

Caracterización genética de los motivos EPIYA del gen *cagA* en aislamientos de *Helicobacter pylori* de origen colombiano: estandarización de una prueba molecular para su rápida detección

Pseudónimo: EPIYARIANOS

Introducción

Helicobacter pylori (*H.pylori*) es una bacteria que infecta la mucosa gástrica de los humanos y ha sido asociada con el desarrollo de enfermedades gastroduodenales como gastritis crónica, úlcera péptica y duodenal, linfoma tipo MALT y cáncer gástrico. Algunas poblaciones que tienen una alta prevalencia de la infección también tienen una alta incidencia de cáncer gástrico (Este de Asia), mientras que esta misma relación no ocurre en África y Sur de Asia. Una explicación plausible de estas diferencias en el desenlace de la infección obedece a que *Helicobacter pylori* es una bacteria con una gran plasticidad genética que implica diferencias en genes de virulencia que varían geográficamente (Hayashi T et al; 2017). Si bien el cáncer gástrico es una enfermedad multifactorial, donde están involucrados antecedentes genéticos, factores ambientales y la infección por *H.pylori*. Una de las características atribuidas al microorganismo son los factores de virulencia, entre los cuales el más estudiado e importante es la proteína CagA (Piazuelo MB et al; 2010).

El gen *cagA* codifica una proteína altamente inmunogénica y polimórfica (CagA), la cual es inyectada al interior de la célula epitelial gástrica a través del sistema de secreción tipo IV, una vez liberada intracelularmente en la membrana plasmática, esta es fosforilada por medio de la familia de las Src quinasas en residuos de tirosina en los motivos denominados EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) localizados en la región carboxi-terminal de la proteína (Hatakeyama M; 2011). Luego de ser fosforilada, CagA interactúa con varias proteínas que están involucradas en vías de señalización, regulación del crecimiento celular, morfogénesis, movilidad celular y polaridad, como la proteína fosfatasa SHP-2, una oncoproteína que se ha visto asociada a procesos malignos en humanos. La interacción CagA-SHP-2 activa la cascada Erk MAP quinasa tanto de manera dependiente como independiente causando una transformación morfológica de la célula epitelial. Conllevando a una elongación celular conocido como el fenotipo colibrí (Higashi H; 2002). Adicionalmente, la activación de ERK en la célula epitelial activando NF-Kb, el cual induce la producción de IL- 8 (Brandt S et al, 2005). Por otro lado, la activación sostenida

de SHP-2 induce apoptosis en la célula epitelial gástrica, sin embargo la proteína CagA se une a la región carboxi-terminal de la quinasa CSK, promoviendo una regulación negativa que conlleva a la disminución del complejo CagA-SHP-2 y contribuyendo a otros sustratos de proteínas SRC se desfosforilen como la cortactina, una proteína que está involucrada en cambios morfológicos inducidos por CagA (Hatakeyama M, 2005)

CagA varía en tamaño y esta variación es debida a los segmentos EPIYA. Se han descrito 4 tipos de segmentos EPIYA (A, B, C, D), los cuales se basan en el número de aminoácidos y la secuencia flanqueante del motivo (Higashi H, 2002). Los segmentos A y B están presentes en todos los aislamientos, el segmento C se encuentra en cepas de origen occidental y el segmento D en las asiáticas. El segmento EPIYA C presenta diferentes repeticiones, las cuales están relacionadas con los niveles de fosforilación de la tirosina, es decir que las proteínas CagA occidentales con mayor número de repeticiones EPIYA-C son biológicamente más activas que las que poseen un menor número de repeticiones (Xia Y et al; 2009). De acuerdo a esto, se han realizado estudios que evalúan el riesgo de desarrollar cáncer gástrico con 2 o más EPIYA; dos de esos estudios fueron realizados en Europa por Basso *et al.*, 2008 y Ferreira *et al* 2012, quienes reportaron que el riesgo para desarrollar cáncer gástrico con 2 o más repeticiones EPIYA-C fue de 32 y 51 veces más, respectivamente. Los 3 estudios restantes fueron realizados en el continente Americano, por Anaya F *et al* 2014 (México), Batista S *et al.*, 2011 (Brasil) y Quiroga *et a* 2010 (Colombia) reportando riesgos (OR) para desarrollar cáncer gástrico de 5.9, 3.8 y 12 con las siguientes repeticiones: 2 EPIYA-C, 2 y 3 EPIYA- C y 3-EPIYA-C respectivamente.

A diferencia del segmento EPIYA-C, el segmento EPIYA-D rara vez se duplica sin embargo la secuencia consenso EPIYA-D presenta una mayor afinidad de unión con SHP-2, al no encontrar cambios en la secuencia de aminoácidos, diferente a lo encontrado en la secuencia flanqueante EPIYA-C que presenta cambios en la secuencia de aminoácidos en la posición Py + 5, por lo tanto el segmento EPIYA-D presenta una fuerte habilidad de inducir varios cambios en la célula epitelial y una mayor actividad morfogenética que el segmento EPIYA-C, por esta razón cepas de origen asiático son más carcinogénicas que las cepas de origen occidental (Hatakeyama M and Higashi H; 2005).

En Colombia existen pocos trabajos que hayan estudiado la diversidad genética de los segmentos EPIYA presentes en el gen *cagA* de aislamientos de *H. pylori* en pacientes infectados con gastritis crónica, información que es muy relevante para definir la diversidad

genética de la bacteria en este gen y que permitan a futuro establecer como estas diferencias genéticas y motivos EPIYA se relacionan con el desarrollo de cáncer gástrico, ya que los estudios publicados actualmente se han centrado en el estudio de esta diversidad en pacientes con cáncer gástrico, y por lo tanto no reflejan la verdadera diversidad circulante que además permita con estudios adicionales determinar el impacto de la diversidad genética del gen *cagA* en el desarrollo de enfermedades gastroduodenales. Para llenar este vacío de conocimiento en este estudio se describió la circulación actual de los segmentos EPIYA presentes en el gen *cagA* de aislamientos presentes en la población estudiada, estratificando el número de segmentos EPIYA por edad de los pacientes con el fin de contribuir al entendimiento de la virulencia de la bacteria y su posible relación con el desarrollo de enfermedades gástricas. Adicionalmente en este estudio se pudo definir que la prueba de biología molecular estandarizada por una metodología de PCR convencional; que amplifica el segmento que contiene los segmentos EPIYA de la bacteria permite determinar de acuerdo al peso molecular del producto de PCR amplificado la estructura y número de motivos EPIYA presentes en el gen *cagA*, información que será muy útil para gastroenterólogos y clínicos para definir con información precisa del gen *cagA* si un paciente infectado con la bacteria podría estar a riesgo de desarrollar en algún momento cáncer gástrico.

Palabras claves: *Helicobacter pylori*; proteína CagA; motivo EPIYA

Materiales y métodos

Aislamientos de *H.pylori*

Se analizaron 85 aislamientos de *H.pylori cagA* positivos provenientes de la ciudad de Bogotá, Colombia. Los aislamientos clínicos de *H. pylori*, provenían de pacientes diagnosticados con dispepsia funcional en una institución universitaria de Colombia (2009-2010). Este estudio fue aprobado por el comité institucional de Ética de las instituciones participantes. Todos los pacientes obtuvieron y firmaron un consentimiento informado.

Los aislamientos fueron caracterizados y genotipificados molecularmente para la presencia del gen *cagA* y almacenados en la Colección de Microorganismos de Una Universidad Colombiana.

Amplificación de PCR y secuenciación

La región 3' del gen *cagA* fue amplificada por reacción en la cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers reportados por Yamaoka *et al.*, 1999 (12) (Número de acceso al Gen bank L11714) Forward (CAGTF 5'-ACCCTAGTCGGTAATGGG-3') y Reverse (CAGTR 5' GCTTTAGCTTCTGAYACYGC 3', Y: C + T) posición 2536 a 3044 (número de acceso a GenBank L11714). Como control positivo se utilizó la cepa de referencia NCTC 11637, la cual es *cagA* positivo.

La amplificación de PCR fue realizada en un volumen de 50 μ l conteniendo 0,3 μ M de concentración de primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 ng de DNA genómico *H.pylori* y 1U de Go- Taq master mix (Promega, Madison, USA).

Las condiciones de la PCR para la amplificación del gen *cagA* fueron las siguientes: denaturación inicial 95°C/10 min, seguido por 39 ciclos (95°C/30 seg, 52.3°C/30 seg y 72°C/ 36 seg) y una extensión final a 72°C/5 min. La amplificación fue llevada a cabo en un Termociclador T100 (Biorad, Hercules, CA, USA). Finalmente los productos de PCR fueron revelados en gel de agarosa al 2% con Syber Safe y fueron analizados en gel doc (Biorad, Hércules, CA, USA).

En los aislamientos en los que se observaron dos o más bandas (aislamiento con coinfección), cada banda fue cortada a través de un transiluminador UV, posteriormente cada banda de gel de agarosa con diferentes tamaños fueron colocadas en un tubo de PCR y luego fueron purificadas a través del Kit Wizard SV Gel and PCR Clean- Up System (Promega, Madison, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para determinar la concentración de DNA de cada muestra se utilizó espectrofotometría con NanoDrop 2000 ((Thermo Scientific, Wilmington, NC). La amplificación de cada ADN obtenido a partir de las bandas de gel fue posteriormente amplificada por PCR convencional, luego fueron secuenciados y finalmente se realizó análisis bioinformático, con la finalidad de determinar la presencia de los motivos EPIYA en cada muestra y así conocer los diferentes tipos de cepas que pueden infectar a cada paciente.

Todos los productos de PCR de este estudio fueron secuenciados por Macrogen Inc., Korea. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas en ambas cadenas de ADN (Forward y Reverse) a través del método de Sanger, utilizando como control la secuencia de la cepa de referencia NCTC 11637, la cual es de tipo *cagA* occidental con el motivo EPIYA-ABC.

Análisis bioinformático de las secuencias que contienen el motivo EPIYA

Mediante el programa BLASTx se alinearon y analizaron las secuencias de nucleótidos, incluyendo la secuencia *cagA* de la cepa de referencia NCTC 11637 (número de acceso al gen bank AF202973)

A partir de Clustal W (European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) se realizó el alineamiento de las secuencias peptídicas que contienen los motivos EPIYA.

Resultados

Amplificación de la región 3' del gen *cagA*

Se amplificó la región 3' del gen *cagA* que codifica para los motivos EPIYA de 85 aislamientos de *H. pylori* y se observó que el tamaño de los productos de PCR osciló entre 400pb-700pb (Figura 9), de los cuales 7 aislamientos presentaron fragmentos de 400pb, 34 aislamientos de 500pb, 26 aislamientos de 600pb y 18 aislamientos de 700pb (Tabla 3), estos fueron organizados equidistantemente (100pb) en una disposición similar a una escalera indicando que la variación en el tamaño observada en la región 3' del gen *cagA* es debido a la presencia de múltiples secuencias de repeticiones EPIYA. El ADN de la cepa de referencia NCTC 11637 presentó una única banda con un tamaño de 500pb.

En 58 de los 85 aislamientos (68,2%), se observó la presencia de únicas bandas (Tabla 1), encontrando que 2 aislamientos presentaron un tamaño de 400pb, 24 aislamientos de 500pb, 18 aislamientos de 600pb y 14 aislamientos de 700pb. Sin embargo en 27 de los 85 aislamientos (31,8%) se observó la presencia de múltiples bandas, en donde la mayoría de los aislamientos presentaron dos bandas con tamaños que variaron entre 500, 600 y 700 pb. (Tabla 2).

Análisis de los motivos EPIYA en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*

De acuerdo al alineamiento de las secuencias peptídicas de la región 3' del gen *cagA* utilizando ClustalW2, se observó que todos los aislamientos son de tipo *cagA* occidental, encontrando 3 tipos de motivo EPIYA: EPIYA-A: EPIYAKVNKKKAGQ, EPIYA-B: EPIY(A/T)QVAKKVNAKI y EPIYA-C EPIYATIDDLGGP. No se encontraron aislamientos en nuestra población de tipo *cagA* oriental EPIYA- D: EPIYATIDFDEANQAG (Figura 1).

La distribución total de los motivos EPIYA fue: AB 7/85 (8,2%); ABC 34/85 (40%); ABCC 26/85 (30,6%) y ABCCC 18/85 (21,2%) (Figura 2). Adicionalmente, se confirmó la predicción acerca del número de repeticiones EPIYA basadas en el tamaño de los amplicones de PCR, encontrando que 4/85 aislamientos con un producto de PCR de tamaño de 400 pb correspondió a EPIYA AB, 44/85 aislamientos con 500 pb a un EPIYA ABC, 28 /85 aislamientos con 600 pb a un EPIYA ABCC y 9/85 aislamientos con 700 pb a un EPIYA ABCCC. (Figura 3). Adicionalmente, se observó en los pacientes la presencia de uno o múltiples genotipos EPIYA, en donde 58 pacientes no presentaron coinfección encontrando la siguiente distribución: EPIYA: 2/58 AB (3.5%), 24/58 ABC (41.4%), 18/58 ABCC (31%), 14/58 ABCCC (24.1%) (Tabla 3).

Sin embargo 27 pacientes fueron infectados con 2 o más diferentes genotipos EPIYA con la siguiente distribución : ABC y ABCC en 7 pacientes; ABCC y ABCCC en 6 pacientes y AB and ABC en 5 pacientes, también se observó coinfección con 3 y 4 genotipos de EPIYA: AB, ABC y ABCC en 5 pacientes; AB, ABC y ABCCC en 1 paciente; ABC, ABCC y ABCCC en 1 paciente y finalmente 2 aislamientos de pacientes presentaron coinfección con los siguientes genotipos EPIYA : AB, ABC, ABCC and ABCCC (Tabla 4).

Se observó que el número de repeticiones EPIYA-C está relacionada con la edad de los pacientes, una repetición EPIYA C (ABC) con un promedio de 45 años, 2 EPIYA-C (ABCC) un promedio de 51 años y con 3 EPIYA C (ABCCC) un promedio de edad de 63 años. Se observó un incremento significativo en el número de repeticiones EPIYA C y el incremento de edad de los pacientes ($P < 0.001$).

Discusión

Todos los aislamientos incluidos en este estudio presentaron *cagA* de tipo occidental, no se encontraron aislamientos de tipo *cagA* oriental circulando en nuestra población, estos resultados concuerdan con lo reportado por Yamaoka *et al* 1999 (12), Quiroga *et al* 2010 y Schneider *et al* 2010 quienes en sus estudios también incluyeron pacientes Colombianos. Adicionalmente estudios realizados en Europa, (Argent RH *et al*; 2004), América (Basso D *et al*; 2008) (devi Sm *et al*; 2006) y África (Argent RH *et al*; 2008) reportan la presencia de *cagA* de tipo occidental, lo cual verifica lo planteado por Hatakeyama *et al* 2010 sobre la variación geográfica de *cagA*, en donde poblaciones de África, Asia del sur, Europa y las Américas presentan *cagA* de tipo occidental y poblaciones del Este de Asia presentan *cagA* de tipo oriental.

Se encontró en todos los aislamientos analizados, la presencia del segmento EPIYA -A y EPIYA-B, tal como lo reporta en sus estudios Quiroga *et al* 2010 , Yamaoka *et al* , Sicinschi *et al* , Batista *et al*, sin embargo Torres *et al* 2012 y Panayotopoulou *et al* 2006, reportan la presencia de 2 y 1 aislamiento con motivo EPIYA AC, respectivamente.

De los aislamientos *cagA* de tipo occidental se observó la presencia de una a tres repeticiones EPIYA-C, siendo el motivo EPIYA-ABC (40%) el más frecuente encontrado en nuestra población, lo cual concuerda con los estudios realizados por Sicinschi *et al* 2010, Yamaoka *et al* 1999 y Quiroga *et al* 2010. Sin embargo, la frecuencia de los aislamientos con 2 o 3 repeticiones EPIYA-C fue de 51.8%, siendo este porcentaje mayor a lo reportado en estudios realizados en Colombia: Yamaoka *et al*; 2000 (31%), Sicinschi *et al*; 2010 (35.8%), Schneider *et al*; 2010 (37%) y Quiroga *et al*; 2010 (41%). Estas diferencias pueden ser explicadas, debido a que los estudios anteriores incluyeron pacientes con varias enfermedades (gastritis atrófica, úlceras y cáncer), a diferencia del presente estudio donde se describió la circulación de aislamientos con múltiples EPIYA-C, únicamente a partir de pacientes con gastritis crónica.

Igualmente, en otros países se han realizado diferentes estudios para determinar la prevalencia de aislamientos con múltiples motivos EPIYA-C y se ha encontrado menor número de aislamientos con múltiples EPIYA-C que los encontrados en este estudio (Francia (32%) (Yamaoka Y *et al*; 2000), Costa Rica (30.3%) (Occhialini A *et al*; 2001), Sur África (27%) (Argent RH *et al*; 2008)¹, Grecia (21%) (Panayotopoulou E *et al*; 2007), Cuba (22.1%) (Torres L; 2012) México (20%) (Reyes-León A *et al*; 2007), USA (17%) (Yamaoka Y *et al*; 2000) y Perú

(11.5%) (Devi SM et al; 2006), lo cual puede deberse al proceso de microevolución en el gen *cagA*, el cual describe un cambio genético que conduce a un cambio en la virulencia del fenotipo presentando implicaciones importantes en la patogénesis de *H.pylori* (Suzuki R et al; 2011) (Argent R et al; 2008), siendo esta una explicación parcial del por qué en este estudio se observó un mayor número de repeticiones EPIYA-C en pacientes con gastritis crónica, es decir que la relación entre la virulencia bacteriana y la enfermedad no mostro una asociación estricta.

Adicionalmente otras posibles razones del resultado de nuestro estudio, se debe a que los estudios anteriormente reportados, utilizaron pacientes con diferentes enfermedades (gastritis, úlceras, metaplasia, displasia, cáncer), a la variación en el tamaño de la muestra y posiblemente a la incidencia de cáncer gástrico de cada país; esto es importante al mencionar que Colombia tiene una alta incidencia de cáncer gástrico que otros países, posiblemente debido en parte a las múltiples repeticiones EPIYA-C, lo cual concuerda con lo reportado por Torres *et al* 2012 (21), Basso *et al*; 2008) y Sicinschi *et al* 2010, quienes explican que las proteínas CagA con 2 o más números de repeticiones EPIYA-C sean más virulentas y estén asociados con un alto riesgo de cáncer gástrico que aislamientos con únicamente una repetición EPIYA-C. Adicionalmente, el riesgo de cáncer gástrico es 12 veces más en pacientes con 3 repeticiones EPIYA-C que pacientes infectados con una repeticiones EPIYA-C (Quiroga AJ et al; 2010).

En los resultados de este estudio se observó relación entre el incremento en la edad de los pacientes y las repeticiones EPIYA, estos datos concuerdan con Xia Y *et al*; 2009, donde los aislamientos CagA de origen occidental con un alto número de repeticiones EPIYA-C son más carcinogénicas que las que tienen menos repeticiones; adicionalmente Parkin et al en 2001, basándose en reportes de Globocan describe que la frecuencia de cáncer gástrico ocurre en un rango de edad de 55-80 años y que no es muy usual que ocurra en pacientes jóvenes. También “The International Agency for Research on Cancer (IARC) y World Health Organization (WHO) (2008) reportan que la mortalidad de cáncer gástrico incrementa con el avance de la edad, observando 245 muertes en edades de 40-49 años, 479 muertes en edades entre 50-59 años y 687 muertes en edades entre 60-69 años, la cual indica en nuestro estudio que los pacientes con edades entre 50-70 años los cuales presentaron 2 y 3 repeticiones EPIYA-C, puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer gástrico que pacientes menores de 50 años quienes tienen 1 o ninguna repetición EPIYA-C. Estos resultados

concuerdan con lo reportado por Kalaf *et al* en 2013, quienes reportan en su estudio que el promedio de edad de los pacientes infectados con EPIYA ABCC y ABCCC es mayor, que en pacientes que presentan otros tipos de EPIYA. , encontrando la siguiente distribución EPIYA en relación al promedio de edad de los pacientes: EPIYA ABC- 43 años, EPIYA ABCC- 50 años y EPIYA ABCCC- 53 años.

Dado que el cáncer gástrico es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo y que adicionalmente alrededor del 40% de los pacientes con cáncer gástrico no reportan síntomas antes del diagnóstico, la prevención es la mejor estrategia para el control de cáncer gástrico. Correa *et al* en 2004, sugieren un programa para la prevención de cáncer gástrico el cual incluye la detección de *H.pylori*, vigilancia endoscópica e histológica de lesiones precancerosas, saneamiento e higiene, restricción de sal en la dieta y una dieta balanceada que contenga frutas y verduras frescas. Por más que el 80% de los casos de cáncer gástrico se han atribuido a la infección por *H.pylori* (Blumberg R et al, 2011), la erradicación es considerada como una estrategia primaria de prevención.

De acuerdo al consenso de Maastricht V (Malfertheiner P et al 2016), la erradicación de *H.pylori* reduce el riesgo de desarrollar cáncer gástrico, por lo que los pacientes deben ser tratados durante la fase inicial de la infección antes de que puedan ocurrir cambios pre neoplásicos en la mucosa gástrica, adicionalmente sugieren que para reducir el riesgo de cáncer gástrico, la terapia de erradicación puede ofrecerse a pacientes con familiares con primer grado de consanguinidad con cáncer gástrico, pacientes neoplasia gástrica previa que ya hayan sido tratados por resección subtotal endoscópica o gástrica, paciente con riesgo de pangastritis severa, gastritis predominante gastritis predominante de cuerpo o atrofia severa y pacientes con inhibición crónica del ácido gástrico por más de 1 año. Otros dos documentos, American Collage of Gastroenterology y el Consenso de Asia y el pacifico, también recomiendan la erradicación de *H.pylori* en pacientes con resección endoscópica de cáncer gástrico precoz en regiones con una incidencia anual de cáncer gástrico por encima de una población de 20/100.000 (Fock KM et al; 2008).

En este estudio se encontraron 27 aislamientos, con dos o más de 2 bandas con tamaños correspondientes a diferentes números de repeticiones EPIYA-C, similar a lo reportado por Yamaoka *et al* 1999, quien en su estudio encontró más de 26 aislamientos con dos o más bandas, lo cual según Acosta *et al* 2010, esto puede deberse a la presencia de subclones atribuibles a un proceso de microevolución con altas tasas de recombinación del genoma

plástico de *H. pylori* o también al proceso de coinfección con múltiples cepas de *H. pylori* que coexisten en el mismo paciente así como también lo reporta Yamaoka *et al* 1999, Panayotopoulou *et al* 2006 (22), Argent *et al* 2004, Torres *et al* 2012.

En cuanto a la re amplificación, la estrategia metodológica utilizada en este estudio, nos permitió según el tamaño y numero de bandas de productos de PCR conocer el número de repeticiones EPIYA, lo cual posteriormente fue confirmada por secuenciación. Este método, permitió predecir con precisión que cada una de las bandas son secuencias específicas de *cagA* y coinfección con diferentes genotipos de *cagA*, por lo tanto, esto puede ser muy útil para implementar en laboratorios de hospitales y así conocer de acuerdo al tamaño de las bandas el número de repeticiones EPIYA que porta la cepa con la cual está infectado un paciente. Si bien otras metodologías han sido reportadas previamente por Argent *et al*, 2004 y Torres *et al* 2012 quienes diseñaron primers específicos para *cagA* occidental, *cagA* oriental, segmentos EPIYA A, EPIYA B y EPIYA C y secuenciación, estas estrategias también pueden detectar aislamientos con más de 1 motivo EPIYA en el mismo paciente, llamada infección mixta o coinfección, la desventaja de estos métodos es su alto costo y mayor demanda en tiempo en la ejecución de la prueba. Según Panayotopoulou *et al*, 2007, la coinfección puede ser debida a que para aislar *H.pylori* a partir de biopsias gástricas, se recoge todo la biomasa posible en masivo, mas no se selecciona una colonia individual; razón por la cual se observó la presencia de múltiples genotipos de *cagA* en el mismo paciente

Conclusión

En este estudio se identificó que los aislamientos de *H. pylori* de origen colombiano poseen *cagA* de origen occidental, con una estructura EPIYA-ABC y múltiples repeticiones EPIYA-C: EPIYA-ABCC y EPIYA-ABCCC; presentes en el 52% de la población infectada. Se observó un mayor número de motivos EPIYA ABCC y ABCCC en población mayor de 50 años y fue frecuente la infección mixta con cepas con diferentes repeticiones de motivos EPIYA. La prueba de biología molecular estandarizada en este estudio es fácil de realizar y puede implementarse en hospitales con el fin de contribuir al entendimiento de la estructura del gen *cagA* en Colombia que permitan a gastroenterólogos hacer recomendaciones más estructuradas en pacientes infectados con *H. pylori* y el riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

Referencias

1. Hayashi T, Senda M, Suzuki N, Nishikawa H, Ben C, Tang C, Nagase L, et al. Differential Mechanisms for SHP2 Binding and Activation Are Exploited by Geographically Distinct *Helicobacter pylori* CagA Oncoproteins Cell Reports 20, 2876–2890, September 19, 2017
2. Piazuolo MB, Epplein M, Correa P. Gastric cáncer: an Infectious Disease. Infect Dis Clin North Am 2010; 24: 853-869. [PMID: 20937454 DOI: 10.1016/j.idc.2010.07.010]
3. Hatakeyama M. Anthropological and clinical implications for the structural diversity of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. Cancer Sci 2011; 102: 36-43. [PMID: 20942897 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01743.x]
4. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azcuma T, Hatakeyama M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA Protein. Science 2002; 295: 683-686. [PMID: 11743164 DOI: 10.1126/science.1067147]
5. Brandt S, Kwok T, Harting R, Koning W, Backert S. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. Proc Natl Acad USA 2005; 102: 9300-9305. [PMID: 15972330 DOI: 10.1073/pnas.0409873102].
6. Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. Cancer Sci 2005; 96: 835-843. [PMID: 16367902 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2005.00130.x]
7. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 14428–14433. [PMID: 12391297 DOI: 10.1073/pnas.222375399].
8. Xia Y, Yamaoka Y, Zho Q, Gao X. A comprehensive sequence and disease correlation analysis for the C-terminal region of CagA protein of *Helicobacter pylori*. PLoS One 2009; 4: 1-8. [PMID: 19893742 DOI: 10.1371/journal.pone.0007736].
9. Yamaoka Y, Zimaity H, Gutierrez O, Figura N, Kim J, Kodama T, et al. Relationship between the cagA 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. Gastroenterology 1999; 117: 342–349. [PMID: 10419915 DOI:10.1053/gast.1999.0029900342].
10. Quiroga AJ, Huertas A, Combata AL, Bravo MM. Variation in the number of EPIYA-C repeats in CagA protein from Colombian *Helicobacter pylori* strains and its ability to

induce hummingbird phenotype in gastric epithelial cells. *Biomedica* 2010; 30: 251-258. [PMID: 20890572].

11. Schneider N, Krishna U, Gallo J, Israel D, Piazuolo B, Camargo MC, et al. Role of *Helicobacter pylori* CagA molecular variations in induction of host phenotypes with carcinogenic potential. *J infect Dis* 2010; 199: 1218-1221. [PMID: 19278338 DOI: 10.1086/597416].
12. Argent RH, Kidd M, Owen RJ, Thomas RJ, Limb MC, Atherton JC. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2004; 127: 514-23. [PMID: 15300584 DOI: 10.1053/j.gastro.2004.06.006].
13. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008; 135: 91-9. [PMID: 18474244 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.04]
14. Devi SM, Ahmed I, Khan AA, Rahman SA, Alvi A, Sechi LA. Genomes of *Helicobacter pylori* from native Peruvians suggest admixture of ancestral and modern lineages and reveal a western type cag-pathogenicity island. *BMC Genomics* 2006; (7): 1-10. [PMID: 16872520 DOI: 10.1186/1471-2164-7-191].
15. Argent RH, Hale JL, El Oma EM, Atherton JC. Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between Western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *J Med Microbiol* 2008; 57: 1062-7. [PMID: 18719114 DOI: 10.1099/jmm.0.2008/001818-0]
16. Sicinschi LA, Correa P, Peek RM, Camargo MC, Piazuolo MB, Romero-Gallo J, et al. CagA C-terminal variations in *Helicobacter pylori* strains from Colombian patients with gastric precancerous lesions. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 369-78. [PMID: 19456839 DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02811.x].
17. Batista S, Rocha G, Rocha A, Saraiva I, Cabral M, Oliveira R, et al. High number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiology* 2011; 11: 61-68. [DOI: 10.1186/1471-2180-11-61].
18. Torres L, Gonzalez L, Melian K, Alonso J, Moreno A, Hernandez M, et al. EPIYA motif patterns among Cuban *Helicobacter pylori* CagA positive strains. *Biomedica* 2012; 32: 23-31 [PMID: 23235784 DOI: 10.1590/S0120-41572012000100004].

19. Panayotopoulou E, Sgouras D, Papadakos K, Kalliaropoulos A, Papatheodoridis G, Mentis A, et al. Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 488-495 [PMID: 17151214 DOI: 10.1128/JCM.01616-06]
20. Yamaoka Y, Osato MS, Sepulveda AR, Gutierrez O, Figura N, Kim JG. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori*: separation of *H. pylori* from East Asian and non-Asian countries. *Epidemiol Infect* 2000; 124: 91-6 [PMID: 10722135 DOI: 10.1017/S0950268899003209]
21. Occhialini A, Marais A, Urdaci M, Sierra R, Muñoz N, Covacci A. Composition and gene expression of the *cag* pathogenicity island in *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica. *Infect Immun* 2001; 69: 1902-1908 [PMID: 11179371 DOI: 10.1128/IAI.69.3.1902-1908.2001]
22. Reyes-León A, Atherton JC, Argent RH, Puente JL, Torres J. Heterogeneity in the activity of Mexican *Helicobacter pylori* strains in gastric epithelial cells and its association with diversity in the *cagA* gene. *Infect Immun* 2007; 75: 3445-3454 [PMID: 17438024 DOI: 10.1128/IAI.01951-06]
23. Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. Molecular epidemiology, population genetics and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infect Genet Evol* 2011; 12: 203-21. [PMID: 22197766 DOI: 10.1016/j.meegid.2011.12.002].
24. Argent R, Thomas R, Jimenez FA, Letley D, Limb M, Atherton JC. Toxigenic *Helicobacter pylori* infection precedes gastric hypochlorhydria in Cancer Relatives and *H. pylori* virulence evolves in these families. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2227-2235 [PMID: 18381965 DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-2022]
25. Ferreira R, Machado J, Leite M, Carneiro F, Figueiredo C. The number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C tyrosine phosphorylation motifs influences the pattern of gastritis and the development of gastric carcinoma. *Histopathology* 2012; 60: 992-998 [PMID: 22348604 DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04190.x]
26. Anaya F, Poblete T, Roman A, Reyes S, Sampedro J, Zaragoza O, et al. The EPIYA-ABCC motif pattern in CagA of *Helicobacter pylori* is associated with peptic ulcer and gastric cancer in Mexican population. *BMC Gastroenterol* 2014; (14): 223-234 [PMID: 25539656 DOI: 10.1186/s12876-014-0223-9]

27. Batista S, Rocha G, Rocha A, Saraiva I, Cabral M, Oliveira R, et al. High number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiology* 2011; (11): 61-68 [PMID: 21435255 DOI: 10.1186/1471-2180-11-61]
28. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2: 533–543 [PMID: 11905707 DOI: 10.1016/S1470-2045(01)00486-7]
29. Kalaf EA, Al-Khafaji ZM, Yassen NY, Al-Abbudi FA, Sadwen SN. Study of the cytotoxin-associated gene a (*cagA* gene) in *Helicobacter pylori* using gastric biopsies of Iraqi patients. *Saudi J Gastroenterol* 2013; 19: 69-74 [PMID: 23481132 DOI: 10.4103/1319-3767.108474]
30. Correa P, Piazuelo MB, Camargo MC. The future of gastric cancer prevention. *Gastric Cancer* 2004; 7: 9-16 [PMID: 15052434 DOI: 10.1007/s10120-003-0265-0]
31. Fock KM, Talley N, Moayyedi P, Hunt R, Azuma T, et al. Asia-Pacific consensus guidelines on gastric cancer prevention. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 351-365 [PMID: 18318820 DOI:10.1111/j.1440-1746.2008.05314.x]
32. Acosta N, Quiroga A, Delgado P, Bravo MM, Jaramillo C. *Helicobacter pylori* CagA protein polymorphisms and their lack of association with pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3936-3943 [PMID: 20712055 DOI: 10.3748/wjg.v16.i31.3936]
33. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: The Maastrich V/ Florence Consensus report. *Gut*. 2017 Jan;66(1):6-30

Figura 3. Correlación entre el tamaño de los productos amplificados de la región 3' del gen *cagA* y el motivo EPIYA. Los DNA de los aislamientos de *H.pylori* fueron amplificados y los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa al 2% (carril 3-12). Se encontraron fragmentos de 400bp (EPIYA AB), 500 pb (EPIYA ABC), 600 pb (EPIYA ABCC) y 700 pb (EPIYA ABCCC). Carril 2: control negativo, carril 12: NCTC 11637, Carril 1: marcador de peso 100 pb (Promega, USA)

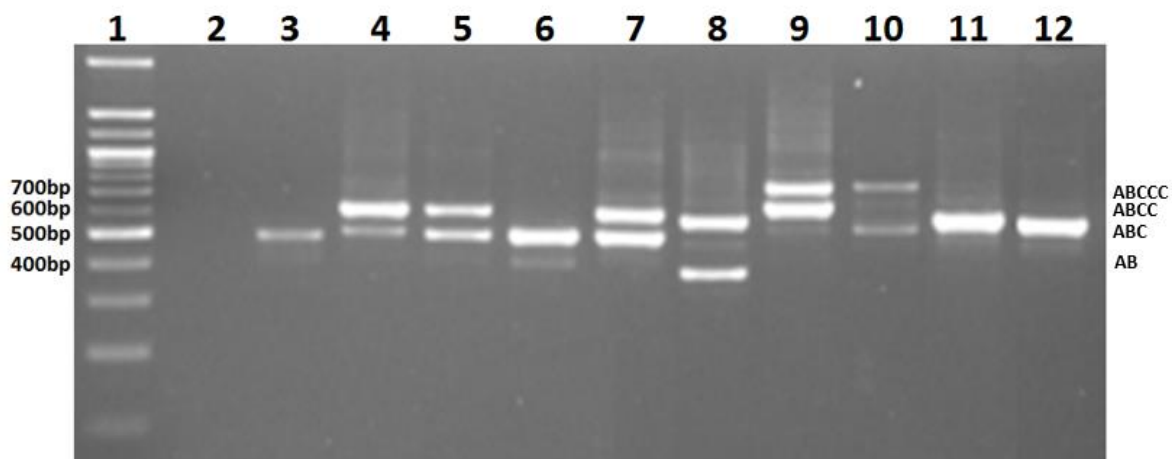


Tabla 1. Productos de PCR de Aislamientos de *H.pylori* con únicas bandas

Tamaño del producto (pb)	Nº Aislamientos
400	2
500	24
600	18
700	14

Tabla 2. Productos de PCR de Aislamientos de *H.pylori* con múltiples bandas

N° aislamientos	N° bandas	Tamaño del producto (pb)
7	2	500- 600
6	2	600-700
5	2	400-500
5	3	400-500-600
1	3	500-600-700
1	3	400-500-700
2	4	400-500-600-700

Tabla 3. Motivos EPIYA en aislamientos de pacientes sin coinfección

Nº Aislamientos	Tipo de motivo EPIYA	% motivo EPIYA
2	AB	3,5
24	ABC	41,4
18	ABCC	31
14	ABCCC	24,1

Tabla 4. Motivos EPIYA en aislamientos de pacientes con coinfección

N° pacientes	Combinación de Motivos EPIYA	% Combinación de motivos EPIYA
5	AB-ABC	18.5
7	ABC-ABCC	26
6	ABCC-ABCCC	22.2
5	AB-ABC-ABCC	18.5
1	AB-ABC-ABCCC	3.7
1	AB-ABCC-ABCCC	3.7
2	AB-ABC-ABCC-ABCCC	7.4