica crònica i constitueix el primer esgraó de la cascada precancerosa descrita per Correa (24,86).

La mort progressiva de les cèl·lules parietals redueix la secreció d'àcid clorhídric i el pH luminal pot passar d'un rang 1–2 a valors per sobre de 4, la qual cosa permet la supervivència i proliferació d'altres microorganismes que normalment són eliminats per l'ambient àcid. Aquesta nova "condició" s'ha relacionat amb alteracions en la composició microbiana estomacal com les descrites per Parsons *et al.* (87), on *Helicobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Fusobacteriaceae* i *Prevotellaceae* són les famílies predominants. Un altre estudi posa èmfasi en la disminució de gèneres particulars com *Tannerella* i *Treponema*. Fet que també es va associar amb disbiosi en comparació amb els controls

sans (88). Aquesta pèrdua de diversitat comporta alguns efectes agreujants de la infecció per *H. pylori* com els descrits anteriorment i els exposats a continuació a la **Taula 6**.

Taula 6. Efectes fisiològics a causa del sobrecreixement de certes famílies i gèneres bacterians.

Alteració	Conseqüència fisiològica	Efectes sobre l'hoste
↑ <i>Helicobacteraceae</i>	Augment d'ureasa, factors CagA/VacA	- Alcalinització del medi estomacal que pot derivar a gastritis crònica i posterior atrofia de les cèl·lules parietals.
↑ <i>Streptococcaceae</i>	Fermentació de sucres com el lactat. Augment d'IL-8 i TNF- α .	- Amplificació de la resposta inflamatòria i la formació de compostos nitrosos
↑ <i>Fusobacteriaceae</i>	Les adhesines indueixen formació d'IL-6, IL-8 i radicals lliures .	- Potència dany en el DNA i angiogènesi; vinculat a pitjor pronòstic en càncer gàstric.
↑ <i>Prevotellaceae</i>	Fomenten producció de mucines (amines i àcids orgànics). Contribueixen a la conversió de nitrits a compostos nitrogenats.	- Incrementa càrrega de carcinògens locals i manté el pH elevat a l'estómac atròfic.
↓ <i>Tannerella</i>	Menor producció de succinat i propionat (àcids grassos de cadena curta) i enzims antioxidants.	- Disminueix la protecció epitelial i augmenta la permeabilitat gàstrica.
↓ <i>Treponema</i>	Reducció de rutes reductores de nitrat i síntesi vitamínica.	- Menys detoxificació de radicals lliures; dèficit nutricional local.

Sharma *et al.* (89) varen modelar en el seu estudi una hipoclorhídria aguda i reversible mitjançant IBP i van detectar un increment sobtat tant de la càrrega bacteriana com dels nivells de nitrits al suc gàstric. Aquesta troballa s'ha correlacionat amb un augment de la concentració de nitrit gàstric. L'enzim nitrit reductasa, present a *H. pylori*, és capaç d'utilitzar aquests nitrits i reduir-los a nitrosamines carcinogèniques, comportant la progressió a càncer gàstric (90). El sobrecreixement de bacteris com *Veillonella*, *Haemophilus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Neisseria* també s'han relacionat amb la producció d'aquests nitrocompostos (91). Ferreira *et al.* (92), en el seu estudi, estableix els gèneres *Helicobacter*, *Neisseria*, *Prevotella* i *Staphylococcus* com els més prevalents durant la infecció per *H. pylori*.

Aquestes troballes contraresten en certa manera amb el que descriu Parsons *et al.* (87), que més recentment van observar que una gastritis atròfica crònica relacionada amb *H. pylori* mostra un patró oposat, ja que tant el nombre de bacteris com la seva diversitat van disminuir en la progressió de la malaltia. Aquest contrast d'ambdós podria explicar-se en el fet que Sharma *et al.* va induir una disminució ràpida però reversible de l'acidesa gàstrica mitjançant IBP. És en aquest breu període d'hipoclorhídria on es va produir l'augment de la microbiota gàstrica. Mentre que Parsons *et al.* estudia l'hipoclorhídria a llarg termini i és en aquestes condicions on guanya prevalença *H. pylori* i produeix una disminució de la diversitat. Això explica el contrast aparent entre ambdós estudis i subratlla que l'impacte de la disbiosi depèn tant de la intensitat com de la durada de la hipoclorhídria.

Tornant a l'anàlisi de Parsons *et al.*, es van comparar pacients infectats per *H. pylori* amb pacients que subseqüentment han desenvolupat una gastritis atròfica causada per la infecció (87) on es van revelar, a més, diferències funcionals significatives, concretament, a causa de l'augment de les proporcions de *Streptococcus mitis* i *Neisseria mucosa*.

Aquesta última espècie bacteriana ha demostrat ser productora, juntament amb *H. pylori*, de grans quantitats de l'enzim d'alcohol deshidrogenasa, que produeix l'acetaldehid, un important carcinogen, tot contribuint a la carcinogènesi gàstrica (93). Per altra banda, s'ha observat que *Streptococcus mitis* indueix l'estat coccoide en *H. pylori* (94) que pot derivar en fallada del tractament antibiòtic i a falsos resultats negatius en proves diagnòstiques. S'ha suggerit que aquesta forma coccoide està més associada amb el desenvolupament de l'adenocarcinoma gàstric que la forma en espiral, com s'ha dit anteriorment (95).

4.3.2. *H. pylori* i càncer gàstric

En primer lloc, dades de diverses cohorts prospectives i metaanàlisi atribueixen l'inici de la seqüència de carcinogènesi a la infecció per *H. pylori* (25,96). De fet, en comparar individus infectats amb no infectats, s'ha descrit una associació molt remarcable: la presència d'*H. pylori* incrementa dràsticament la probabilitat de desenvolupar adenocarcinoma gàstric, concretament s'incrementa prop de 21 vegades (25,97,98). Aquesta transformació maligna de les cèl·lules sembla estar vinculada a *H. pylori*, qui a través de processos inflamatoris desencadena atròfia de les glàndules, derivant a metaplàsia intestinal i posterior displàsia (24).

Tot seguit, cal destacar que el procés de carcinogènesi altera directament l'homeòstasi gàstrica. La davallada en l'acidesa estomacal sembla marcar el tret de sortida de la desregulació metabòlica, conseqüència que pot ser provocada en gran mesura per *H. pylori* i la seva capacitat d'adaptació a l'ambient àcid via secreció d'ureasa. Aquesta elevació de pH afavoreix la colonització exitosa d'*H. pylori*, fet que promou l'acció de diversos factors de virulència, més notablement l'oncoproteïna CagA i certs al·lels de *vacA* (**Figura 9**):

- La presència del gen *cagA* determina soques més agressives, amb una probabilitat incrementada 1,6 vegades de patir càncer gàstric (99). Un cop injectada dintre les cèl·lules epitelials gàstriques, CagA desencadena la senyalització inflamatòria i oncogènica, accelerant la divisió cel·lular, anul·lant la inhibició per contacte entre cèl·lules i blocant la mort programada d'aquestes (100,101).
- Per altra banda, VacA és, com prèviament ja s'ha mencionat, una toxina formadora de porus; les variants al·lèliques més virulentes creen porus intracel·lulars, alterant la permeabilitat de la membrana plasmàtica (102) i afectant els mitocondris (49). La toxina destrueix les unions estretes epitelials, desencadena l'apoptosi per dany mitocondrial i activa múltiples cascades de senyalització (24,86). En frenar l'autofàgia i la degradació lisosòmica, VacA també permet que CagA s'acumuli a l'interior de les cèl·lules hoste (103).

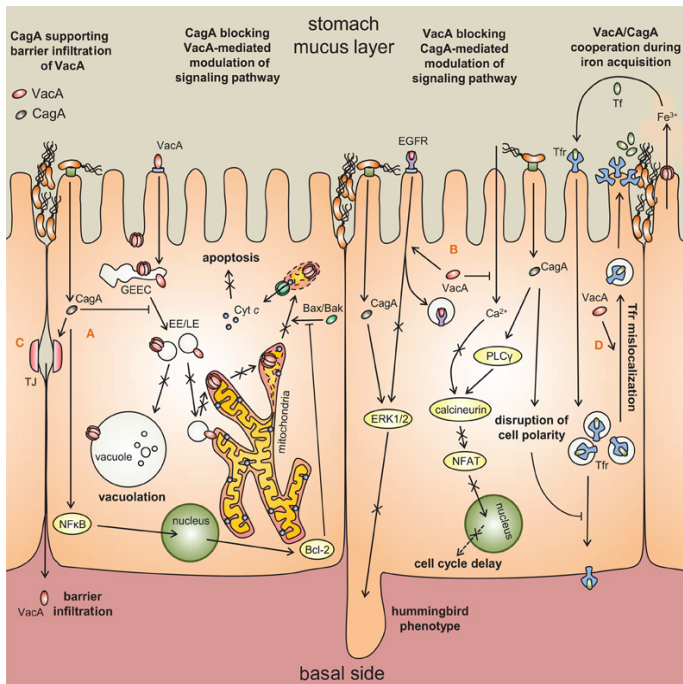


Figura 9. Representació esquemàtica de com les toxines VacA i CagA modulen de manera cooperativa o antagonista la fisiologia de cèl·lules epitelials gàstriques.
Font: doi.org/10.3389/fcimb.2012.00037

Tanmateix, la progressió a carcinoma gàstric depèn de la interacció de múltiples factors, on estan inclosos els factors de virulència d'*H. pylori*, però també la susceptibilitat genètica de l'hoste i factors ambientals (104). Alteracions epigenètiques i polimorfismes en gens correlacionats amb les respostes tant adaptativa com innata, com les interleucines (IL1, IL8) o enzims reparadors de DNA, poden influir en la susceptibilitat individual del desenvolupament del càncer gàstric. És remarcable destacar que tot i això, alguns autors com Chen *et al.* (105) suggereixen que aquest «punt sense retorn» de la cascada de carcinogènesi gàstrica és independent de la infecció per *H. pylori* i que aquest només

representa un factor més que augmenta la probabilitat. Aquest fet pot estar sustentat perquè només entre l'1% i el 2% de les persones amb infecció per aquest patògen acaben desenvolupant càncer gàstric (25,96).

Quant a la diversitat microbiana en presència d'*H. pylori*, els resultats poc coincidents entre els diferents estudis ofereixen conclusions poc comparables, la qual cosa dificulta el determinar quines són les alteracions de la microbiota en estats metaplàstics.

Alguns estudis indiquen diferències de composició de la mucosa gàstrica entre pacients amb càncer gàstric i altres trastorns gàstrics (92,106,107). Una metaanàlisi de 14 estudis (1.543 pacients) ha mostrat que la riquesa microbiana (OTUs) i la diversitat alfa (índex de Simpson) disminueixen significativament quan es passa d'una mucosa sense lesió a càncer (92). També s'ha pogut documentar la prevalença dels fílums *Actinobacteriota* i *Bacillota* per sobre de *Bacteroidota* i *Fusobacteriota*. Igualment, Avilés-Jimenez *et al.* (106) també sustenten que van observar un descens progressiu de la diversitat microbiana a mesura que avança la malaltia.

Contràriament, l'estudi dut a terme per Chen *et al.*, on es van comparar mostres de càncer gàstric, van observar una comunitat més rica i diferenciada, on en destaca *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Fusobacteriota* i *Actinobacteriota*. Es pensa que la proliferació d'aquests grups pot afavorir la tumorigènesi (105). Curiosament, tot i que *H. pylori* influeix de manera significativa en l'estructura global de la microbiota, només altera lleugerament la proporció relativa de la resta de bacteris. A més, l'estudi retrospectiu de

Ferreira *et al.* (92) ha suggerit que en el carcinoma gàstric, hi pot haver una disminució significativa de l'abundància d'*H. pylori*, mentre que els gèneres *Phyllobacterium*, *Achromobacter* i *Citrobacter* van resultar ser més abundants. De manera semblant, Hsieh *et al.* van detectar que les espècies de *Clostridium*, *Fusobacterium* i *Lactobacillus* solen ser més prevalents a l'estómac dels pacients amb càncer gàstric (108).

Resultats més recents reforcen aquesta tendència, Castaño-Rodríguez *et al.* (109) van descriure un marcat augment en les abundàncies relatives dels gèneres *Lactococcus*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Haemophilus* i *Leptochichia* en pacients amb càncer gàstric en comparació amb les mostres control. Relacionat amb això, s'ha observat que certes vies del metabolisme dels carbohidrats, com la producció d'àcids grassos de cadena curta, es van veure potenciades en els pacients amb càncer gàstric. Paral·lelament, un estudi més extens que inclou 103 pacients amb càncer gàstric en comparació amb 212 amb gastritis crònica (110), va evidenciar una càrrega bacteriana molt superior en càncer gàstric, encara que sense una diversitat significativa a nivell de filum. No obstant això, es van trobar cinc gèneres amb activitats potencials de promoció del càncer, com *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Shigella* i *Nitrospira*. Curiosament, en aquest estudi, el filum *Nitrospirota* es va trobar en tots els pacients amb càncer gàstric i estava absent en els casos de gastritis crònica.

En aquesta línia, com ja indica un estudi recent, a mesura que avancen els estadis de la malaltia, la mucosa tumoral sovint s'enriqueix en gèneres típics de la cavitat oral o l'intestí (92). La presència, a nivell de gènere, de comensals orofaríngeos i intestinals s'ha vist que inclou sobretot *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Staphylococcus* i *Bacillus* (104,108,111), els quals poden arribar a ser patògens oportunistes. El cas de *Lactobacillus* és paradigmàtic. Malgrat que les espècies classificades com bacteris de l'àcid làctic són comunament utilitzades com a probiòtics, estudis recents demostren que poden arribar a ser factors promotors de carcinogènesi gàstrica induint inestabilitat genòmica a través de la producció sostinguda d'àcid làctic. Nivells elevats de lactat promouen angiogènesi i invasió immunitària. També hi tenen participació en producció de nitrocompostos i ROS (112,113), convertint-los en potencials promotors tumorals.

De manera concordant, Coker *et al.* (114) van obtenir resultats similars, identificant cinc microorganismes diferents d'*H. pylori* d'origen oral (*Peptostreptococcus stomatis*, *Streptococcus anginosus*, *Parvimonas micra*, *Slackia exigua* i *Dialister pneumosintes*), que van mostrar un cert domini en el nínxol gàstric de pacients amb càncer gàstric. A més, van permetre ser utilitzats com a diagnòstic diferencial entre càncer gàstric i gastritis superficial.

Tot i la rellevància dels resultats, tots els estudis previs es veuen afectats per cert biaix inherent derivat de la comparació entre diferents cohorts de pacients, específicament les que tenen càncer gàstric i individus controls sense càncer. La majoria d'estudis són transversals i presenten certa heterogeneïtat en criteris d'inclusió, protocols de tractament de la mostra i plataformes de seqüenciació, la qual cosa afegeix més dificultat per realitzar comparacions robustes. Així, alguns investigadors es van decantar més per un enfocament de disseny aparellat, en el qual la microbiota gàstrica es va analitzar comparativament en

el tumor del mateix pacient i en teixits no malignes. Una vegada més, la comunitat bacteriana es diferenciava considerablement del teixit no tumoral i tumoral en pacients amb càncer gàstric (115–117). A més, els resultats de la seqüenciació massiva de la microbiota gàstrica s'han de veure amb precaució en relació amb les seves limitacions, ja que són tècniques que no poden distingir els bacteris colonitzadors dels transitoris (de la cavitat oral a l'intestí). Per tant, el debat sobre quins microorganismes es consideren veritables membres de la microbiota gàstrica roman actiu.

Quant a la prevalença, segons dues metaanàlisis dutes a terme recentment en adults, la prevalença general de la infecció per *H. pylori* ha disminuït gairebé un 15% en els últims trenta anys (118). Aquesta disminució ha comportat una disminució de la incidència del càncer gàstric. En línia amb aquesta observació, els assajos aleatoris indiquen que l'erradicació d'*H. pylori* redueix el risc de desenvolupar càncer gàstric, especialment en individus sense evolucions premalignes o amb antecedents familiars de la malaltia (119). Tot i això, cal més investigació en aquesta àrea per establir conclusions més sòlides.

4.4. Anàlisi de biòpsies gàstriques per seqüenciació parcial del 16S rDNA

Es presenten els resultats obtinguts a partir de la seqüenciació de les biòpsies gàstriques, després de l'extracció del DNA microbià i l'amplificació per PCR del gen 16S rRNA. De les extraccions de DNA de les 13 biòpsies, les mostres B788A, B788C, B911C, C004C, C006C i C011C no es van incloure en l'anàlisi final perquè no van poder ser seqüenciades per diversos motius (DNA majoritàriament humà, no amplificació del 16S rDNA, poca quantitat i/o mala qualitat del DNA). L'assignació d'OTUs al 97% de similitud ha permès realitzar els següents anàlisis:

4.4.1. Anàlisi de la diversitat alfa

La diversitat microbiana, avaluada mitjançant l'índex de Shannon, que revela perfils molt diversos entre mostres (**Taula 7**).

Taula 7. Diversitat alfa avaluada a través de l'Índex de Shannon per les mostres assajades.

Valors <1,5 indiquen baixa diversitat, amb pocs taxons que dominen gairebé tot l'ecosistema gàstric. Valors >2,5 indiquen alta diversitat: diversitat d'espècies, sense cap dominància clara. També s'ha inclòs l'estat endoscòpic de les mostres analitzades i les OTUs observades.

Mostra	Estat endoscòpic	Índex de Shannon	OTUs observades
B247S	Neoplàsia antral T3	1,659	1975
B790A	Úlcus duodenal	0,075	563
B790C	Úlcus duodenal	0,257	305
B911A	Esofagitis A	2,804	106
C004A	Endoscòpia gàstrica normal	2,079	111
C006A	Dispèpsia	3,112	229
C011A	Dispèpsia	2,907	234

La diversitat microbiana de l'estómac evoluciona de manera paral·lela a la gravetat clínica, passant d'un equilibri altament ric a un monocultiu dominat per *H. pylori* i, finalment, a una disbiosi fragmentada observada a nivell de fílum (**Figura 10**). En pacients sense lesions gàstriques (C004A, C011A), l'entorn àcid i la mucosa gàstrica intacta permeten la coexistència d'una dotzena de famílies (**Figura 11**); *Streptococcaceae*, *Veillonellaceae*, *Pasteurellaceae*, *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae* i *Neisseriaceae* entre d'altres, amb *H. pylori* pràcticament imperceptible. L'índex de Shannon, entorn de 3, confirma aquest estat d'eubiosi. Els fílums predominats en aquestes mostres han sigut majoritàriament *Bacillota*, *Campylobacterota* i *Pseudomonadota* per C004A i *Bacillota*, *Bacteroidota* i *Pseudomonadota* per C011A.

Malgrat patir inflamació esofàgica en el cas de la mostra B911A, aquesta presenta un perfil semblant (Shannon 2,80) a les mencionades prèviament. Això posa èmfasi que una lesió extra-gàstrica (com l'esofagitis en aquest cas) sembla no comprometre la diversitat intrínseca de l'ecosistema gàstric per si mateixa, i que continua operant en condicions similars a les d'un pacient sa, amb fílums predominants com *Pseudomonadota*, *Bacteroidota*, *Bacillota* i *Actinomycetota*.

Quan *H. pylori* inicia la seva colonització, però, encara no causa lesions endoscòpiques (C006A), *Helicobacteraceae* ja representa aproximadament un 20% de l'abundància relativa. Encara hi ha diversitat, però l'equitat ja decau: *Streptococcaceae* i *Helicobacteraceae* sumen prop d'un terç de la comunitat. Els efectes de l'ureasa neutralitzen zones del moc sense alterar dràsticament el pH global, de manera que la diversitat només disminueix lleugerament (Shannon 3,12 amb 230 OTUs). Sembla que la presència de *Campylobacterota* (en un 15%) en C006A no compromet significativament la resta de fílums.

En les úlceres duodenals amb càrrega elevada d'*H. pylori* (B790A, B790C), comença a observar-se un canvi radical. *Helicobacteraceae* supera el 95% i les altres famílies queden per sota del 3%. La pèrdua d'acidesa i la inflamació crònica fan col·lapsar la comunitat. Aquests valors reflecteixen un ecosistema bacterià gairebé homogeni, dominat per *Campylobacterota* (>97%). Aquesta dominància desplaça a gairebé tots els OTUs habituals de la mucosa sana, produint una caiguda dràstica dels índexs de diversitat. La invasió i dominància d'*H. pylori* redueix famílies com *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae* i *Prevotellaceae*, eliminant l'efecte protector d'aquestes. L'índex de Shannon cau a 0,08 i 0,26 respectivament, amb 564 i 306 OTUs, convertint l'ecosistema en un quasi monocultiu on pràcticament només sobreviu el patògen.

Quan la neoplàsia antral ja ha trencat la barrera mucosa (B247S), s'afavoreix la metilació del DNA i la producció de nitrosamines per bacteries de la família *Veillonellaceae*, circumstància que agreuja el dany tissular i pot impulsar la carcinogènesi, la dominància d'*H. pylori* retrocedeix lleugerament (aprox. 65%) i reapareixen famílies oportunistes com *Lactobacillaceae*, *Actinomycetaceae* i *Micrococcaceae*, procedents de la boca o de l'intestí. Es generen zones de pH més neutre que afavoreixen aquest sobrecreixement. La riquesa global es dispara, s'hi detecten fins a 1.976 OTUs, però, l'equitat segueix baixa

(Shannon 1,66), reflectint un teixit gàstric fragmentat i genotòxic. Els filums com *Campylobacterota* (~65%), *Bacillota*, *Bacteroidota* i *Pseudomonadota* en són dominants, tal com s'ha documentat prèviament (92,114). Aquest patró reforça la hipòtesi que el càncer altera l'ecosistema i afavoreix el sobrecreixement de bacteris oportunistes.

La seqüència observada sembla seguir la tendència descrita a la literatura, la pèrdua sostinguda d'acidesa i la destrucció del moc per part d'*H.pylori* són els punts d'inflexió que poden dirigir la trajectòria de la diversitat de la microbiota gàstrica a mesura que avança l'estat patològic en les malalties gàstriques.

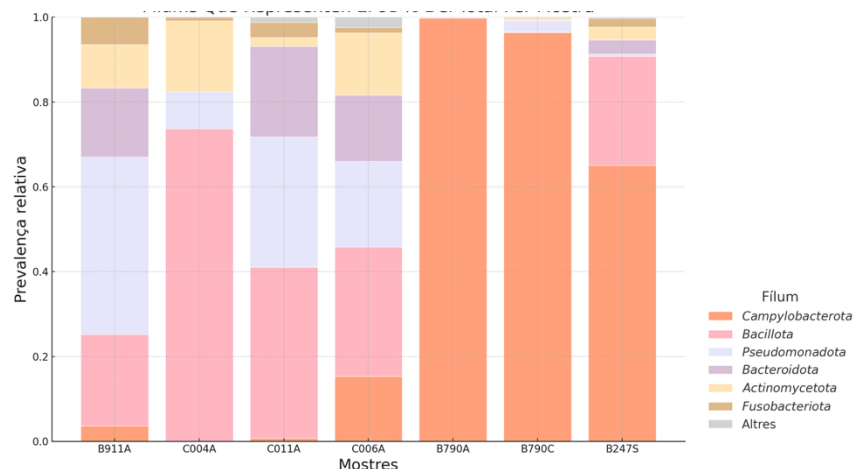


Figura 10. Prevalença de cada filum bacterià en les diferents mostres gàstriques analitzades mitjançant seqüenciació parcial del gen 16S rRNA. Els filums representen el 95% del total en cada mostra

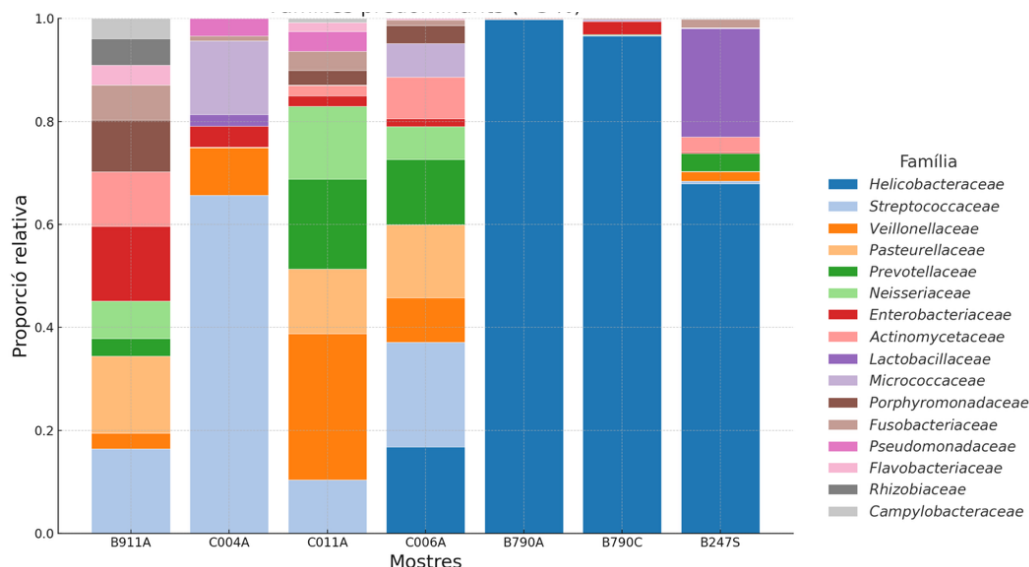


Figura 11. Distribució de la prevalença de les famílies bacterianes. De forma acumulada, representen el 95 % del total de la comunitat per mostra. S'han exclòs les famílies que no assoleixen el 3 % en cap mostra i ordenades les mostres segons la seva gravetat clínica (d'esquerra a dreta: pacients sans, infecció primerenca, úlcera, neoplàsia).

4.4.2. Anàlisi de la diversitat beta

El mapa de calor de Bray-Curtis (**Figura 12**) és una mesura de similitud que serveix per a quantificar fins a quin punt dues comunitats biològiques coincideixen o difereixen en funció de l'abundància de cada element (per ex. OTUs). El resultat és un valor que oscil·la entre 0 (comunitats idèntiques, mateixa proporció de cada OTU) i 1 (comunitats completament diferents, sense OTUs en comú). Aquest anàlisi ens informa de com varia la microbiota gàstrica de les set mostres en funció de la patologia de cada pacient. Els tons més clars (liles suaus i rosats) assenyalen parells de mostres on la composició de les OTUs és molt semblant (distàncies pròximes a 0), mentre que els porpres més intensos marquen comunitats clarament diferents (valors pròxims a 1).

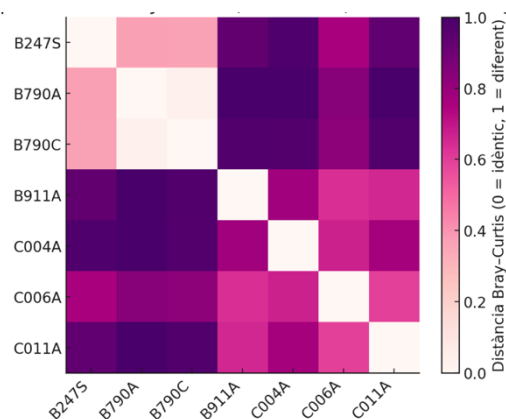


Figura 12. Mapa de calor de distàncies de Bray-Curtis de les mostres estudiades.

Els tons més clars indiquen comunitats microbianes molt similars (distància ≈ 0) i els tons més intensos assenyalen comunitats més diferents (distància ≈ 1).

El patró més evident apareix en B790A i B790C: ambdues mostres procedeixen del mateix pacient amb úlcera duodenal associada a *H. pylori*, amb una distància $\approx 0,04$ que confirma que representen rèpliques d'un mateix perfil. La mostra B247S, corresponent a un carcinoma antral T3. Encara que la distància entre el càncer i les mostres ulceroses s'eleva al voltant de 0,36-0,37, continua sent molt menor que la que separa aquestes tres mostres de la resta, la qual cosa suggereix que l'úlcera i la neoplàsia comparteixen alteracions bacterianes similars, probablement vinculades a la infecció per *H. pylori* i als processos que pot desencadenar.

En l'extrem oposat se situen B911A, C006A i C011A, procedents d'estòmacs endoscòpicament normals o amb esofagitis lleu. Les seves distàncies $\approx 0,59$ -0,64 indiquen comunitats força diferents, que poden ser característiques de teixits sense lesions greus. La mostra C004A, també catalogada com a normal, ocupa una posició intermèdia. S'observa certa afinitat amb el grup sa, però s'allunya prou (distància $> 0,67$) per a insinuar possible variabilitat individual o efectes de la simptomatologia per epigastràlgia.

Les majors dissimilituds (valors $> 0,97$) es donen sempre entre el bloc ulcerós/càncer i les mostres normals, corroborant que la malaltia gastroduodenal s'associa a un canvi profund en les abundàncies relatives d'OTUs.

4.5. El gen *cpn60* com a marcador d'infecció oculta d'*H. pylori*

Detectar a temps la infecció per *H. pylori* és tot un repte, específicament en biòpsies gàstriques amb poca càrrega microbiana ("infeccions ocultes") o inclús altres tipus de mostres com poden ser mostres d'aigua. En etapes primerenques de la infecció, molts dels

mètodes que s'utilitzen habitualment poden no ser prou sensibles i donar falsos negatius. En aquest context, entra en joc la xaperona 60, també coneguda com a *cpn60*.

Es tracta d'una proteïna altament conservada que compleix una funció essencial en el correcte plegament d'altres proteïnes dins de la cèl·lula bacteriana. És considerada un gen de manteniment cel·lular (*housekeeping gen*) (120), la seva expressió és estable i necessària fins i tot en condicions adverses o de baix metabolisme, com ocorre en els estadis primerencs d'infecció per *H. pylori*. Aquesta característica la converteix en una diana molecular ideal per a detectar la presència del bacteri quan la seva càrrega és mínima i les proves diagnòstiques convencionals no són concloents.

Presenta un ampli rang de detecció i permet el disseny d'encebadors específics que discrimini gèneres o espècies d'interès. La regió de *cpn60* mostra una variabilitat de seqüència superior a la del 16S rDNA, la qual cosa facilita distingir espècies molt emparentades.

El seu paper en *H. pylori*, més enllà de ser un *housekeeping gen*, també consisteix a exercir una forta immunomodulació. Té la capacitat d'induir, per part de les cèl·lules epitelials, la producció de citocines proinflamatòries incloent-hi interleucines IL-6 i IL-8, que ja s'han mencionat prèviament com a factors agreujants de la infecció per *H. pylori*.

4.5.1. Anàlisi de dades

La tècnica de la qPCR ens permet la detecció i quantificació en temps real de còpies gèniques en les mostres de biòpsia (121). Les mostres es van analitzar en dues tandes diferents: (A) correspon a les mostres B788A, B788C, B790A, B790C. (B) compren les mostres C004A, C006A, C011A i B911A. De cada mostra analitzada per duplicat, s'ha interpolat el contingut gènic amb la corba estàndard generada a partir de les dilucions seriades del *gBlock* i s'ha obtingut la càrrega bacteriana corresponent (**Figura 13**). Amb aquest procediment, el nostre assaig va evidenciar que, de les vuit mostres de biòpsies examinades de la **Taula 1**, les mostres C006A, B790A i B790C presentaven, com a mínim, 100 còpies de DNA. En canvi, les dilucions $\leq 10^1$ còpies i les mostres de biòpsia restants (B788A, B788C, B911A, C004A i C011A) no van travessar el llindar en $\geq 95\%$ dels replicats i, per tant, foren descartades com positives. Les mostres B247S, B911C, C004C, C006C i C011C no es va incloure en l'anàlisi per manca de material biològic disponible, ja que algunes d'elles formaven part d'un lot antic de biòpsies del qual no es disposava de prou contingut per a la realització de l'assaig.

Aquests resultats concorden amb la informació clínica prèvia. Les mostres B790A i B790C provenen d'un mateix pacient diagnosticat d'úlcera duodenal de grau II; l'estat avançat de la malaltia indica una possible colonització d'*H. pylori* tant a l'antre com al cos gàstric. Pel que fa al pacient C006, l'única mostra positiva correspon a la biòpsia de l'antre, dins d'un context de dispèpsia. Ambdós pacients presentaven histologia positiva per *H. pylori*.

Les altres biòpsies analitzades no es van detectar amb aquest assaig, segurament perquè la càrrega bacteriana era menor al nostre límit de detecció de 100 còpies, fet que pot estar

sustentat perquè la histologia per *H. pylori* ja havia donat prèviament resultat negatiu o que directament no tenen infecció per *H. pylori* (pacients B788, C004A i C011).

En el pacient de la mostra C004, l'únic amb histologia positiva, però resultat negatiu a la qPCR, la discrepància podria atribuir-se a la distribució irregular de la colonització. Si la mostra histològica conté un focus bacterià i la mostra destinada a qPCR prové d'una zona sense colonització, és plausible obtenir un resultat discordant. Per resoldre aquesta situació, es recomana repetir l'endoscòpia amb biòpsies múltiples de l'antre i del cos, tot processant una mateixa mostra paral·lelament per a histologia i qPCR.

De cara a un futur projecte, amb objectiu de detectar *H. pylori* ja sigui en biòpsies gàstriques amb poca càrrega microbiana, així com en altres tipus de mostres (per ex., saliva, aliments, mostres d'aigua...), per a augmentar encara més la sensibilitat de la metodologia, proposem traslladar aquest protocol a PCR digital (dPCR). La dPCR exposa la mostra a milers de micro reaccions i permet una quantificació absoluta sense necessitat de corba patró (122), amb major tolerància a inhibidors i límits de detecció que poden arribar per sota de 10 còpies. És una alternativa als mètodes de detecció actuals i usa un marcador gènic diferent a les qPCR i dPCR que ja n'hi ha per *Helicobacter*.

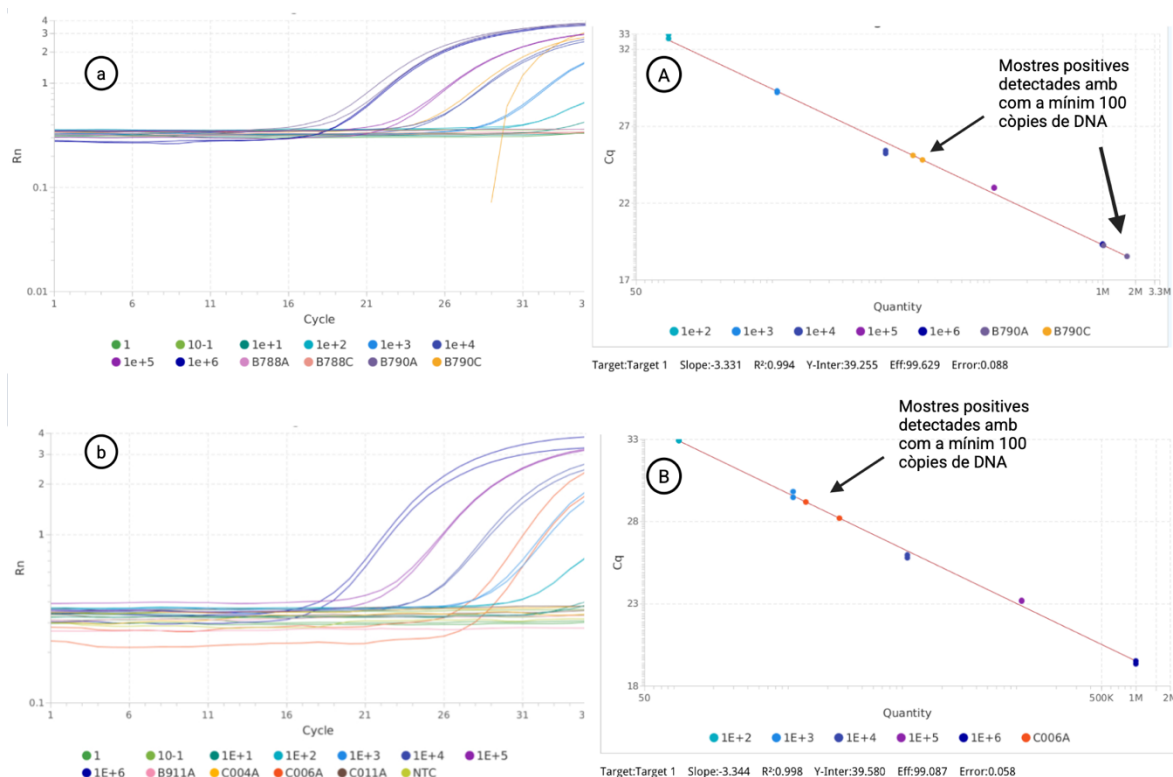


Figura 13. Resultats obtinguts de l'assaig de detecció del gen *cpn60* per qPCR.

Les mostres de biòpsies s'analitzaren en dues tandes independents. (A) i (a) corresponen a les mostres B788A, B788C, B790 i B790C. (B) i (b) comprenen les mostres C004A, C006A, C011A, B911A.

Els gràfics (a) i (b) assenyalen l'amplificació en temps real (corba R_n vs. cycle) de les mostres per duplicat juntament amb les dilucions patró (10¹–10⁶ còpies de l'estàndard *gBlock*).

A la dreta, (A) i (B) representen la corba estàndard (Cq vs. log₁₀) on s'observa un rang lineal entre 10² i 10⁶ còpies, eficiència ≈ 99,6% i R² = 0,994 per (A) i eficiència ≈ 99,1% amb R² = 0,998 per (B).

Les mostres que van travessar el llindar en almenys el 95% dels replicants amb ≥ 100 còpies s'han establert com a positives. Només les mostres C006A, B790A i B790C es van considerar positives.

5. Conclusions

És rellevant remarcar que davant la manca d'una metodologia estandarditzada, la literatura ha mostrat discrepàncies en certs aspectes, els estudis analitzats es veuen afectats per cert biaix derivat de l'heterogeneïtat en criteris d'inclusió, protocols de tractament de la mostra i plataformes de seqüenciació, la qual cosa afegeix més dificultat per realitzar comparacions robustes. Així i tot, a continuació s'exposen les troballes més destacades i recurrents.

- La microbiota gàstrica en absència d'infecció per *H. pylori* es caracteritza per una alta diversitat i equilibri, on sembla que filums com *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota* i *Fusobacteriota* en són els més representatius, amb gèneres predominants com *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella* i *Haemophilus*.
- *H. pylori* és un potent modulador de la microbiota gàstrica, que trenca l'equilibri i provoca una disbiosi significativa, marcada per una reducció de la diversitat alfa i una dominància aclaparadora del propi patogen. Els individus *H. pylori* positius van mostrar una major proporció del filum *Pseudomonadota*, fet que pot ser atribuït en gran mesura al propi augment d'*H. pylori*.
- La colonització per *H. pylori* redueix l'abundància relativa de filums com *Actinobacteriota*, *Bacteroidota* o *Bacillota* que comporta la davallada de gèneres protectors com *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Bifidobacterium* i afavoreix el sobrecreixement de bacteris associats a inflamació com *Streptococcus*, *Neisseria*, *Veillonella* i *Haemophilus*, alterant la funcionalitat del nínxol gàstric.
- En estadis metaplàstics, sembla haver-hi una dominància inicial d'*H. pylori*, però, en estadis més avançats, es presenta una caiguda de la seva abundància i un reemplaçament parcial per gèneres típics de la cavitat oral i intestinal com *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Nitrospira*, etc.
- Aquesta disbiosi comporta efectes fisiològics greus per a l'hoste com la disminució d'àcids grassos protectors i d'enzims antioxidants. Producció continuada de metabòlits tòxics, amb increment de ROS, compostos nitrogenats i àcid làctic que comporten dany epitelial crònic que afavoreix la progressió cap a metaplàsia i càncer.

Pel que fa a l'anàlisi dels resultats experimentals:

- L'anàlisi experimental de la diversitat alfa mostra com els estòmacs infectats per *H. pylori* presenten ecosistemes pobres i desequilibrats, mentre que els no infectats mantenen una comunitat bacteriana més rica i estable. Les patologies com el càncer gàstric o la infecció per *H. pylori* amb úlcera provoquen una disbiosi profunda, amb dominància bacteriana o colonització oportunista.
- La diversitat beta entre mostres s'altera clarament en presència d'*H. pylori*, separant mostres patològiques (úlcera i càncer) d'aquelles amb morfologia gàstrica normal, reflectint una reestructuració de la microbiota gàstrica.
- L'assaig de qPCR dirigit al gen *cpn60*, optimitzat durant el treball, ha permès detectar càrregues baixes d'*H. pylori* en mostres amb simptomatologia no greu, demostrant ser una eina diagnòstica sensible i útil. Aquesta tècnica pot resultar clau en etapes primerenques de la infecció resolent falsos negatius per baixa càrrega bacteriana.

6. Bibliografia

1. Facultad de Medicina UNAM [Internet]. [citat 3 març 2025]: http://www.facmed.unam.mx/eventos/seam2k1/2008/ene_01_ponencia.html
2. Freedberg AS, Barron LE. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. *Jour D D*. 1940;7(10):443-5.
3. Pajares JM, Gisbert JP. *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. *Rev. E. E. D*. 2006;98(10). Disponible a: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082006001000007&lng=en&nrm=iso&tlng=en
4. Schuetz AN, Theel ES, Cole NC, Rothstein TE, Gordy GG, Patel R. Testing for *Helicobacter pylori* in an era of antimicrobial resistance. *J Clin Microbiol*. 2024. 62(2):e00732-23. doi: 10.1128/jcm.00732-23.
5. Wong F, Rayner-Hartley E, Byrne MF. Extraintestinal manifestations of *Helicobacter pylori*: a concise review. *World J Gastroenterol*. 2014 S;20(34):11950–61. doi:10.3748/wjg.v20.i34.11950.
6. Engelsberger V, Gerhard M, Mejías-Luque R. Effects of *Helicobacter pylori* infection on intestinal microbiota, immunity and colorectal cancer risk. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024;14:1339750. doi: 10.3389/fcimb.2024.1339750
7. FitzGerald R, Smith SM. An overview of *Helicobacter pylori* infection. New York, NY: Springer US; 2021 p. 1-14. doi:10.1007/978-1-0716-1302-3_1
8. Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70(11):5607-12. doi: 10.1099/ijsem.0.004332.
9. Sharndama HC, Mba IE. *Helicobacter pylori*: an up-to-date overview on the virulence and pathogenesis mechanisms. *Braz J Microbiol*. 2022;53(1):33-50. doi: 10.1007/s42770-021-00675-0. Epub 2022
10. Ierardi E, Losurdo G, Mileti A, Paolillo R, Giorgio F, Principi M, et al. The puzzle of coccoid forms of *Helicobacter pylori*: beyond basic science. *Antibiotics* (Basel). 2020;9(6):293. doi: 10.3390/antibiotics9060293.
11. Cover TL. Perspectives on methodology for in vitro culture of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter Species: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 11-5. doi: 10.1007/978-1-62703-005-2_3
12. Ndip RN, MacKay WG, Farthing MJG, Weaver LT. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003;36(5):616-22. doi: 10.1097/00005176-200305000-00005.
13. Reynolds DJ, Penn CW. Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. *Microbiology*. 1994;140 (Pt 10):2649-56. doi: 10.1099/00221287-140-10-2649.
14. Nedenskov P. Nutritional requirements for growth of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60(9):3450-3. doi: 10.1128/aem.60.9.3450-3453.1994.
15. Testerman TL, Conn PB, Mobley HLT, McGee DJ. Nutritional requirements and antibiotic resistance patterns of *Helicobacter* species in chemically defined Media. *J Clin Microbiol*. 2006;44(5):1650-8. doi: 10.1128/JCM.44.5.1650-1658.2006.
16. Senkovich O, Ceaser S, McGee DJ, Testerman TL. Unique host iron utilization mechanisms of *Helicobacter pylori* revealed with iron-deficient chemically defined Media. *Infect Immun*. 2010;78(5):1841-9. doi: 10.1128/IAI.01258-09.
17. Noto JM, Peek RM. *Helicobacter pylori*: An overview. En: Houghton J, editor. *Helicobacter Species: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012 p. 7-10. doi: 10.1007/978-1-62703-005-2_2
18. Pohl D, Keller PM, Bordier V, Wagner K. Review of current diagnostic methods and advances in *Helicobacter pylori* diagnostics in the era of next generation sequencing. *World J Gastroenterol*. 2019 28;25(32):4629-4660. doi: 10.3748/wjg.v25.i32.4629.

19. Tohumcu E, Kaitsas F, Bricca L, Ruggeri A, Gasbarrini A, Cammarota G, et al. *Helicobacter pylori* and the human gastrointestinal microbiota: A multifaceted relationship. *Antibiotics* (Basel). 2024;13(7):584. doi: 10.3390/antibiotics13070584.
20. Liao, EC., Yu, CH., Lai, JH. et al. A pilot study of non-invasive diagnostic tools to detect *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer disease. *Sci Rep* **13**, 22800 (2023). doi:10.1038/s41598-023-50266-2
21. P. Malfertheiner; The intriguing relationship of *Helicobacter pylori* infection and acid secretion in peptic ulcer disease and gastric cancer. *Dig Dis* 2011; 29 (5): 459–464. doi:10.1159/000332213
22. Alipour M. Molecular mechanism of *Helicobacter pylori* induced gastric cancer. *J Gastrointest Cancer*. 2021;52(1):23-30. doi: 10.1007/s12029-020-00518-5.
23. Smith SM, editor. *Helicobacter pylori: Methods and protocols*. Methods in molecular biology. Vol. 2283. New York: Humana; 2021. doi: 10.1007/978-1-0716-1302-3
24. Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol*. 1995;19 Suppl 1:S37-43.
25. 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*. 2001;345(11):784-9. doi: 10.1056/NEJMoa001999.
26. Ooki A, Yamaguchi K. The dawn of precision medicine in diffuse-type gastric cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2022;14:17588359221083049. doi: 10.1177/17588359221083049.
27. Zamani M, Ebrahimtabar F, Zamani V, Miller WH, Alizadeh-Navaei R, Shokri-Shirvani J, Derakhshan MH. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47(7):868-876. doi: 10.1111/apt.14561.
28. Kennemann L, Didelot X, Aebischer T, Kuhn S, Drescher B, Droege M, et al. *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(12):5033-8.
29. Khalifa MM, Sharaf RR, Aziz RK. *Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen? *Gut Pathog*. 2010;2(1):2. doi: 10.1186/1757-4749-2-2.
30. Rodriguez AM, Urrea DA, Prada CF. *Helicobacter pylori* virulence factors: relationship between genetic variability and phylogeographic origin. *PeerJ*. 2021;9:e12272. doi: 10.7717/peerj.12272.
31. Öztekin M, Yılmaz B, Ağagündüz D, Capasso R. Overview of *Helicobacter pylori* infection: Clinical features, treatment, and nutritional Aspects. *Diseases*. 2021;9(4):66. doi: 10.3390/diseases9040066.
32. Suzuki N, Yoneda M, Naito T, Iwamoto T, Masuo Y, Yamada K, Hisama K, Okada I, Hirofuji T. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the saliva of patients complaining of halitosis. *J Med Microbiol*. 2008 ;57(Pt 12):1553-1559. doi: 10.1099/jmm.0.2008/003715-0.
33. B Bürgers R, Schneider-Brachert W, Reischl U, Behr A, Hiller KA, Lehn N, Schmalz G, Ruhl S. *Helicobacter pylori* in human oral cavity and stomach. *Eur J Oral Sci*. 2008 ;116(4):297-304. doi: 10.1111/j.1600-0722.2008.00543.x.
34. Aksit Bıcak D, Akyuz S, Kıratlı B, Usta M, Urgancı N, Alev B, Yarat A, Sahin F. The investigation of *Helicobacter pylori* in the dental biofilm and saliva samples of children with dyspeptic complaints. *BMC Oral Health*. 2017;17(1):67. doi: 10.1186/s12903-017-0361-x
35. Padda J, Khalid K, Cooper AC, Jean-Charles G. Association between *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma. *Cureus*. 2021;13(5):e15165. doi: 10.7759/cureus.15165.
36. Gu H. Role of flagella in the pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Curr Microbiol*. 2017 ;74(7):863-869. doi: 10.1007/s00284-017-1256-4.
37. Asakura H, Churin Y, Bauer B, Boettcher JP, Bartfeld S, Hashii N, Kawasaki N, Mollenkopf HJ, Jungblut PR, Brinkmann V, Meyer TF. *Helicobacter pylori* HP0518 affects flagellin glycosylation to alter bacterial motility. *Mol Microbiol*. 2010;78(5):1130-44. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07393.x
38. Celli JP, Turner BS, Afdhal NH, Keates S, Ghiran I, Kelly CP, Ewoldt RH, McKinley GH, So P, Erramilli S, Bansil R. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(34):14321-6. doi: 10.1073/pnas.0903438106.

39. Celli JP, Turner BS, Afdhal NH, Ewoldt RH, McKinley GH, Bansil R, Erramilli S. Rheology of gastric mucin exhibits a pH-dependent sol-gel transition. *Biomacromolecules*. 2007;8(5):1580-6. doi: 10.1021/bm0609691.
40. Salimzadeh L, Bagheri N, Zamanzad B, Azadegan-Dehkordi F, Rahimian G, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Rafieian-Kopaei M, Sanei MH, Shirzad H. Frequency of virulence factors in *Helicobacter pylori* infected patients with gastritis. *Microb Pathog*. 2015;80:67-72. doi: 10.1016/j.micpath.2015.01.008.
41. Buti L, Spooner E, Van der Veen AG, Rappuoli R, Covacci A, Ploegh HL. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(22):9238-43. doi: 10.1073/pnas.1106200108
42. Alzahrani S, Lina TT, Gonzalez J, Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol*. 2014;20(36):12767-80. doi: 10.3748/wjg.v20.i36.12767.
43. Shirani M, Shariati S, Bazdar M, Sojoudi Ghamnak F, Moradi M, Shams Khozani R, Taki E, Arabsorkhi Z, Heidary M, Eskandari DB. The immunopathogenesis of *Helicobacter pylori* induced gastric cancer: a narrative review. *Front Microbiol*. 2024;15:1395403. doi: 10.3389/fmicb.2024.1395403.
44. Wroblewski LE, Peek RM Jr, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(4):713-39. doi: 10.1128/CMR.00011-10
45. Baj J, Forma A, Sitarz M, Portincasa P, Garruti G, Krasowska D, Maciejewski R. *Helicobacter pylori* virulence Factors. Mechanisms of bacterial pathogenicity in the gastric microenvironment. *Cells*. 2020;10(1):27. doi: 10.3390/cells10010027.
46. Matos JI, de Sousa HA, Marcos-Pinto R, Dinis-Ribeiro M. *Helicobacter pylori* CagA and VacA genotypes and gastric phenotype: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2013;25(12):1431-41. doi: 10.1097/MEG.0b013e328364b53e.
47. Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimura H. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology*. 2002;123(1):92-105. doi: 10.1053/gast.2002.34156.
48. Naito Y, Yoshikawa T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori* -induced inflammation and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(3):323-36. doi: 10.1016/s0891-5849(02)00868-7.
49. Sabbagh P, Mohammadnia-Afrouzi M, Javanian M, Babazadeh A, Koppolu V, Vasigala VR, Nouri HR, Ebrahimpour S. Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* infection: ideals, options, and limitations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(1):55-66. doi: 10.1007/s10096-018-3414-4.
50. <https://mothur.org> [Internet]. [citad 30 maig 2025]. MiSeq SOP. <https://mothur.org>
51. <https://mothur.org> [Internet]. [citad 30 maig 2025]. Silva reference files. <https://mothur.org>
52. Han X, Beck K, Bürgmann H, Frey B, Stierli B, Frossard A. Synthetic oligonucleotides as quantitative PCR standards for quantifying microbial genes. *Front Microbiol*. 2023; 24;14:1279041. doi: 10.3389/fmicb.2023.1279041.
53. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
54. Moore WE, Cato EP, Holdeman LV. Some current concepts in intestinal bacteriology. *Am J Clin Nutr*. 1978;31(10 Suppl):S33-42. doi: 10.1093/ajcn/31.10.S33.
55. Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M. Molecular approaches to studying microbial communities: Targeting the 16S ribosomal RNA gene. *J UOEH*. 2016;38(3):223-32. doi: 10.7888/juoeh.38.223.
56. Rodicio, M. & Mendoza, María. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, ISSN 0213-005X, Vol. 22, Nº. 4, 2004, pags. 238-245. 22. doi: 10.1157/13059055.

57. Dominguez-Bello MG, Godoy-Vitorino F, Knight R, Blaser MJ. Role of the microbiome in human development. *Gut*. 2019;68(6):1108-1114. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317503.
58. Chen Y, Zhou J, Wang L. Role and mechanism of gut microbiota in human disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:625913. doi: 10.3389/fcimb.2021.625913.
59. Gomma EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2020 ;113(12):2019-2040. doi: 10.1007/s10482-020-01474-7.
60. Delgado S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Suárez A, Mayo B. Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods. *Microb Ecol*. 2013;65(3):763-72. doi: 10.1007/s00248-013-0192-5.
61. Vasapolli R, Schütte K, Schulz C, Vital M, Schomburg D, Pieper DH, Vilchez-Vargas R, Malfertheiner P. Analysis of transcriptionally active bacteria throughout the gastrointestinal tract of healthy individuals. *Gastroenterology*. 2019;157(4):1081-1092.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2019.05.068.
62. Wang Z, Gao X, Zeng R, Wu Q, Sun H, Wu W, Zhang X, Sun G, Yan B, Wu L, Ren R, Guo M, Peng L, Yang Y. Changes of the gastric mucosal microbiome associated with histological stages of gastric carcinogenesis. *Front Microbiol*. 2020;11:997. doi: 10.3389/fmicb.2020.00997.
63. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, Perez-Perez G, Blaser MJ, Relman DA. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(3):732-7. doi: 10.1073/pnas.0506655103.
64. Sun QH, Zhang J, Shi YY, Zhang J, Fu WW, Ding SG. Microbiome changes in the gastric mucosa and gastric juice in different histological stages of *Helicobacter pylori*-negative gastric cancers. *World J Gastroenterol*. 2022; 28(3):365-380. doi: 10.3748/wjg.v28.i3.365.
65. Sohn SH, Kim N, Jo HJ, Kim J, Park JH, Nam RH, Seok YJ, Kim YR, Lee DH. Analysis of gastric body microbiota by pyrosequencing: possible role of bacteria other than *Helicobacter pylori* in the gastric carcinogenesis. *J Cancer Prev*. 2017;22(2):115-125. doi: 10.15430/JCP.2017.22.2.115.
66. Nasr R, Shamseddine A, Mukherji D, Nassar F, Temraz S. The Crosstalk between microbiome and immune response in gastric cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18):6586. doi: 10.3390/ijms21186586.
67. Jethwani P, Grover K. Gut microbiota in health and diseases - A Review. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2019;8(08):1586-99. doi:10.20546/ijcmas.2019.808.187
68. Cox AJ, West NP, Cripps AW. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3(3):207-15. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70134-2.
69. Zhang, S., Shi, D., Li, M., Li, Y., Wang, X., & Li, W. (2019). The relationship between gastric microbiota and gastric disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 54(4), 391–396. doi:10.1080/00365521.2019.1591499
70. Schmidt TSB, Raes J, Bork P. The Human gut microbiome: from association to modulation. *Cell*. 2018;172(6):1198-1215. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.044..
71. Li XX, Wong GL, To KF, Wong VW, Lai LH, Chow DK, Lau JY, Sung JJ, Ding C. Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use. *PLoS One*. 2009;4(11):e7985. doi: 10.1371/journal.pone.0007985
72. Vuik F, Dicksved J, Lam SY, Fuhler GM, van der Laan L, van de Winkel A, Konstantinov SR, Spaander M, Peppelenbosch MP, Engstrand L, Kuipers EJ. Composition of the mucosa-associated microbiota along the entire gastrointestinal tract of human individuals. *United European Gastroenterol J*. 2019;7(7):897-907. doi: 10.1177/2050640619852255
73. Llorca L, Pérez-Pérez G, Urruzuno P, Martínez MJ, Iizumi T, Gao Z, Sohn J, Chung J, Cox L, Simón-Soro A, Mira A, Alarcón T. Characterization of the Gastric Microbiota in a Pediatric Population According to *Helicobacter pylori* Status. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(2):173-178. doi: 10.1097/INF.0000000000001383.
74. Abreu MT, Peek RM Jr. Gastrointestinal malignancy and the microbiome. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1534-1546.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.001.
75. Ndegwa N, Ploner A, Andersson AF, Zagai U, Andreasson A, Vieth M, Talley NJ, Agreus L, Ye W. Gastric microbiota in a low-*Helicobacter pylori* prevalence general population and their

- associations with gastric lesions. *Clin Transl Gastroenterol*. 2020;11(7):e00191. doi: 10.14309/ctg.0000000000000191
76. Rajilic-Stojanovic M, Figueiredo C, Smet A, Hansen R, Kupcinkas J, Rokkas T, Andersen L, Machado JC, Ianiro G, Gasbarrini A, Leja M, Gisbert JP, Hold GL. Systematic review: gastric microbiota in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;51(6):582-602. doi: 10.1111/apt.15650.
 77. Schulz C, Schütte K, Koch N, Vilchez-Vargas R, Wos-Oxley ML, Oxley APA, Vital M, Malfertheiner P, Pieper DH. The active bacterial assemblages of the upper GI tract in individuals with and without *Helicobacter* infection. *Gut*. 2018;67(2):216-225. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312904.
 78. Waskito LA, Rezkitha YAA, Vilaichone RK, Sugihartono T, Mustika S, Dewa Nyoman Wibawa I, Yamaoka Y, Miftahussurur M. The role of non-*Helicobacter pylori* bacteria in the pathogenesis of gastroduodenal diseases. *Gut Pathog*. 2022;14(1):19. doi: 10.1186/s13099-022-00494-0.
 79. Sgamato C, Rocco A, Compare D, Priadko K, Romano M, Nardone G. Exploring the link between *Helicobacter pylori*, gastric microbiota and gastric cancer. *Antibiotics* (Basel). 2024;13(6):484. doi: 10.3390/antibiotics13060484
 80. Smet A, Kupcinkas J, Link A, Hold GL, Bornschein J. The Role of Microbiota in Gastrointestinal Cancer and Cancer Treatment: Chance or Curse? *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2022;13(3):857-874. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.08.013.
 81. Ansari S, Yamaoka Y. Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory. *Helicobacter*. 2017;22(4):10.1111/hel.12386. doi: 10.1111/hel.12386.
 82. Maldonado-Contreras A, Goldfarb KC, Godoy-Vitorino F, Karaoz U, Contreras M, Blaser MJ, Brodie EL, Dominguez-Bello MG. Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. *ISME J*. 2011;5(4):574-9. doi: 10.1038/ismej.2010.149.
 83. Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Bäckhed F, Nyrén P, Engstrand L. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One*. 2008;3(7):e2836. doi: 10.1371/journal.pone.0002836.
 84. Peek RM Jr, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC, Blaser MJ. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest*. 1995;73(6):760-70.
 85. Wan XK, Yuan SL, Tao HX, Diao LP, Wang YC, Cao C, Liu CJ. The Upregulation of TRAF1 induced by *Helicobacter pylori* plays an antiapoptotic effect on the infected cells. *Helicobacter*. 2016;21(6):554-564. doi: 10.1111/hel.12311.
 86. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res*. 1988 Jul 1;48(13):3554-60.
 87. Parsons BN, Ijaz UZ, D'Amore R, Burkitt MD, Eccles R, Lenzi L, Duckworth CA, Moore AR, Tiszlavicz L, Varro A, Hall N, Pritchard DM. Comparison of the human gastric microbiota in hypochlorhydric states arising as a result of *Helicobacter pylori* -induced atrophic gastritis, autoimmune atrophic gastritis and proton pump inhibitor use. *PLoS Pathog*. 2017;13(11):e1006653. doi: 10.1371/journal.ppat.1006653.
 88. Alarcón T, Llorca L, Perez-Perez G. Impact of the microbiota and gastric disease development by *Helicobacter pylori*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017;400:253-275. doi: 10.1007/978-3-319-50520-6_11
 89. Sharma BK, Santana IA, Wood EC, Walt RP, Pereira M, Noone P, Smith PL, Walters CL, Pounder RE. Intra-gastric bacterial activity and nitrosation before, during, and after treatment with omeprazole. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984;289(6447):717-9. doi: 10.1136/bmj.289.6447.717.
 90. Calmels S, Ohshima H, Henry Y, Bartsch H. Characterization of bacterial cytochrome cd(1)-nitrite reductase as one enzyme responsible for catalysis of nitrosation of secondary amines. *Carcinogenesis*. 1996;17(3):533-6. doi: 10.1093/carcin/17.3.533.
 91. Sohn SH, Kim N, Jo HJ, Kim J, Park JH, Nam RH, Seok YJ, Kim YR, Lee DH. Analysis of gastric body microbiota by pyrosequencing: possible role of bacteria other than *Helicobacter pylori* in the gastric carcinogenesis. *J Cancer Prev*. 2017;22(2):115-125. doi: 10.15430/JCP.2017.22.2.115.
 92. Ferreira RM, Pereira-Marques J, Pinto-Ribeiro I, Costa JL, Carneiro F, Machado JC, Figueiredo C. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut*. 2018;67(2):226-236. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314205.

93. Muto M, Hitomi Y, Ohtsu A, Shimada H, Kashiwase Y, Sasaki H, Yoshida S, Esumi H. Acetaldehyde production by non-pathogenic *Neisseria* in human oral microflora: implications for carcinogenesis in upper aerodigestive tract. *Int J Cancer*. 2000;88(3):342-50.
94. Khosravi Y, Dieye Y, Loke MF, Goh KL, Vadivelu J. *Streptococcus mitis* induces conversion of *Helicobacter pylori* to coccoid cells during co-culture in vitro. *PLoS One*. 2014;9(11):e112214. doi: 10.1371/journal.pone.0112214.
95. Wing-Yee Chan, Pak-Kwan Hui, Kai-Man Leung, John Chow, Francis Kwok, Chi-Sing Ng, Coccoid Forms of *Helicobacter pylori* in the Human Stomach, *Am J Clin Pathol.*, Volume 102, Issue 4, 1994, Pages 503–507. doi:10.1093/ajcp/102.4.503
96. Zhang S, Shi D, Li M, Li Y, Wang X, Li W. The relationship between gastric microbiota and gastric disease. *Scand J Gastroenterol*. 2019;54(4):391-396. doi: 10.1080/00365521.2019.1591499.
97. Hansson LE, Engstrand L, Nyrén O, Evans DJ Jr, Lindgren A, Bergström R, Andersson B, Athlin L, Bendtsen O, Tracz P. *Helicobacter pylori* infection: independent risk indicator of gastric adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 1993;105(4):1098-103. doi: 10.1016/0016-5085(93)90954-b
98. Ekström AM, Held M, Hansson LE, Engstrand L, Nyrén O. *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology*. 2001;121(4):784-91. doi: 10.1053/gast.2001.27999.
99. Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology*. 2003;125(6):1636-44. doi: 10.1053/j.gastro.2003.08.033.
100. Imai S, Ooki T, Murata-Kamiya N, Komura D, Tahmina K, Wu W, Takahashi-Kanemitsu A, Knight CT, Kunita A, Suzuki N, Del Valle AA, Tsuboi M, Hata M, Hayakawa Y, Ohnishi N, Ueda K, Fukayama M, Ushiku T, Ishikawa S, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA elicits BRCAness to induce genome instability that may underlie bacterial gastric carcinogenesis. *Cell Host Microbe*. 2021;29(6):941-958.e10. doi: 10.1016/j.chom.2021.04.006
101. Yong X, Tang B, Li BS, Xie R, Hu CJ, Luo G, Qin Y, Dong H, Yang SM. *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways. *Cell Commun Signal*. 2015;13:30. doi: 10.1186/s12964-015-0111-0.
102. Szabó I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J*. 1999;18(20):5517-27. doi: 10.1093/emboj/18.20.5517
103. Abdullah M, Greenfield LK, Bronte-Tinkew D, Capurro MI, Rizzuti D, Jones NL. VacA promotes CagA accumulation in gastric epithelial cells during *Helicobacter pylori* infection. *Sci Rep*. 2019;9(1):38. doi: 10.1038/s41598-018-37095-4
104. Amieva M, Peek RM Jr. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer. *Gastroenterology*. 2016;150(1):64-78. doi: 10.1053/j.gastro.2015.09.004.
105. Chen HN, Wang Z, Li X, Zhou ZG. *Helicobacter pylori* eradication cannot reduce the risk of gastric cancer in patients with intestinal metaplasia and dysplasia: evidence from a meta-analysis. *Gastric Cancer*. 2016 ;19(1):166-75. doi: 10.1007/s10120-015-0462-7
106. Aviles-Jimenez F, Vazquez-Jimenez F, Medrano-Guzman R, Mantilla A, Torres J. Stomach microbiota composition varies between patients with non-atrophic gastritis and patients with intestinal type of gastric cancer. *Sci Rep*. 2014 ;4:4202. doi: 10.1038/srep04202.
107. Eun CS, Kim BK, Han DS, Kim SY, Kim KM, Choi BY, Song KS, Kim YS, Kim JF. Differences in gastric mucosal microbiota profiling in patients with chronic gastritis, intestinal metaplasia, and gastric cancer using pyrosequencing methods. *Helicobacter*. 2014;19(6):407-16. doi: 10.1111/hel.12145.
108. Hsieh YY, Tung SY, Pan HY, Yen CW, Xu HW, Lin YJ, Deng YF, Hsu WT, Wu CS, Li C. Increased abundance of *Clostridium* and *Fusobacterium* in gastric microbiota of patients with gastric cancer in Taiwan. *Sci Rep*. 2018;8(1):158. doi: 10.1038/s41598-017-18596-0.
109. Castaño-Rodríguez N, Goh KL, Fock KM, Mitchell HM, Kaakoush NO. Dysbiosis of the microbiome in gastric carcinogenesis. *Sci Rep*. 2017;7(1):15957. doi: 10.1038/s41598-017-16289-2.

110. Wang L, Zhou J, Xin Y, Geng C, Tian Z, Yu X, Dong Q. Bacterial overgrowth and diversification of microbiota in gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2016;28(3):261-6. doi: 10.1097/MEG.0000000000000542.
111. Gantuya B, El Serag HB, Matsumoto T, Ajami NJ, Uchida T, Oyuntsetseg K, Bolor D, Yamaoka Y. Gastric mucosal microbiota in a Mongolian population with gastric cancer and precursor conditions. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;51(8):770-780. doi: 10.1111/apt.15675.
112. Vinasco K, Mitchell HM, Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N. Microbial carcinogenesis: Lactic acid bacteria in gastric cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019;1872(2):188309. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.07.004.
113. Whiteside SA, Mohiuddin MM, Shlimon S, Chahal J, MacPherson CW, Jass J, Tompkins TA, Creuzenet C. In vitro framework to assess the anti-*Helicobacter pylori* potential of lactic acid bacteria secretions as alternatives to antibiotics. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5650. doi: 10.3390/ijms22115650.
114. Coker OO, Dai Z, Nie Y, Zhao G, Cao L, Nakatsu G, Wu WK, Wong SH, Chen Z, Sung JJY, Yu J. Mucosal microbiome dysbiosis in gastric carcinogenesis. *Gut*. 2018;67(6):1024-1032. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314281.
115. Yu G, Torres J, Hu N, Medrano-Guzman R, Herrera-Goepfert R, Humphrys MS, Wang L, Wang C, Ding T, Ravel J, Taylor PR, Abnet CC, Goldstein AM. Molecular characterization of the human stomach microbiota in gastric cancer patients. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:302. doi: 10.3389/fcimb.2017.00302.
116. Chen XH, Wang A, Chu AN, Gong YH, Yuan Y. Mucosa-associated microbiota in gastric cancer tissues compared with non-cancer tissues. *Front Microbiol*. 2019;10:1261. doi: 10.3389/fmicb.2019.01261.
117. Liu X, Shao L, Liu X, Ji F, Mei Y, Cheng Y, Liu F, Yan C, Li L, Ling Z. Alterations of gastric mucosal microbiota across different stomach microhabitats in a cohort of 276 patients with gastric cancer. *EBioMedicine*. 2019;40:336-348. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.12.034
118. Li Y, Choi H, Leung K, Jiang F, Graham DY, Leung WK. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection between 1980 and 2022: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2023;8(6):553-564. doi: 10.1016/S2468-1253(23)00070-5.
119. Ford AC, Yuan Y, Moayyedi P. Long-Term Impact of *Helicobacter pylori* Eradication Therapy on Gastric Cancer Incidence and Mortality in Healthy Infected Individuals: A Meta-Analysis Beyond 10 Years of Follow-Up. *Gastroenterology*. 2022;163(3):754-756.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2022.05.027.
120. Fayet O, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C. The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol*. 1989;171(3):1379-85. doi: 10.1128/jb.171.3.1379-1385.1989.
121. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel)*. 2018;18(4):1271. doi: 10.3390/s18041271.
122. Ramírez-Lázaro MJ, Lario S, Quílez ME, Montserrat A, Bella MR, Junquera F, García-Martínez L, Casalots À, Parra T, Calvet X. Droplet digital PCR detects low-density infection in a significant proportion of *Helicobacter pylori*-negative gastric biopsies of dyspeptic patients. *Clin Transl Gastroenterol*. 2020;11(6):e00184. doi: 10.14309/ctg.0000000000000184

Annex

Taula annexa 1. Comparativa dels mètodes diagnòstics més freqüentment utilitzats en la pràctica clínica per el diagnòstic de la infecció per *Helicobacter pylori*.

Mètode	Tipus	Mecanisme de detecció	Sensitivitat	Especificitat	Avantatges	Disadvantages / Notes
Test de l'urea en l'alè	No invasiu	Detecta la ureasa bacteriana que converteix la urea a CO ₂	≈95.9%	≈95.7%	Segura, precisa, mostres d'alè fàcilment obtingudes. Marcadors d'erradicació.	Interferència en els resultats per processos gastrointestinals, ús d'antibiòtics, inhibidors de la bomba de protons.
Antígens en femta	No invasiu	Detecta l'antigen d' <i>H. pylori</i> en femtes via immunoassaig enzimàtic	≈94%	≈97%	Simple, ràpid, barat; marcadors d'erradicació	Preparació i conservació de les mostres complicada. Interferència en els resultats per processos gastrointestinals, ús d'antibiòtics, inhibidors de la bomba de protons.
Serologia (IgG ELISA)	No invasiu	Detecta anticòsos anti- <i>H. pylori</i> en sèrum/urina/saliva	76–84%	79–90%	Àmpliament disponible, barat.	No permet la distinció entre infecció activa i prèvia, els anticòsos persisteixen posttractament.
Endoscòpia + Biòpsia	Invasiu	Inspecció visual; obtenció de teixit per a proves posteriors	No especificat	No especificat	Presa de contacte amb la mucosa	Procés llarg; requereix personal qualificat
Test ràpid de l'Ureasa	Invasiu	El canvi de pH indica la presència d'urea en mostres de biòpsies. Hi ha canvi colorimètric.	>90%	>90%	Barat, simple	Falsos positius a causa de bacteris productors d'ureasa diferents d' <i>H. pylori</i> : falsos negatius per ús d'inhibidors de la bomba de protons, antibiòtics, hemorràgies, aclorhídria.
Histologia	Invasiu	Tinció d'hematoxilina-eosina. Giemsa de biòpsies.	80–95%	99–100%	Avaluació detallada de la gastritis	Costós; necessita múltiples biòpsies; habilitats especials de manipulació.
Cultius	Invasiu	Creixement d' <i>H. pylori</i> a partir de biòpsies en medis selectius	70–80%	≈100%	Permet confirmar la infecció; permet provar la susceptibilitat antibiòtica	Procés lent; car; complex; requereix condicions microaeròfiles i laboratori adaptat
PCR	Invasiu/No invasiu	Amplificació de gens d' <i>H. pylori</i> (per exemple: <i>vacA</i> , <i>cagA</i> , 16S rDNA)	>95%	>95%	Altament sensible/específica; detecta mutacions de resistència	Costós; requereix experiència tècnica; pot detectar ADN de bacteris morts