

# CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA Y GASTROPROTECTORA DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* CIDCA 8339 Y SU LECHE FERMENTADA

A. A. Bengoa<sup>1</sup>; A.J. Errea<sup>2</sup>; M.Rumbo<sup>2</sup>; A. G. Abraham<sup>1,3</sup>; G. L. Garrote<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA, UNLP-CONICET-CIC. PBA).

La Plata, Argentina.

<sup>2</sup>Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisopatológicos (IIFP, UNLP-CONICET). La Plata, Argentina.

<sup>3</sup>Área Bioquímica y Control de Alimentos - Facultad de Ciencias Exactas - UNLP. La Plata, Argentina.

## RESUMEN

La gastritis constituye un importante problema de salud a nivel mundial que puede derivar a complicaciones severas como úlceras y cáncer. Actualmente, el tratamiento de las úlceras gástricas (inhibidores de la bomba de protones y antibióticos) está asociado a diversos efectos adversos tales como diarrea y náuseas. En este contexto, el uso de leches fermentadas con microorganismos probióticos surge como una posible alternativa para prevenir y aliviar los síntomas asociados a la inflamación gástrica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la cepa *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 aislada de kefir y su leche fermentada en cuanto a su capacidad antiinflamatoria y protectora de la mucosa gástrica.

*L. paracasei* CIDCA 8339, productor de exopolisacárido (EPS), se cultivó en caldo MRS (24h, 30°C). Se evaluó su capacidad de adhesión a células de epitelio gástrico AGS. A partir de la leche fermentada con la cepa (5%v/v, 24h a 30°C) se obtuvo la fracción no microbiana (FNM) (centrifugación 5min a 6000rpm, filtración 0,45µm y neutralización con NaOH) y se evaluó la capacidad moduladora de la respuesta inmune innata inducida con flagelina (0,5 µg/ml) en células AGS mediante determinación de IL-8 por ELISA. En el mismo sistema se estudió el efecto de los metabolitos presentes en la FNM incluyendo EPS (200 y 800mg/L), lactato y acetato. Se estudió la modulación de la vía NF-κB mediante transfección transiente de las células AGS

Trabajo ganador del Premio Publitec en el área Funcionalidad durante el V Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos -CAMA 2019- desarrollado en Buenos Aires del 25 al 27 de septiembre de 2019.

con el gen reportero luciferasa de luciérnaga bajo el dominio de un promotor inducible con NF-κB. Para evaluar el efecto gastroprotector en ratones Balb-c, se administró ad libitum durante tres días una suspensión de *L. paracasei* CIDCA 8339 (2.109 UFC/ml). Luego, se les administró por gavage 200µl de etanol 60% + 0,15M HCl para inducir la gastritis y al cabo de 2hs se sacrificaron y se evaluó el daño gástrico en cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina. *L. paracasei* CIDCA 8339 fue capaz de adherirse a células AGS (10<sup>6</sup> de 10<sup>8</sup> UFC/ml iniciales). La FNM de la leche fermentada redujo la expresión de IL-8 en un 70%, similar a lo observado con el sobrenadante de una leche acidificada conteniendo lactato 100mM y acetato 12mM. Las soluciones acuosas de lactato y acetato modularon la expresión de IL-8 de manera dosis dependiente, la cual no se observó con el EPS. La presencia de la FNM y lactato 100mM en células transfectadas redujo la expresión de la luciferasa indicando inhibición de la vía NF-κB. El consumo de *L. paracasei* CIDCA 8339 en ratones logró reducir el daño inducido a nivel gástrico en comparación con el grupo control (agua).

La leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 presentó buenas propiedades antiinflamatorias y protectoras a nivel gástrico que pueden ser atribuidas en parte a la bacteria y en parte al ácido láctico producido in situ en el estómago o durante la fermentación de la leche, siendo una alternativa para reducir el daño y aliviar la sintomatología en pacientes que sufren gastritis.

## INTRODUCCIÓN

La gastritis, definida como cualquier estado inflamatorio de la mucosa gástrica (Hunt *et al.*, 2015; Rugge *et al.*, 2011), es un desorden gastrointestinal con una alta incidencia que constituye un importante problema de

salud a nivel mundial y que puede derivar en complicaciones más severas como formación de úlceras y cáncer. Esta patología se origina como consecuencia de un desbalance entre factores protectores (flujo sanguíneo, integridad de la barrera epitelial y secreción de mucus) y factores agresivos (producción de ROS, secreción de HCl y pepsina) a nivel de la mucosa gástrica (Hunt *et al.*, 2015). Existen una gran variedad de agentes nocivos que pueden ser responsables de este desbalance, tales como el consumo excesivo de alcohol y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), el tabaco, el estrés y la infección con *Helicobacter pylori* (Kempenich y Sirinek, 2018; Marcial *et al.*, 2013) siendo esta última la principal causa de gastritis en todo el mundo. En la infección con *H. pylori* se activa una respuesta inflamatoria que no logra erradicar al microorganismo. En consecuencia, si la infección no se trata adecuadamente, el microorganismo persiste de por vida generando un estado inflamatorio continuo (Hunt *et al.*, 2015).

Actualmente, la estrategia terapéutica incluye el uso de inhibidores de la bomba de protones y drogas antsecretoras (antagonistas del receptor de histamina tipo 2) para reducir la producción de HCl a nivel gástrico y el uso de antibióticos en caso de infección con *H. pylori*. A pesar de ser efectiva, los largos tratamientos con estas drogas están asociados a diversos efectos adversos (diarrea, náuseas y distensión abdominal) y a una alta recurrencia de las úlceras gástricas (Kempenich and Sirinek, 2018; Khoder *et al.*, 2016; Patel *et al.*, 2014). Como consecuencia, en los últimos años ha aumentado el interés en el desarrollo de estrategias alternativas o complementarias para aliviar los síntomas y/o reducir el daño de la mucosa asociado a la gastritis y las úlceras gástricas. Teniendo en cuenta esto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antiinflamatoria y protectora de la mucosa gástrica de la cepa potencialmente probiótica *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 y su leche fermentada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos utilizados y condiciones de cultivo

La cepa productora de exopolisacárido (EPS) *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 aislada de kefir fue cultivada en caldo MRS (Difco, USA) en aerobiosis a 30°C durante 24h.

### Obtención de la leche fermentada y su fracción no microbiana

Se inocularon 10 ml de leche parcialmente descremada UHT (La Serenísima) con 500µl (5%v/v) de un cultivo del lactobacilo y se incubó durante 24h a 30°C. La fracción no microbiana (FNM) de la leche fermentada se obtuvo mediante centrifugación durante 5 min a 6000 r.p.m. El sobrenadante fue neutralizado con NaOH 5M, centrifugado y filtrado a través de una membrana de 0,45 µm (Millipore Corporation, USA) en condiciones de esterilidad.

### Ensayo de adhesión a células AGS

Se emplearon células AGS tumorales humanas de epitelio gástrico (ATCC CRL 1739) provenientes de un adenocarcinoma de estómago. La capacidad de adhesión del lactobacilo a células AGS se estudió antes y después del tratamiento con una solución gástrica simulada (NaCl 125mM, KCl 7mM, NaHCO<sub>3</sub> 45mM, pepsina 3g/l, pH final ajustado 2.5) durante 1,5h. Se agregaron 500 µl/fosa de una suspensión bacteriana DO590=0,5en DMEM (Gibco, USA) y se incubaron durante 1h a 37°C con atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub>). A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS estéril para eliminar aquellas bacterias que no estuvieran adheridas y se lisaron agregando 500µl de agua bidestilada estéril. Luego de incubar 1h a 37°C con atmósfera controlada se determinó la cantidad de bacterias adheridas mediante recuento de colonias por el método de la gota en MRS agar (DIFCO, USA).



**fid**  
INTERNATIONAL  
Representantes oficiales  
de Danisco-Dupont



### SOLUCIONES E INGREDIENTES PARA LA INDUSTRIA LÁCTEA

- Antimicrobianos
- Carrageninas
- Emulsionantes & Estabilizantes
- Cultivos & Hongos
- Gomas & Sistemas
- Pectinas
- Edulcorantes
- Enzimas

[www.fidsrl.com](http://www.fidsrl.com) / Tel.: (54 11) 4709-3719 / [info@fidsrl.com](mailto:info@fidsrl.com)

### Ensayos de modulación de la respuesta inmune innata en células AGS

Se estudió el efecto modulador de la FNM de la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 (neutralizadas y diluidas a la mitad en DMEM) y de una leche acidificada artificialmente (LAA) con ácido láctico (100mM) y acético (12mM) sobre la respuesta inmune innata en células AGS. Se estudió también el efecto de los metabolitos producidos durante la fermentación: soluciones de ácidos orgánicos (neutralizados con NaOH y esterilizados por filtración) y soluciones EPS 200mg/L y 800mg/L (esterilizadas en autoclave y diluidas en DMEM). Las células fueron pre-incubadas con la muestra a ensayar 30 min (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), estimuladas con Flagelina (FlIC) 0,5µg/ml y posteriormente incubadas a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 16h. En todos los ensayos se incluyó una condición basal sin ningún tratamiento (DMEM) como control sin estimulación y un control estimulado con FlIC para definir una inducción del 100% de la respuesta proinflamatoria (DMEM+FlIC). La respuesta inmune innata se definió mediante la determinación de los niveles de IL-8 en los sobrenadantes de las células utilizando un kit ELISA para IL-8 humano (BD-Bioscience Opt EIATM, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Modulación de la vía de señalización mediada por NF-κB

Se realizó una transfección transiente de las células AGS con el gen reportero luciferasa de luciérnaga bajo el dominio del promotor 3kB, un promotor artificial que posee tres sitios de unión a NF-κB en tándem. Las células fueron transfectadas en simultáneo con una segunda construcción que consiste en el gen reportero luciferasa de *Renilla* spp. bajo el dominio del promotor constitutivo Timidina quinasa de Herpesvirus (HSV-Tk), utilizado como normalizador. Por fosa, se adicionaron 0,5µl de lipofectamina con 300ng de ADN (280ng 3kB-luc + 20ng TK-Renilla). Luego de una incubación durante 16h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), se retiró el medio con la mezcla de transfección y se adicionó medio DMEM completo. Sobre las células transfectadas se realizó el ensayo de modulación (descrito en el punto "Ensayos de modulación de la respuesta inmune innata en células AGS") para evaluar el efecto de la FNM de la leche fermentada y una solución de lactato 100mM. Las células fueron lisadas con 65µl de buffer de lisis y se midió la luminiscencia según el protocolo del kit comercial Dual System Luciferase Assay (Promega, USA).

### Modelo murino de gastritis

Se trabajó con ratones machos Balb-c pertenecientes a la categoría SPF (libre de patógenos específicos), de siete semanas de edad. Se realizaron dos ensayos independientes con cinco animales por grupo. El Grupo Control y Grupo Gastritis consumieron agua ad libitum a lo largo del ensayo. El Grupo Lp 8339 recibió una suspensión de *L. paracasei* CIDCA 8339 (2,2.10<sup>9</sup> UFC/ml) que fue administrada ad libitum en el agua de bebida durante tres días consecutivos. Al cuarto día, los ratones ayunados durante 5h recibieron una inoculación intragástrica de 200µl de etanol 60% y 2h más tarde un segundo gavage de HCl 0,15M para inducir la gastritis. En el caso del Grupo Control se realizaron dos gavages de PBS. Dos horas después del segundo gavage los ratones fueron sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub> y se realizó la disección para remover el estómago, que se fijó en formaldehído al 10%. Para el análisis de daño, los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina y eosina y evaluados a doble ciego al microscopio óptico. Para cuantificar el daño, se diseñó un score teniendo en cuenta las alteraciones a nivel de la mucosa y submucosa de acuerdo a Liu *et al.* (2016).

### Análisis estadístico

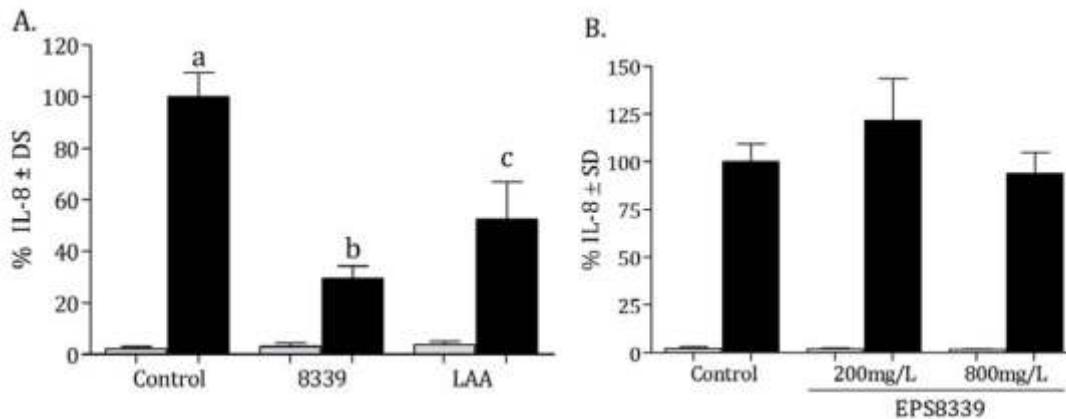
El análisis de datos se realizó utilizando el software Graph Pad Prism versión 5.01 (GraphPad®, USA). Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (DE). Para la comparación de medias, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido del Test de Tukey. Se consideraron diferencias significativas aquellas con un p<0,05.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*L. paracasei* CIDCA 8339 fue capaz de adherirse a células de epitelio gástrico AGS observándose que de 5.10<sup>7</sup> UFC que fueron adicionadas por fosa, 7.75.10<sup>5</sup> UFC se adherían a las células epiteliales, sin observarse diferencias significativas luego del tratamiento de la cepa con solución gástrica.

Se observó que la FNM de la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 fue capaz de modular significativamente la respuesta inmune innata inducida con FlIC reduciendo la expresión de IL-8 un 70% con respecto al control. La LAA que tiene concentraciones de ácido láctico y acético similares a FNM8339 dio lugar a una modulación de la expresión de IL-8, pero sólo en un 50% (Figura 1.A). Estos resultados sugieren que si bien los ácidos orgánicos son importantes meta-

**FIGURA 1** - Capacidad moduladora de la respuesta inmune innata en células AGS. A. FNM de la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 y sobrenadante de leche acidificada con ácido láctico y acético (LAA). B. Soluciones EPS aislado de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339.



Barras grises indican condición basal y barras negras condición estimulada con FliC. Los resultados se expresan como media±DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

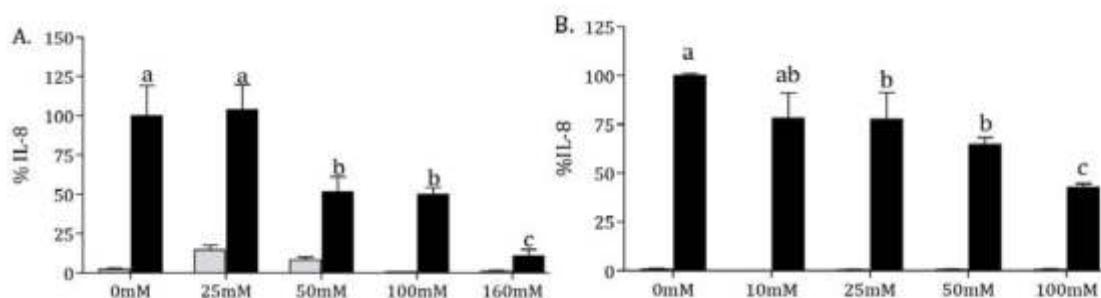
bolitos bioactivos, existen otros productos de fermentación de la leche, tales como EPS o péptidos, que también estarían contribuyendo al efecto. Al evaluar la capacidad moduladora del EPS aislado de la leche fermentada se pudo observar que el mismo no ejerce un efecto inmunomodulador incluso en concentraciones mayores a las producidas por la bacteria en la leche fermentada (Figura 1.B).

Teniendo en cuenta el posible efecto de los ácidos orgánicos presentes en la leche, se evaluó el efecto dosis-respuesta de soluciones de ácido láctico y acético neutralizadas sobre células AGS. Se observó que tanto el lactato como el acetato ejercen un efecto inmunomodulador dosis dependiente. Si se compara el efecto de una solución de lactato o acetato 100mM se puede observar que ambas reducen la expresión de IL-8 en un 50%, es decir que el efecto ejercido por ambos ácidos es equivalente. De esa manera, es posible atribuir el efecto modulador de la FNM de la leche fermentada a la presencia de ambos metabolitos. Sin embargo, dado que en la FNM la concentración de lactato es de 100mM y la de acetato 12mM podría decirse que el primero es el principal metabolito bioactivo responsable del efecto.

Para evaluar si el mecanismo de acción de la FNM 8339, y en particular el lactato, está mediado por la inhibición de la vía  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , se realizó una transfección transiente de las células AGS con el gen reportero luciferasa de luciérnaga bajo el dominio del promotor 3kB. Se evidenció que el tratamiento de las células transfectadas con FliC, un agonista TLR5, da lugar a un aumento significativo de la expresión de la luciferasa de luciérnaga, lo que indica una activación de la vía  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . La preincubación de las células con la FNM 8339 conduce a una reducción de la luciferasa llevándola a niveles comparables con la condición basal, es decir que la

Para evaluar si el mecanismo de acción de la FNM 8339, y en particular el lactato, está mediado por la inhibición de la vía  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , se realizó una transfección transiente de las células AGS con el gen reportero luciferasa de luciérnaga bajo el dominio del promotor 3kB. Se evidenció que el tratamiento de las células transfectadas con FliC, un agonista TLR5, da lugar a un aumento significativo de la expresión de la luciferasa de luciérnaga, lo que indica una activación de la vía  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . La preincubación de las células con la FNM 8339 conduce a una reducción de la luciferasa llevándola a niveles comparables con la condición basal, es decir que la

**FIGURA 2** - Efecto modulador de soluciones de lactato (A) y acetato (B) sobre la expresión de IL-8 inducida con FliC en células AGS



Barras grises: condición basal. Barras negras: estimulada. Los resultados se expresan como media±DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

**TABLA 1** - Valores de luminiscencia relativos (Lnluc/Rluc) en células AGS transfectadas preincubadas con la fracción no microbiana de la leche fermentada 8339 o lactato 100mM y estimuladas con flagelina

Muestra	Basal	FliC (0,5µg/ml)
DMEM (Control)	39,75±12,6 <sup>a,c</sup>	100±3,34 <sup>b</sup>
FNM 8339	32,02±9,31 <sup>a</sup>	64,75±12,1 <sup>a,c</sup>
Lactato 100mM	24,09±7,93 <sup>a,c</sup>	47,11±5,15 <sup>c</sup>

Los resultados se expresan como media±DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

FNM 8339 es capaz de inhibir la activación de la vía del NFκB inducida con FliC. Esta inhibición de NFκB conduce a la modulación de la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias, tales como IL-8. Resultados similares se obtuvieron cuando las células fueron preincubadas con una solución de lactato 100mM, indicando su rol protagónico que en la inmunomodulación (Tabla 1).

Teniendo en cuenta el potencial antiinflamatorio a nivel gástrico de la leche fermentada con la cepa CIDCA 8339, se procedió a evaluar el efecto gastroprotector de la cepa en un modelo murino de gastritis aguda inducido con Etanol 60% y HCl 0,15M. Los ratones consumieron diariamente en promedio 5ml de suspensión de *L. paracasei* CIDCA 8339 de  $2,2 \cdot 10^9$  UFC/ml, lo que significaría una dosis diaria de probiótico de aproximadamente  $1 \cdot 10^{10}$  UFC/ratón.

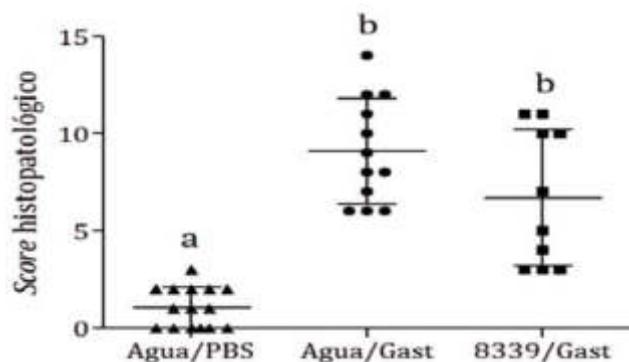
Como se puede observar en la Figura 3, el tratamiento con Etanol 60%+HCl 0,15mM dio lugar a un score de daño de  $9,08 \pm 2,712$ , significativamente mayor al obtenido en el grupo Control ( $1,07 \pm 1,033$ ). El consumo de *L. paracasei* CIDCA 8339 ( $6,70 \pm 3,50$ ) previo a la inducción de gastritis redujo significativamente el score histopatológico

del grupo. Sin embargo, si se observan los valores de score individuales para cada ratón es posible apreciar que el 50% de los animales que consumieron *L. paracasei* CIDCA 8339 presentaron alteraciones histopatológicas muy leves con scores de daño menores a la media del grupo Gastritis y cercanos al score del grupo Control. Por lo que, a pesar de la dispersión obtenida para los individuos dentro del grupo debido a la variabilidad biológica existente y de respuesta frente al tratamiento, podría atribuirse a *L. paracasei* CIDCA 8339 un efecto gastroprotector evidenciado en el 50% de la población.

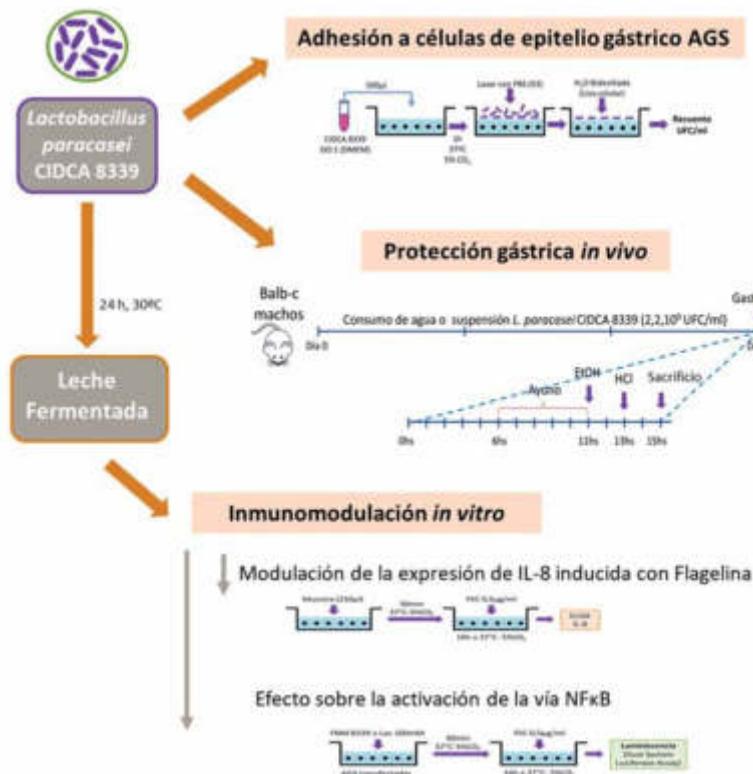
Se ha demostrado previamente que *L. paracasei* CIDCA 8339 es una cepa segura para el consumo, con buena tolerancia a las condiciones gastrointestinales y buena capacidad de adherirse a células de epitelio intestinal. En el presente trabajo se demostró también que la misma tiene capacidad de adherir a células de epitelio gástrico. La capacidad de adherirse a células epiteliales gástricas e intestinales es una característica deseada en bacterias probióticas, ya que le permite un mayor tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal, ejerciendo su acción benéfica in situ durante un periodo más prologado. Además, esta cepa es capaz de crecer en leche produciendo ácidos orgánicos y EPS y sobrevivir en la leche fermentada a 4°C durante más de seis meses, lo que resulta atractivo para la industria ya que garantiza una adecuada cantidad de probiótico viable durante el almacenamiento del producto.

En la búsqueda de nuevos probióticos es importante demostrar el efecto benéfico asociado al consumo del mismo y del alimento que lo contiene. Uno de los efectos beneficiosos sobre la salud que se le atribuyen a los probióticos es su capacidad de modular la respuesta inmune del hospedador, ya sea estimulándola para mejorar las defensas frente patógenos o regulándola en condiciones patológicas de inflamación exacerbada. En este contexto, se pudo demostrar que la FNM de la leche fermentada con *L.*

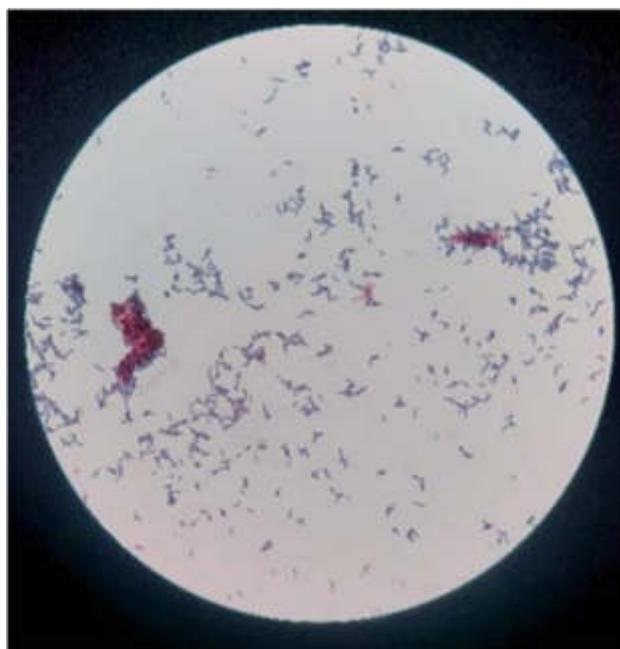
**FIGURA 3** - Efecto del consumo de *L. paracasei* CIDCA 8339 en un modelo murino de gastritis inducida con Etanol 60%/HCl 0,15M. Score histopatológico de daño gástrico



Los resultados se expresan como media±DE.  
Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )



*paracasei* CIDCA 8339 presenta capacidad de modular la expresión IL-8 al inhibir la víaNFκB, efecto atribuido principalmente al lactato. La citoquina IL-8, un potente quimioatrayente y activador de neutrófilos, es secretado por las células epiteliales gástricas durante la infección con *H. pylori* (Suzuki *et al.*, 1998). De hecho, la activación de la vía NFκB y el aumento de la expresión de IL-8 en células de epitelio gástrico es uno de los mecanismos claves mediante el cual *H. pylori* induce una inflamación crónica y favorece el desarrollo de cán-



cer (Yamada *et al.*, 2013). Por este motivo, la modulación de la expresión de IL-8 es una de las estrategias más buscadas para reducir la inflamación crónica asociada a *H. pylori*, siendo las leches fermentadas con bacterias lácticas una posible alternativa debido al efecto modulador ejercido por el lactato. Más aún, la cepa *L. paracasei* protegió la mucosa gástrica de ratones frente a la gastritis inducida con etanol/HCl.

### CONCLUSIÓN

La leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 presentó buenas propiedades antiinflamatorias in vitro. Además, el consumo de la cepa ejerció un efecto protector de la mucosa gástrica in vivo que podría deberse a la presencia del probiótico y/o al ácido láctico producido in situ en el estómago. De esa manera, *L. paracasei* CIDCA 8339 constituye una cepa con buenas propiedades probióticas para el desarrollo leches fermentadas funcionales para reducir la inflamación y aliviar la sintomatología en pacientes que sufren gastritis.

### BIBLIOGRAFÍA

- Hunt, R H, Camilleri, M., Crowe, S.E., El-Omar, E.M., Fox, J.G., Kuipers, E.J., Malfertheiner, P., Mccoll, K.E.L., Pritchard, D.M., Rugge, M., Sonnenberg, A., Sugano, K., Tack, J., Hunt, Richard H, 2015. The stomach in health and disease. *Gut* 64, 1650–1668.
- Kempenich, J.W., Sirinek, K.R., 2018. Acid Peptic Disease. *Surg. Clin. North Am.* 98, 933–944.
- Khoder, G., Al-Menhali, A.A., Al-Yassir, F., Karam, S.M., 2016. Potential role of probiotics in the management of gastric ulcer (Review). *Exp. Ther. Med.* 12, 3–17
- Liu, J., Wang, F., Luo, H., Liu, A., Li, K., Li, C., Jiang, Y., 2016. Protective effect of butyrate against ethanol-induced gastric ulcers in mice by promoting the anti-inflammatory, anti-oxidant and mucosal defense mechanisms. *Int. Immunopharmacol.* 30, 179–187
- Marcial, G., Messing, J., Menchicchi, B., Goycoolea, F.M., Faller, G., Graciela, F. de V., Hensel, A., 2013. Effects of polysaccharide isolated from *Streptococcus thermophilus* CRL1190 on human gastric epithelial cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 62, 217–224.
- Patel, A., Shah, N., Prajapati, J.B., 2014. Clinical application of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection—a brief review. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 47, 429–437.
- Rugge, M., Pennelli, G., Pilozi, E., Fassan, M., Ingravallo, G., Russo, V.M., Di Mario, F., 2011. Gastritis: The histology report. *Dig. Liver Dis.* 43, S373–S384.
- Suzuki, H., Mori, M., Sakaguchi, A.A., Suzuki, M., Miura, S., Ishii, H., 1998. Enhanced levels of C-X-C chemokine, human GRO $\alpha$ , in *Helicobacter pylori*-associated gastric disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 516–520.
- Yamada, S., Kato, S., Matsuhisa, T., Makonkawkeyoon, L., Yoshida, M., Chakrabandhu, T., Lertprasertsuk, N., Suttharat, P., Chakrabandhu, B., Nishiumi, S., Chongraksut, W., Azuma, T., 2013. Predominant mucosal IL-8 mRNA expression in non-cagA *Thais* is risk for gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 19, 2941–9.