

**MOTIVOS EPIYA EN LA PROTEÍNA CagA EN AISLAMIENTOS
COLOMBIANOS DE *Helicobacter pylori* PROVENIENTES DE LA CIUDAD DE
BOGOTÁ**

ELIANA ROCIO RODRIGUEZ GOMEZ



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ
2015**

**MOTIVOS EPIYA EN LA PROTEÍNA CagA EN AISLAMIENTOS
COLOMBIANOS DE *Helicobacter pylori* PROVENIENTES DE LA CIUDAD DE
BOGOTÁ**

ELIANA ROCIO RODRIGUEZ GOMEZ

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para otorgar el título de:

Magister en Ciencias Biológicas

DIRECTORA: ALBA ALICIA TRESPALACIOS RANGEL Ph.D

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS

BOGOTA

2015

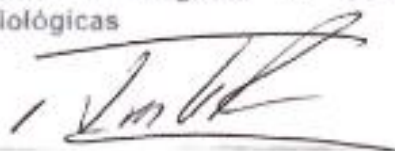
NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo por buscar verdad y justicia”

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

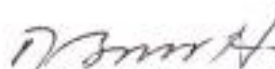
Nota de aceptación:

Aprobado por el Comité de Grado
en cumplimiento de los requisitos
exigidos por la Pontificia
Universidad Javeriana para optar al
título de Magister en Ciencias
Biológicas



ALBA ALICIA TRESPALACIOS RANGEL Ph.D

Director



MARIA MERCEDES BRAVO HERNANDEZ MSc

Jurado 1



HUGO DIEZ ORTEGA Ph.D

Jurado 2



TERESA ALARCON CAVERO Ph.D

Jurado 3

Bogotá, 15 de Julio de 2015

**MOTIVOS EPIYA EN LA PROTEÍNA CagA EN AISLAMIENTOS
COLOMBIANOS DE *Helicobacter pylori* PROVENIENTES DE LA CIUDAD DE
BOGOTÁ**

ELIANA ROCIO RODRIGUEZ GOMEZ

APROBADO

**Concepción Puerta Bula Ph.D
Decana
Facultad de Ciencias**

**Alba Alicia Trespalacios Rangel Ph.D
Directora de posgrado
Facultad de Ciencias**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerle a mi Dios por haberme permitido culminar otro de mis mayores logros iluminándome, guiándome y llenándome de bendiciones al igual que de fortaleza, sabiduría, seguridad y paciencia para hacer este sueño realidad.

A la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá- Colombia por patrocinar el proyecto dentro del cual se desarrolló este trabajo.

A mis padres y hermano por apoyarme en todo momento incondicionalmente, por enseñarme a luchar por mis verdaderos sueños y por ser hoy la persona quien soy gracias a sus principios y valores inculcados. Al igual por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación y por brindarme siempre su fiel amor.

A la Doctora Alba Alicia Trespacios por su apoyo y conocimiento incondicional y por brindarme la gran oportunidad de seguir aprendiendo y fortaleciendo mis conocimientos.

A todos los integrantes del grupo de investigación de *H. pylori* del laboratorio de Bacteriología especial por hacer parte de este bello recorrido.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCION	14
2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
3. MARCO TEORICO	17
4. OBJETIVOS	27
4.1. OBJETIVO GENERAL	27
4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	27
5. METODOLOGIA	28
5.1. Diseño del estudio	28
5.2. Población y muestra	28
5.2.1. Población universo	28
5.2.2. Población de estudio	28
5.2.3. Muestra	28
5.2.4. Definición de variables	28
5.3. PROCEDIMIENTO	29
5.3.1 Obtención de muestras	29
5.3.2 Amplificación de PCR y secuenciación	29
5.3.3 Análisis bioinformático de las secuencias que contienen el motivo EPIYA	31
6. RESULTADOS	32
6.1. Amplificación de la región 3' del gen <i>cagA</i>	32
6.2. Análisis bioinformático de los motivos EPIYA en aislamientos clínicos de <i>Helicobacter pylori</i>	35
7. DISCUSION	38
8. CONCLUSIONES	43
9. RECOMENDACIONES	44
BIBLIOGRAFIA	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definición de variables por escala y unidades de medición	28
Tabla 2. Condiciones amplificación gen <i>cagA</i>	30
Tabla 3. Tamaño de los productos de PCR de aislamientos clínicos de <i>H.pylori</i>	33
Tabla 4. Aislamientos de <i>H.pylori</i> con únicas bandas	34
Tabla 5. Aislamientos de <i>H.pylori</i> con múltiples bandas	34
Tabla 6. Motivos EPIYA en aislamientos de pacientes sin coinfección	37
Tabla 7. Motivos EPIYA en aislamientos de pacientes con coinfección	37
Tabla 8. Combinaciones de motivos EPIYA en pacientes con coinfección	37
Tabla 9. Asociación entre el número de segmentos EPIYA-C y cáncer gástrico	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de la infección por <i>Helicobacter</i> a nivel mundial.	17
Figura 2. Distribución mundial de la incidencia de cáncer gástrico y la prevalencia de la infección por <i>H.pylori</i>	19
Figura 3. Isla de patogenicidad (<i>cagPAI</i>).	20
Figura 4. Micrografía del sistema de secreción tipo IV	21
Figura 5. Ensamblaje y organización de proteínas que conforman el sistema de secreción tipo IV	22
Figura 6. Anatomía molecular de la región EPIYA que contiene CagA.	23
Figura 7. Diversidad estructural de CagA en la región EPIYA.	25
Figura 8. Mecanismo de acción de CagA	26
Figura 9. Análisis de los productos amplificados de la región 3' del gen <i>cagA</i> .	33
Figura 10. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la región 3' del gen <i>cagA</i>	35
Figura 11. Distribución total de los motivos EPIYA en los aislamientos Colombianos de <i>Helicobacter pylori</i> .	36

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria asociada con el desarrollo de enfermedades gastroduodenales como gastritis crónica, úlceras pépticas, linfoma tipo MALT y cáncer gástrico. El desarrollo de cáncer gástrico asociado con la bacteria, se ha relacionado fuertemente con el factor de virulencia CagA, una proteína que presenta sitios de fosforilación EPIYA que están relacionados con la capacidad oncogénica de la proteína. El objetivo de este estudio fue determinar los motivos EPIYA presentes en la proteína CagA en aislamientos de *Helicobacter pylori*.

Se analizaron 85 aislamientos de *H.pylori cagA* positivos y mediante PCR se amplificó la región 3' del gen *cagA*. Los productos de PCR fueron secuenciados y finalmente analizados con herramientas bioinformáticas. Adicionalmente para confirmar la predicción sobre el número de repeticiones EPIYA basados en el tamaño del producto de PCR se realizó re-amplificación y posterior análisis de secuenciación.

Se observó que el tamaño de los productos de PCR osciló entre 400pb - 700pb. 58 de los 85 aislamientos (68,2%) presentaron únicas bandas y 27 aislamientos (31,8%) dos o más bandas. La cepa de referencia NCTC11637 presentó única banda de 500pb.

Los aislamientos presentaron la siguiente distribución EPIYA: 7/85 AB (8,2%), 34/85 ABC (40%), 26/85 ABCC (30,6%) y 18/85 ABCCC (21,2%), sin embargo en 27 aislamientos existió coinfección con diferentes genotipos de *cagA* entre los más predominantes: 7 ABC-ABCC (26%) y 6 ABCC-ABCCC (22,2%).

Se identificó que todos los aislamientos poseen *cagA* de origen occidental siendo el motivo EPIYA ABC el más predominante (40%), sin embargo 51,8% de los aislamientos presentaron múltiples repeticiones EPIYA-C: 26/85 ABCC (30,6%) y 18/85 EPIYA-ABCCC (21,2%), indicando que la mitad de población de Bogotá-Colombia infectada con *Helicobacter pylori cagA* positivo tiene un alto riesgo de desarrollar cáncer gástrico

Palabras claves: *Helicobacter pylori*, proteína CagA y motivo EPIYA

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a bacterium associated with the development of gastro duodenal diseases such as chronic gastritis, peptic ulcers, MALT lymphoma and gastric cancer. The development of gastric cancer associated with *H.pylori* has been strongly related with the virulence factor CagA, protein having EPIYA phosphorylation sites, which are related with the oncogenic capacity of the CagA protein. The objective in this study, was to determine EPIYA motif present in the CagA protein in *Helicobacter pylori* isolates

85 *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains were analyzed and to amplify the 3' region of *cagA* gene by PCR. The PCR products obtained were sequenced and finally analyzed with bioinformatic tools, additionally to confirm this prediction about the number of EPIYA repeats, based upon size of the PCR amplicons, we perform re-amplification and subsequent sequencing analysis

We observed PCR products ranging in size between 400 bp to 700 bp. 58 of 85 *Helicobacter pylori* isolates (58, 2%) were observed a single band PCR product and 27 isolates (31, 8%) showed two or more bands. The reference strain NCTC 11637 exhibited to single band with size of 500 bp.

The Isolates showed the following distribution EPIYA: 7/85 AB(8,2%), 34/85 ABC(40%), 26/85 ABCC(30,6%) y 18/85 ABCCC (21,2%), however observed coinfection with different *cagA* genotypes in 27 isolates among the most predominant: 7 ABC-ABCC(26%) y 6 ABCC-ABCCC(22,2%).

We identified that all isolates were the Western *cagA* type being the most predominant EPIYA-ABC motif (40%), however 51, 8 % of isolates shown multiples EPIYA-C repetitions: 26/85 ABCC (30,6%) y 18/85 EPIYA-ABCCC(21,2%)

indicating that half of the population of Bogota- Colombia infected with *cagA* positive *Helicobacter pylori* have higher risk of cancer gastric.

Key words: *Helicobacter pylori*, CagA protein and EPIYA motif

1. INTRODUCCION

Helicobacter pylori (*H.pylori*) es una bacteria Gram negativa, patógena capaz de colonizar el epitelio gastrointestinal y subsistir en el ambiente ácido del estómago (1). Esta bacteria causa enfermedades gastroduodenales como gastritis crónica, úlceras pépticas y está asociada a linfomas tipo MALT y cáncer gástrico (2). De acuerdo a las estadísticas arrojadas por Globocan en el 2012 la incidencia de cáncer gástrico a nivel mundial es del 6,8% con 951,594 casos, siendo este el cuarto cáncer más común y la segunda causa de muerte por cáncer más frecuente a nivel mundial (3).

El cáncer gástrico es una enfermedad multifactorial, donde están involucrados antecedentes genéticos, factores ambientales y la infección por *H.pylori*. Dentro de las características atribuidas al microorganismo se encuentran los factores de virulencia, entre los cuales el más estudiado e importante es la proteína CagA (4-5).

CagA es una proteína altamente polimórfica, 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 (36). Luego de ser fosforilada, CagA interactúa con la tirosina fosfatasa (SHP-2) una oncoproteína que se ha visto asociada a procesos malignos en humanos causando de esta manera que se generen cambios morfológicos en la célula epitelial (7, 34).

En la proteína CagA existen 4 segmentos peptídicos EPIYA (A, B, C, D) que se combinan contribuyendo al polimorfismo de esta proteína, en donde 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 (6),

dicho segmento D presenta una alta afinidad de unión a la proteína SHP-2 a diferencia del segmento C, presentando así una mayor actividad morfogenética (8).

Sin embargo existen variaciones de la proteína las cuales se relacionan con el número de segmentos y con sus repeticiones en CagA, encontrando que en la proteína CagA occidental, el número de repeticiones EPIYA-C se correlaciona directamente 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 (8). Debido a que son pocos los estudios realizados en Bogotá que determinen los sitios de fosforilación EPIYA, el objetivo de este estudio fue determinar los motivos EPIYA presentes en la proteína CagA en aislamientos de *Helicobacter pylori*.

2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En 1994, *Helicobacter pylori* fue clasificado como carcinógeno tipo I por la Agencia Internacional de Investigaciones del Cáncer y es considerado como un factor primario para el desarrollo de cáncer gástrico (CG), siendo este el cuarto cáncer más común, la segunda causa de muerte por cáncer más frecuente a nivel mundial y la primera causa de muerte por cáncer en Colombia (3).

El cáncer gástrico producido por la bacteria es atribuido a uno de sus factores de virulencia: la citotoxina CagA, la cual es una proteína que es inyectada al interior de la célula gástrica a través de un sistema de secreción tipo IV. A nivel intracelular la citotoxina activa vías de señalización que se reflejan en alteraciones en la estructura celular, uniones epiteliales, diferenciación celular entre otros (15)

CagA puede dividirse en dos tipos de acuerdo a los sitios de fosforilación EPIYA: occidental (EPIYA-C) y oriental (EPIYA-D), encontrándose que poblaciones que expresan una alta incidencia de cáncer gástrico están estrechamente relacionadas con el CagA de tipo oriental y por el contrario las poblaciones de África, Asia del Sur y Europa que expresan una baja incidencia de cáncer gástrico están relacionadas con el CagA de tipo occidental (12).

En Colombia la prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* es del 80% al 90% y el cáncer gástrico es la primera causa de muerte por cáncer en el país (2). A pesar de estas estadísticas, existen pocos estudios realizados en Colombia que profundicen en el conocimiento de los factores de virulencia de la bacteria y su relación con el desarrollo de cáncer gástrico, por lo tanto en este estudio se analizó el origen y la distribución de los motivos EPIYA presentes en la proteína CagA de aislamientos colombianos procedentes de la ciudad de Bogotá. Adicionalmente se describió la circulación actual de los aislamientos presentes en la población estudiada, contribuyendo de esta manera al conocimiento de la carcinogénesis gástrica en la ciudad de Bogotá.

3. MARCO TEORICO

Helicobacter pylori es una bacteria que pertenece a la subdivisión *Proteobacteria*, orden *Campylobacteriales* y a la familia *Helicobacter*, es patógena, Gram negativa, mide de 2-4 μm de largo y de 0,5 a 1 μm de ancho, posee de 4-8 flagelos polares, es microaerofílica (5% de oxígeno, 10% dióxido de carbono) y crece de 3-5 días a una temperatura de 37°C observándose en el cultivo colonias pequeñas, brillantes y translúcidas que son catalasa, oxidasa y ureasa positiva (9).

La prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* a nivel mundial se encuentra entre el 50% y el 90%, la cual varía entre países desarrollados y países en vía de desarrollo, siendo los países en vía de desarrollo quienes presentan una mayor prevalencia de la infección (70-90%). En el caso de Colombia la prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* es alta (80% al 90%) (Figura 1), en la cual más del 50% de la población se encuentra infectada a los 10 años de edad, mientras que en los países desarrollados solo del 5% al 10% de los niños están infectados a los 10 años de edad (10).

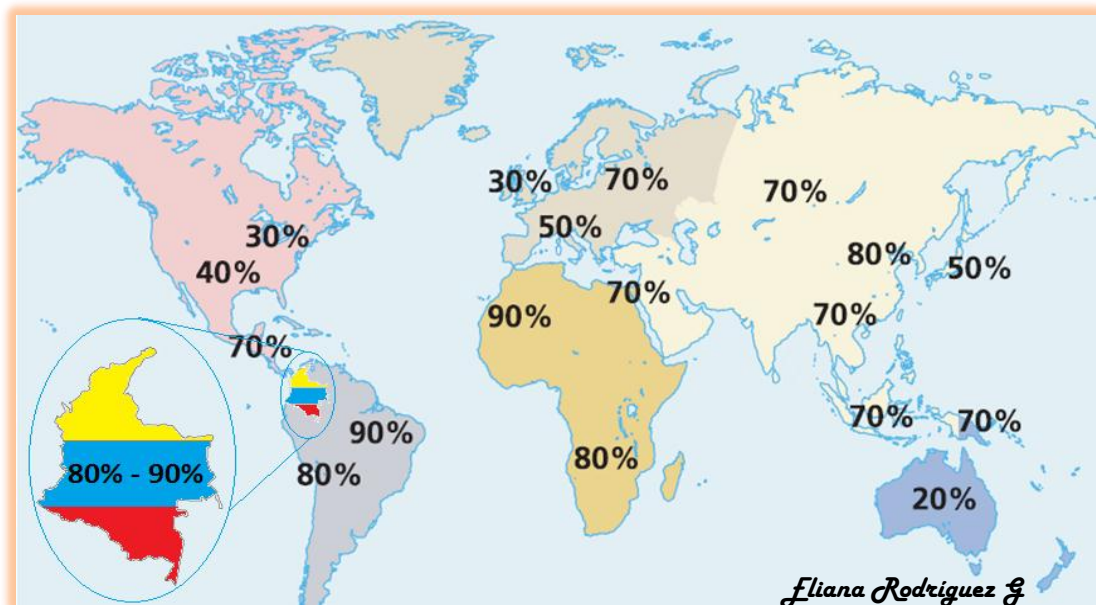


Figura 1. Prevalencia de la infección por *Helicobacter* a nivel mundial.

A partir del descubrimiento de la infección por *H. pylori* en 1983 por los médicos australianos Barry Marshall y Robín Warren de un cultivo de mucosa gástrica (5) se ha fomentado un gran interés acerca de realizar estudios relacionados con este microorganismo patógeno de los cuales se han estudiado sus vías de trasmisión y aunque del todo aún no se conoce cuál es la principal vía, se han descrito estudios encontrando que las posibles vías de trasmisión son oral-oral, fecal-oral aunque también se ha encontrado que ingerir agua contaminada es una fuente potencial de trasmisión (11).

Helicobacter pylori coloniza el epitelio gástrico y causa enfermedades gastroduodenales como gastritis crónica, úlceras pépticas y se asocia a linfomas tipo MALT y cáncer gástrico (1). Se estima que los pacientes con *H. pylori* positivo, el 100% desarrollan gastritis crónica, del 10 al 20% úlcera péptica y del 1-2% cáncer gástrico (2).

El cáncer gástrico es una enfermedad multifactorial en donde están involucrados antecedentes genéticos (polimorfismos IL-1B-511T, TNF-308 y IL-1RN*2/*2), factores ambientales (dieta-adición de sal, tabaquismo), ubicación geográfica y la infección por *H.pylori*. Dependiendo el área geográfica, existen diferencias entre la incidencia de cáncer gástrico y la infección por *Helicobacter pylori* (12), en donde se observa que en las poblaciones del Este de Asia la prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* es del 50-80% y la incidencia por cáncer gástrico es de 73,6/100.000 habitantes, a diferencia de lo encontrado en África donde la prevalencia de la infección por *H.pylori* es alta (79-90%) pero la incidencia de cáncer gástrico es de 2,8/100.000 habitantes (Globocan, 2012) dando origen al enigma africano: el cual existe una alta prevalencia de la infección pero una baja incidencia de cáncer gástrico (Figura. 2) (13). Esto puede ser explicado según Correa P *et al.*, 2010 a la presencia de aislamientos CagA positivos de origen occidental con un EPIYA ABC con raras repeticiones del segmento C y también puede deberse al parasitismo intestinal por helmintos, el cual modifica la respuesta inmune a la infección por *Helicobacter pylori* hacia una reacción de tipo

antiinflamatorio mediado por células T ayudadoras tipo 2 (Th2), contrastando con la respuesta inmunológica en ausencia de helmintos que es de tipo proinflamatorio (Th1), este tipo de respuesta Th1 está asociado con mayor grado de atrofia gástrica, debido a que genera una respuesta inflamatoria mediada por interleuquina 1 (IL-1) , interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), a diferencia de la respuesta Th2 la cual esta mediada por la producción de IL-4, IL-6, IL-10 y IL-13.

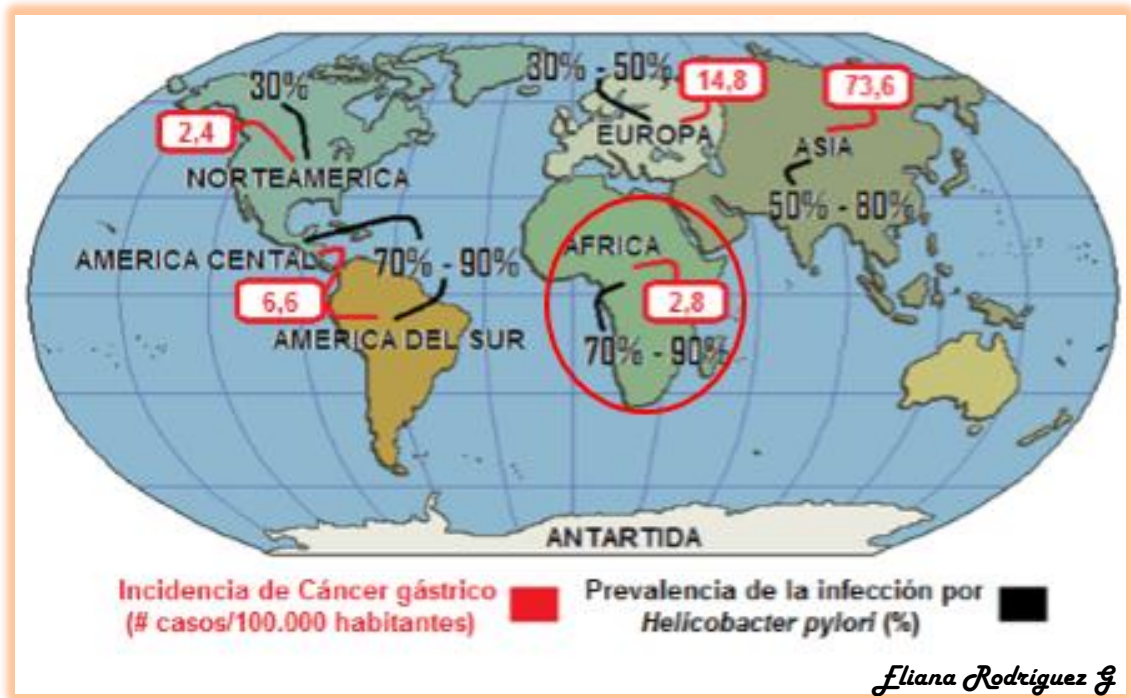


Figura 2. Distribución mundial de la incidencia de cáncer gástrico y la prevalencia de la infección por *H.pylori*

CagA es una proteína polimórfica, altamente inmunogénica, tiene un peso molecular de 120-140 KDa, presenta una diversidad estructural compuesta por una región N-terminal, C-terminal y una región de repetición EPIYA. Esta codificada por el gen *cagA*, el cual se encuentra localizado en el extremo de la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*), la cual está constituida por un segmento de ADN

de 40-Kb, por un contenido de G+C del 35% y participa en la capacidad infecciosa de la bacteria. *cagPAI* está rodeada por secuencias de repeticiones directas (DR), por secuencias de inserción y adicionalmente está constituida por dos regiones *cagI* y *cagII*, en la cuales en la región *cagI* se encuentra el gen *cagA* y en la región *cagI* y *cagII* se encuentran genes que codifican para el sistema de secreción tipo IV (7,8) (Figura 3)

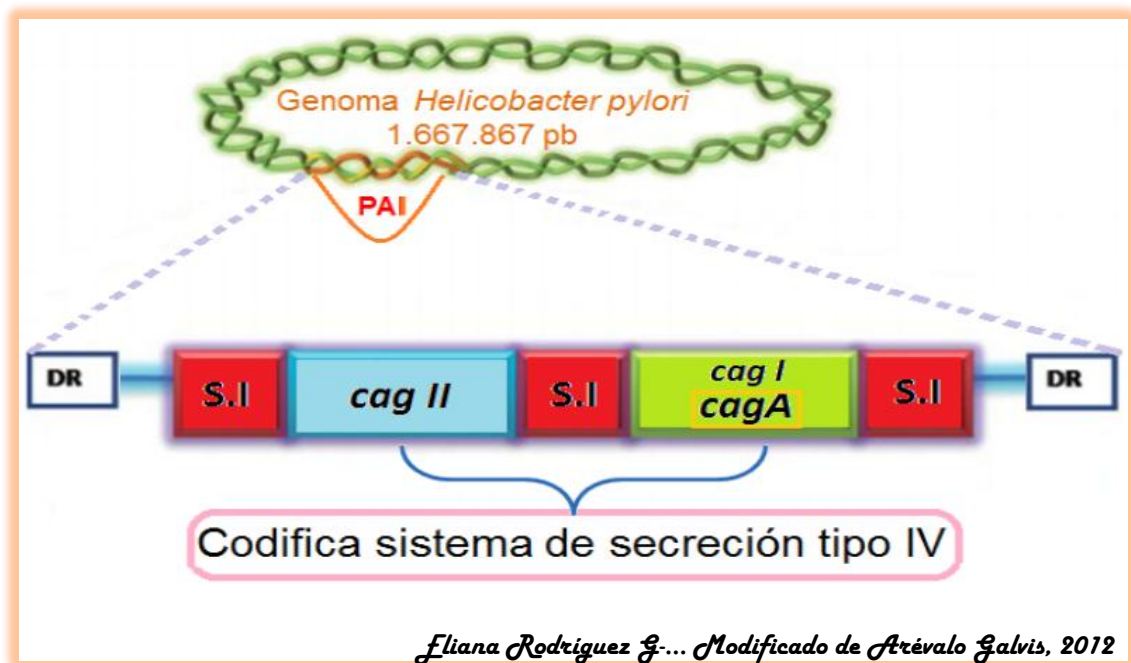


Figura 3. Isla de patogenicidad (*cagPAI*).

El sistema de secreción tipo IV inyecta CagA en las células epiteliales gástricas del hospedador (7,12). Su morfología se ha observado a través de micrografía electrónica y se ha visualizado que es un organelo filamentoso localizado en un polo de la superficie bacteriana y es conocido como una jeringa molecular que inyecta la citotoxina CagA en la célula epitelial gástrica (Figura 4) (14).

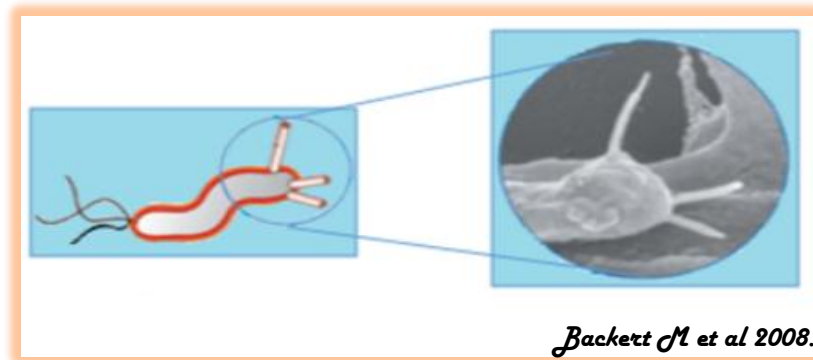


Figura 4. Micrografía del sistema de secreción tipo IV

El sistema de secreción tipo IV está compuesto por proteínas que se ensamblan para formar dicho sistema, como primera medida se encuentra a nivel de membrana interna la proteína chaperona (CagF), a nivel de peptidoglucano la proteína (CagE) y a nivel de membrana externa se encuentran proteínas que hacen parte del pili (CagC y CagL). Una vez ensamblado el sistema de secreción tipo IV, para que CagA pueda transportarse a la célula epitelial, se requiere que el sistema de secreción tipo IV interactúe con un receptor en la célula huésped llamada la integrina $\alpha 5\beta 1$. Posteriormente dicha integrina interactúa con la proteína CagL, causando la inyección del SSTIV en la célula gástrica, abriendo un poro y finalmente la proteína CagA es translocada en la célula epitelial gástrica (Figura 5) (14, 15).

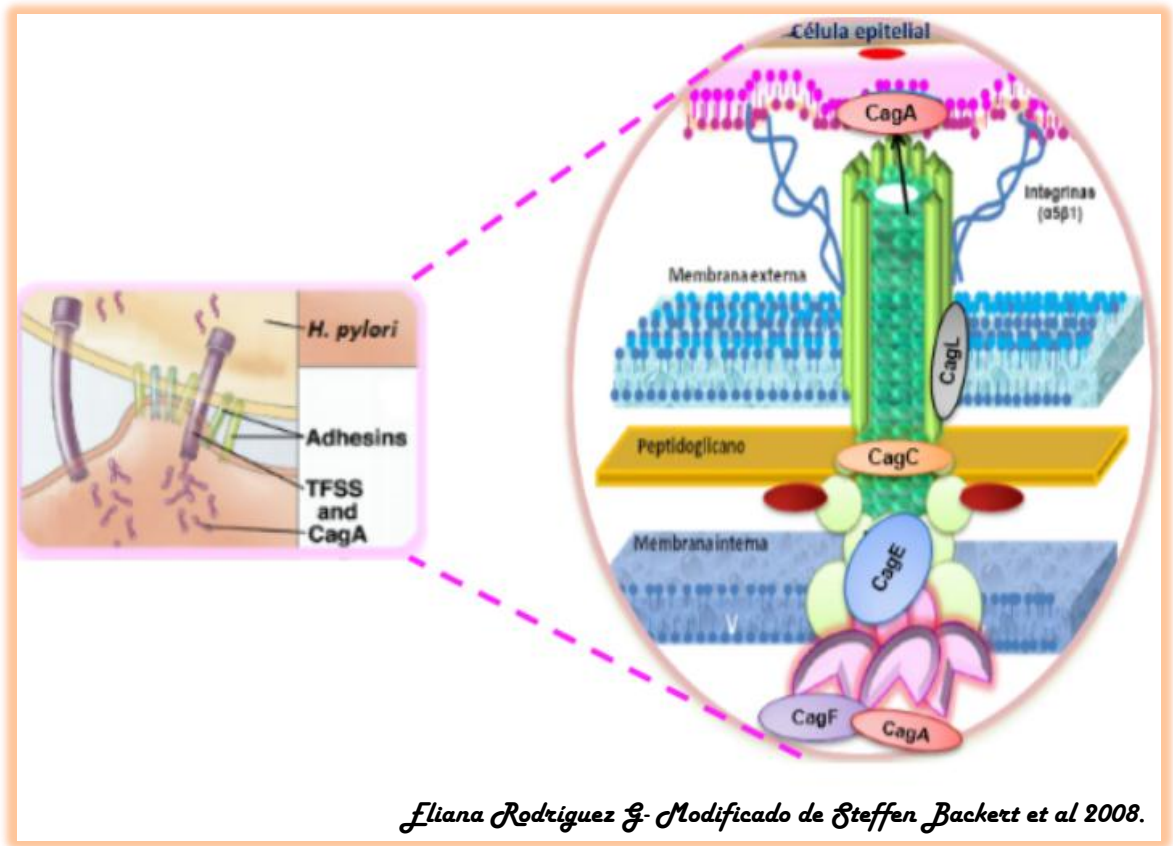


Figura 5. Ensamblaje y organización de proteínas que conforman el sistema de secreción tipo IV

Una vez CagA se encuentra en la célula epitelial gástrica, esta es fosforilada por la familia de las Src quinasas y dicha fosforilación se lleva a cabo en los residuos de tirosina en los motivos denominados EPIYA (Glu, Pro, Ile, Tyr, Ala). CagA puede variar de tamaño entre las distintas cepas de *H. pylori*, esta variación proviene de la presencia de números de repeticiones del motivo EPIYA. Existen cuatro segmentos EPIYA distintos (A, B, C, D) cada segmento está rodeado por una secuencia de aminoácidos, 32 aminoácidos, 40 aminoácidos, 34 aminoácidos y 47 aminoácidos respectivamente (Figura 6a) (6). La proteína CagA que contiene EPIYA-A y EPIYA-B seguida por repeticiones de EPIYA-C es frecuente en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes occidentales, mientras que la proteína CagA

que contiene EPIYA-A y EPIYA-B seguida por EPIYA-D es frecuente encontrarlo en cepas aisladas de pacientes asiáticos (Figura 6b) (16).

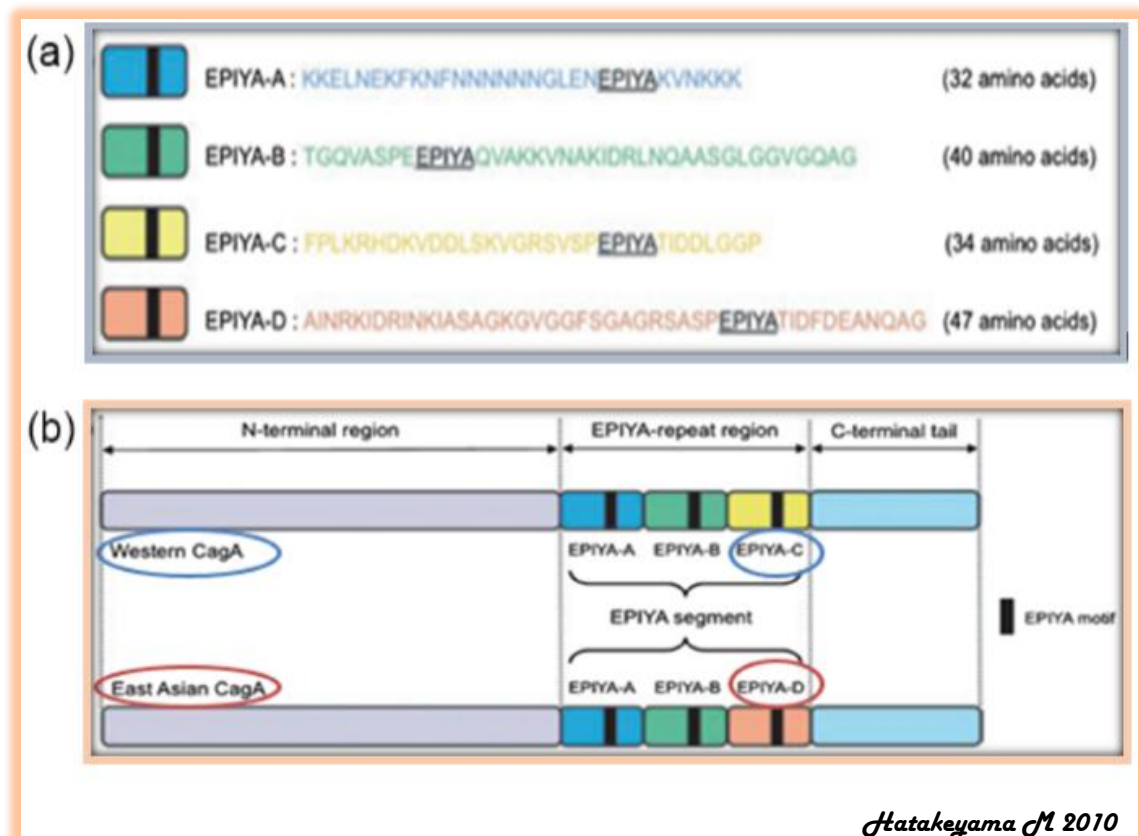


Figura 6. Anatomía molecular de la región EPIYA que contiene CagA.
 (a) Secuencias de aminoácidos de cada motivo EPIYA.
 (b) Subdivisión de CagA: occidental y oriental

Las proteínas CagA de origen occidental presentan diferentes combinaciones, en donde el 66,5% presentan un EPIYA ABC, un 20,3% un EPIYA ABCC y un 4,0% un EPIYA ABCCC (Figura 7a), dichas repeticiones se correlacionan con los niveles de fosforilación de la tirosina, es decir que las proteínas CagA occidentales con mayor número de repeticiones EPIYA-C, presentan mayor fosforilación, cambios morfológicos más pronunciados en las células epiteliales y finalmente

mayor incremento en el riesgo de cáncer gástrico a diferencia de las que poseen un menor número de repeticiones EPIYA-C (8). En la literatura se encontraron 5 estudios que evaluaron el riesgo de desarrollar cáncer según el número de repeticiones EPIYA-C. Dos de estos 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 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 (23, 19,20).

En las proteínas CagA asiáticas, el segmento EPIYA-D rara vez se duplica y el 98,8% representa EPIYA ABD (Figura 7b), sin embargo la secuencia flanqueante del EPIYA-D presenta una mayor afinidad de unión con la secuencia consenso en el dominio SH2 de la proteína 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 de una fenilalanina por ácido ascórbico, generando así una menor afinidad de unión con la secuencia consenso de la proteína SHP-2 . Es por esta razón que la proteína CagA de origen asiático es más carcinogénica que la proteína CagA de origen occidental (6).

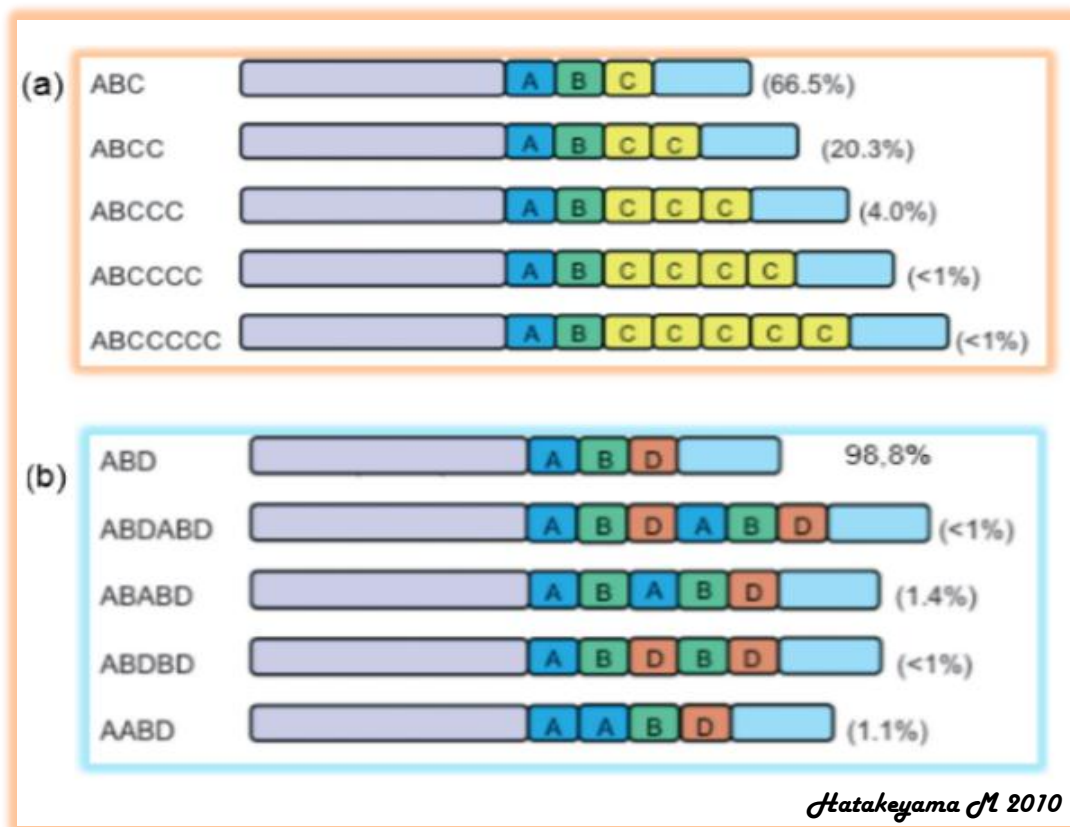


Figura 7. Diversidad estructural de CagA en la región EPIYA.
 (a) Polimorfismos del segmento EPIYA-C en aislamientos de tipo CagA occidental.
 (b) Polimorfismos del segmento EPIYA-D en aislamientos de tipo CagA oriental

Una vez CagA es fosforilada, interactúa con la tirosina fosfatasa (SHP-2) la cual es una oncoproteína que actúa en vías de señalización, regulación del crecimiento celular, morfogénesis y motilidad celular (15,34), dicha interacción CagA-SHP-2 activa la cascada Erk MAP quinasa tanto de manera dependiente como independiente a la fosforilación (Figura 8). De manera dependiente CagA al interactuar con SHP-2, conduce a la activación de ERK, activando NF-Kb el cual induce la producción de IL- 8. (21,35) Adicionalmente la interacción con SHP-2 estimula cascadas de señalización involucradas en la reorganización del citoesqueleto, causando cambios morfológicos en la célula epitelial conocido como el fenotipo colibrí, el cual se caracteriza por una prominente elongación y propagación de la célula huésped (22).

Por otro lado, CagA interactúa con la quinasa CSK promoviendo una regulación negativa que conlleva a la disminución del complejo CagA-SHP-2, causando la desfosforilación de FAK quinasas que están involucradas en la adhesión focal (15)

CagA también causa efecto sobre la célula epitelial gástrica de manera independiente a la fosforilación, debido a que tiene la capacidad de unirse a Grb2, promoviendo la proliferación de las células epiteliales gástricas a través de la activación de la Ras-MAP quinasa. Además CagA tiene la capacidad de asociarse a proteínas de uniones estrechas como zonulina (ZO-1), a proteínas de adhesión celular como E-caderina y a la quinasa PAR1 promoviendo daños en uniones estrechas, uniones célula- célula, pérdida de polaridad e induciendo cambios en las células epiteliales cuyas alteraciones han mostrado tener un papel importante en la carcinogénesis gástrica. (24, 25,26) (Figura 8)

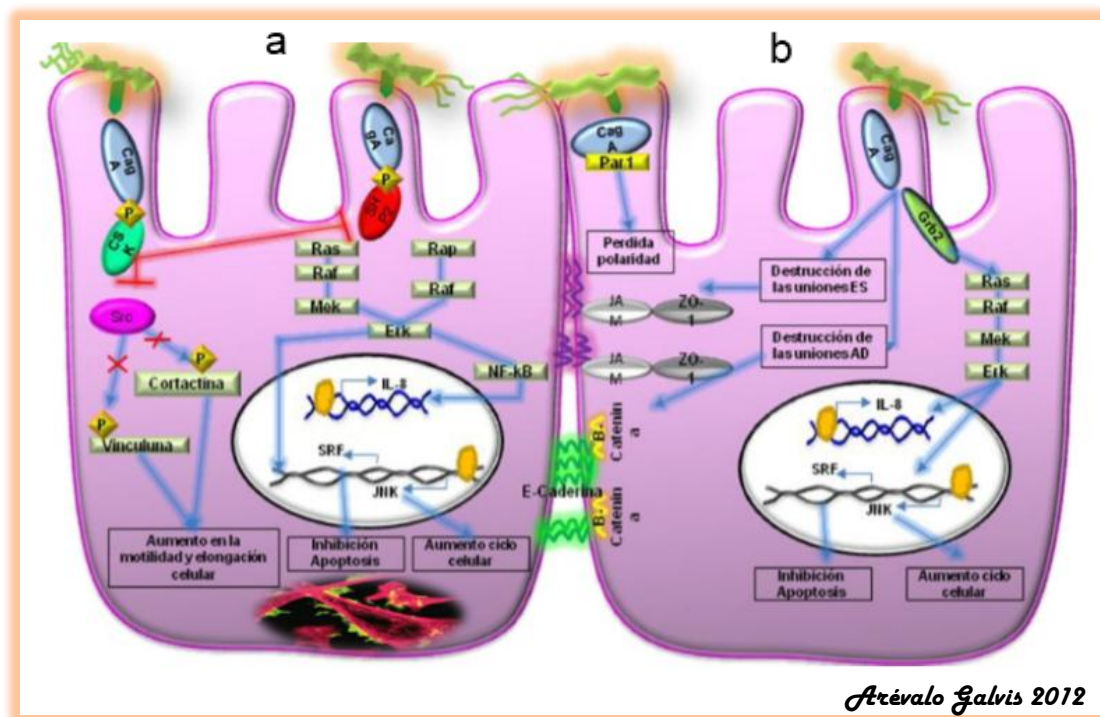


Figura 8. Mecanismo de acción de CagA
 (a). Dependiente de fosforilación
 (b). Independiente de fosforilación

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los motivos EPIYA presentes en la proteína CagA en aislamientos de *Helicobacter pylori*

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a. Identificar el origen oriental u occidental de los aislamientos de *Helicobacter pylori* presentes en la población estudiada.
- b. Analizar el número de repeticiones del motivo EPIYA relacionados con la capacidad oncogénica de la proteína CagA
- c. Caracterizar genéticamente los aislamientos de *Helicobacter pylori* en la población estudiada

5. METODOLOGIA

5.1. Diseño del estudio

El presente estudio es de tipo descriptivo retrospectivo, el cual se identificaron las variantes genéticas del factor de virulencia CagA de *H.pylori* procedentes de pacientes con dispepsia funcional entre los años 2009 y 2010

5.2. Población y muestra

5.2.1. Población universo: Aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* pertenecientes al estudio “Erradicación de *H. pylori*: Triple terapia con Levofloxacina”

5.2.2. Población de estudio: Aislamientos de *Helicobacter pylori cagA* positivos.

5.2.3. Muestra: El tamaño de muestra fue de 85 aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori cagA* positivos que se obtuvieron entre el año 2009-2010.

5.2.4. Definición de variables

El estudio evaluó la frecuencia de las variantes CagA de *Helicobacter pylori*.

Tabla 1. Definición de variables por escala y unidades de medición

TIPO DE VARIABLE	VARIABLE		ESCALA	UNIDAD DE MEDICIÓN
Dependiente	Variante CagA	Occidental	Nominal	Presencia/Ausencia
		Oriental	Nominal	Presencia/Ausencia
		EPIYA ABC	Nominal	Presencia/Ausencia
		EPIYA ABCC	Nominal	Presencia/Ausencia
		EPIYA ABCCC	Nominal	Presencia/Ausencia
Independiente	Edad		Razón	Años
	Genero		Nominal	Femenino/Masculino

5.3. PROCEDIMIENTO

5.3.1 Obtención de muestras

Los aislamientos clínicos de *H. pylori*, provenían de biopsias gástricas de antro y cuerpo de 85 pacientes (52 hombres y 33 mujeres) mayores de 18 años, con un promedio de edad de 53 años (rango 18-70 años), Estos pacientes fueron diagnosticados con dispepsia funcional en la Clínica Fundadores de Bogotá (2009-2010)

Los aislamientos fueron caracterizados y genotipificados molecularmente previamente por nuestro grupo de investigación y fueron almacenados en la Colección de Microorganismos en la Pontificia Universidad Javeriana Bogotá-Colombia

5.3.2 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 (27) 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 µl conteniendo 0,3µM de primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1µl de DNA genómico y 1U de Go-Taq master mix (Promega, Madison, USA).

Las condiciones de la PCR estandarizadas para la amplificación gen *cagA* fueron las siguientes:

Tabla 2. Condiciones amplificación gen *cagA*

Denaturación inicial	95°C por 10 minutos
Denaturación	95°C por 30 segundos
Hibridación	52,3°C por 30 segundos
Extensión	72°C por 36segundos
Extensión final	72°C por 5 minutos

Número de ciclos 39

Finalmente los productos de PCR fueron revelados en gel de agarosa (2%) con Syber Safe.

En los aislamientos en los que se observaron dos o más bandas, se realizó como estrategia metodológica la re-amplificación, en la cual cada banda de gel con diferentes tamaños de producto de PCR fue cortada a través de un transiluminador UV, posteriormente cada pedazo de gel de agarosa se le realizó purificación a través del Kit Wizard SV Gel and PCR Clean- Up System de Promega. Para determinar la concentración de DNA de cada muestra se utilizó espectrofotometría con NanoDrop 2000. Al DNA extraído y purificado a partir del gel de cada banda se le realizó nuevamente PCR y el producto final fue revelado en gel de agarosa al 2%.

Posteriormente los productos de PCR fueron enviados a secuenciar a MacroGen Inc., Korea en sentido Forward y Reverse por el método de Sanger. Se utilizó como control la cepa NCTC 11637 de tipo *cagA* occidental (EPIYA-ABC).

5.3.3 Análisis bioinformático de las secuencias que contienen el motivo EPIYA

Mediante el programa BLASTx en la plataforma NCBI se 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 W2 en EMBL-EBI se realizó el alineamiento de las secuencias peptídicas que contienen los motivos EPIYA.
(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>)

6. RESULTADOS

6.1. Amplificación de la región 3' del gen *cagA*

De acuerdo a lo reportado por Yamaoka *et al.*, 1999 (27), se realizó la estandarización de PCR realizando diferentes ensayos para evaluar distintas concentraciones de primers (0,1 μ M, 0,3 μ M y 0,5 μ M), volúmenes de DNA (1 μ l, 3 μ l, 5 μ l) y temperaturas de hibridación (48.3°C, 50.8°C, 52.3°C, 54.5°C). Finalmente se estandarizo la PCR con las siguientes condiciones:

Concentración de primers: 0,3 μ M

Volumen de DNA: 1 μ l

Temperatura de hibridación: 52,3°C

1U master mix Taq DNA polimerasa

A partir de la estandarización, se amplificó la región 3' del gen *cagA* de 85 aislamientos de *Helicobacter 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).

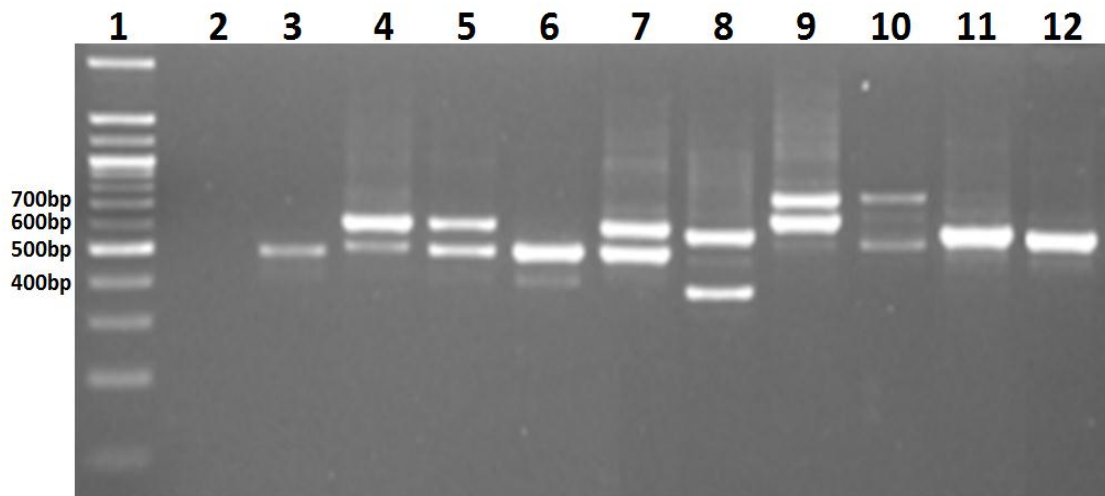


Figura 9. Análisis de los productos amplificados de la región 3' del gen *cagA*. Los DNA de los aislamientos de *H.pylori* fueron amplificados y los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa al 2% (carril 3-12). Se encontraron fragmentos de 400bp (carril 6,8), 500 pb (carril 3,4,5,6,7,11,12), 600 pb (carril 4,5,7,8,9) y 700 pb (carril 9,10). Carril 2: control negativo, carril 12: NCTC 11637, Carril 1: marcador de peso 100 pb (Promega, USA)

Tabla 3. Tamaño de los productos de PCR de aislamientos clínicos de *H.pylori*

Tamaño del producto (pb)	Nº Aislamientos
400	7
500	34
600	26
700	18

En 58 de los 85 aislamientos (68,2%), se observó la presencia de únicas bandas, 2 aislamientos presentaron un tamaño de 400pb, 24 aislamientos de 500pb, 18 aislamientos de 600pb y 14 aislamientos de 700pb (Tabla 4). Sin embargo en 27

de los 85 aislamientos (31,8%) se observó la presencia múltiples bandas, en donde la mayoría de los aislamientos presentaron dos bandas con tamaños que variaron entre 500, 600 y 700 pb. (Tabla 5) La cepa de referencia NCTC 11637 presento única banda de 500pb (Figura 9)

Tabla 4. Aislamientos de *H.pylori* con únicas bandas

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

Tabla 5. Aislamientos de *H.pylori* con múltiples bandas

Nº Aislamientos	Nº 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

6.2. Análisis bioinformático 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 ClustaW2, se observó que todas 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 EPIYATIDDLGPP. No se encontraron aislamientos de tipo *cagA* oriental EPIYA-D: EPIYATIDFDEANQAG (Figura 10)

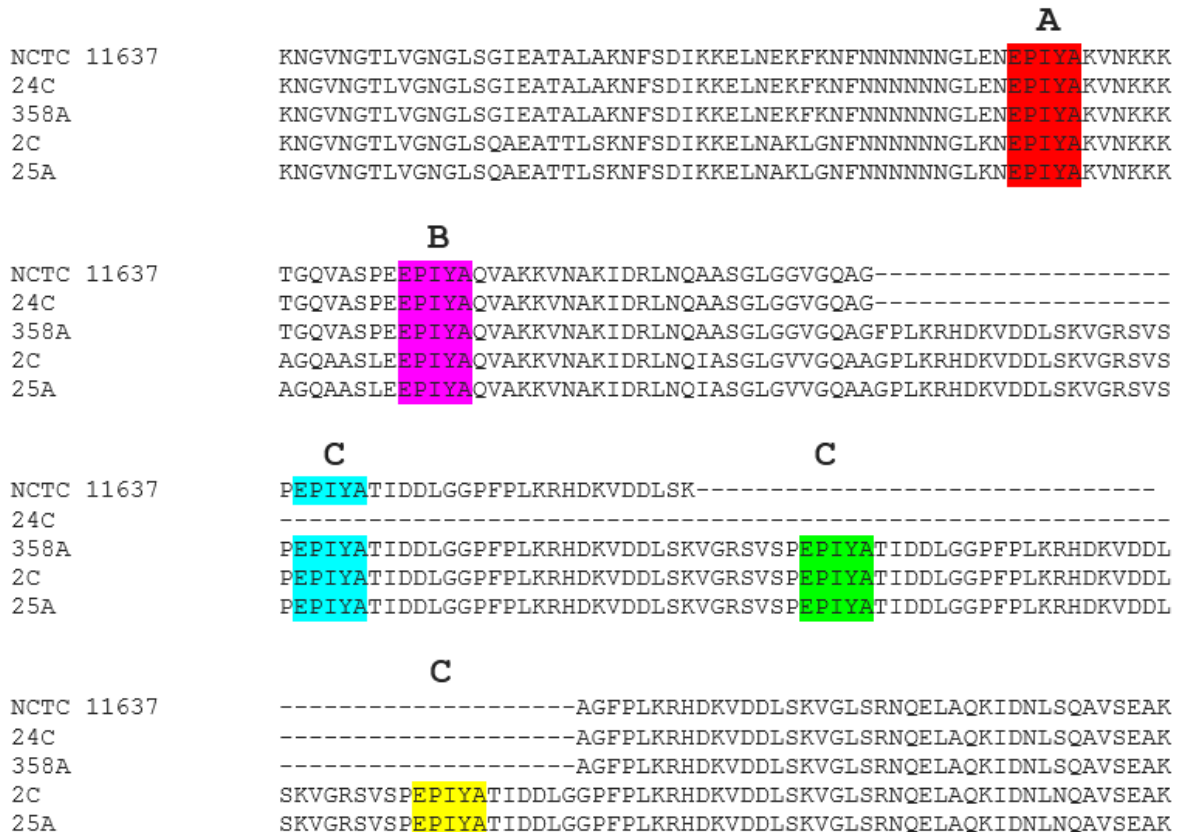


Figura 10. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la región 3' del gen *cagA* de 5 aislamientos colombianos de *Helicobacter pylori*.

La cepa de referencia NCTC11637 contiene el motivo EPIYA (ABC), la cepa 24C (AB), la cepa 358A (ABCC) y las cepas 2C y 25A (ABCCC).

La distribución total de los motivos EPIYA fue: 7/85 AB (8,2%), 34/85 ABC (40%), 26/85 ABCC (30,6%) y 18/85 ABCCC (21,2%) (Figura 11). 58 de los 85 aislamientos presentaron un solo genotipo *cagA* en el mismo paciente con la siguiente distribución EPIYA: EPIYA: 2 AB/58 (3,5%), 24/58 ABC (41,4%), 18/58 ABCC (31%), 14/58 ABCCC (24,1%) (Tabla 6). Sin embargo 27 aislamientos presentaron coinfección con diferentes genotipos *cagA* encontrando que el 44,5% de los aislamientos presentaron 2 y 3 repeticiones EPIYA-C (ABCC 8/27 (29,7%) y (ABCCC 4/27 (14,8%)) (Tabla 7). De los pacientes que presentaron coinfección, el 81,5% presentaron motivos EPIYA con 2 y 3 repeticiones EPIYA-C, siendo las combinaciones EPIYA más frecuentes: (ABC-ABCC 7/27 (26%) y 6/27ABCC-ABCCC (22,2%). Adicionalmente se encontraron coinfecciones con 3 patrones EPIYA (AB-ABC-ABCC 5/27 (18,5%), AB-ABC-ABCCC 1/27 (3,7%), AB-ABCC-ABCCC 1/27 (3,7%)) e incluso con 4 patrones EPIYA (AB-ABC-ABCC-ABCCC 2/27 (7,4%)) (Tabla. 8).

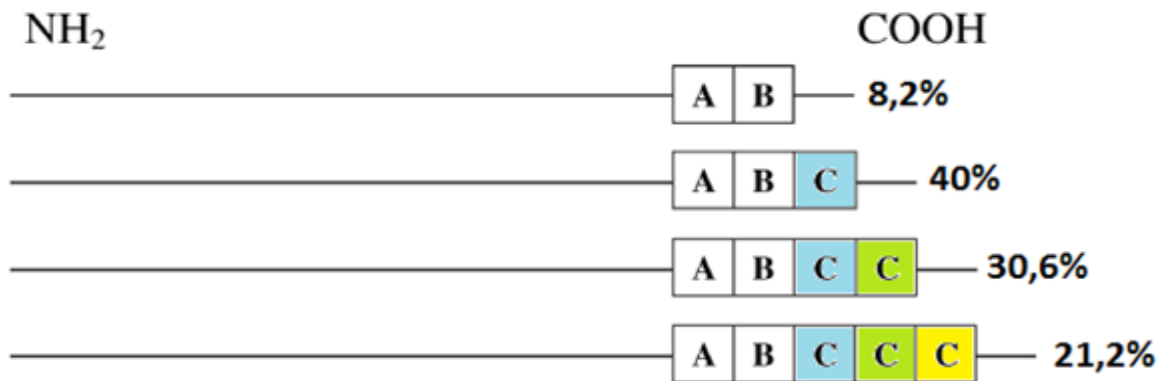


Figura 11. Distribución total de los motivos EPIYA en los aislamientos Colombianos de *Helicobacter pylori*.

Tabla 6. 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 7. Motivos EPIYA en aislamientos de pacientes con coinfección

Nº Aislamientos	Tipo de motivo EPIYA	% motivo EPIYA
5	AB	18,5
10	ABC	37
8	ABCC	29,7
4	ABCCC	14,8

Tabla 8. Combinaciones de motivos EPIYA en pacientes con coinfección

Nº 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

7. DISCUSION

Todos los aislamientos incluidos en este estudio presentaron *cagA* de tipo occidental, no se encontraron aislamientos de tipo *cagA* oriental en nuestra población, estos resultados concuerdan con lo reportado por Yamaoka *et al* 1999, Quiroga *et al* 2010 y Schneider *et al* 2010 quienes en sus estudios también incluyeron pacientes Colombianos (27, 20, 28). Adicionalmente estudios realizados en Europa, América y África (15, 16,17 y18) reportan la presencia de *cagA* de tipo occidental, lo cual verifica lo planteado por Hatakeyama *et al* 2010 y Suzuki *et al* 2012 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 (6,7)

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 y Batista *et al* 2011 (20,19). Sin embargo Torres *et al* 2012 y Panayotopoulou *et al* 2006 (29,16) reportan la presencia de algunos aislamientos con segmentos EPIYA-A pero no EPIYA-B, lo cual explican se debe a la presencia de deleciones de aminoácidos en el segmento EPIYA-B, reflejando de esta manera la alta recombinación intragénica de la región variable de *cagA*. Tanto los resultados de estos autores como los encontrados en este estudio, confirman lo reportado por Hatakeyama *et al* 2012, quien afirma que los segmentos EPIYA-A y EPIYA-B se encuentran en casi todos los aislamientos *cagA* positivos (6)

De los aislamientos *cagA* de tipo occidental se observó la presencia de uno a tres segmentos 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 quién encontró que el 51,8% de los aislamientos

presentaron EPIYA-ABC, Yamaoka *et al* 1999 el 55% y Quiroga *et al* 2010 el 49% (30,27,20) Dichos resultados sustentan lo afirmando por Hatakeyama *et al* 2010, quien describe que la mayoría de los aislamientos *cagA* occidentales presentan un motivo EPIYA-ABC (6).

De acuerdo a la distribución de los motivos EPIYA, se encontró que el 51,8% de los aislamientos presentaron múltiples repeticiones EPIYA-C (ABCC: 30,6%-ABCCC: 21,2%), siendo este porcentaje, mayor a lo encontrado en los estudios realizados en Colombia por Yamaoka *et al* 1999 a quien reporto que 31% de los aislamientos presentaron múltiples EPIYA, Sicinschi *et al* 2010 el 35,8%, Schneider *et al* 2010 el 37% y Quiroga *et al* 2010 el 41% (27,30,28,20). Estas diferencias pueden ser explicadas, debido a que los estudios anteriores incluyeron pacientes con diferentes patologías (gastritis, úlceras, 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 los motivos EPIYA y se ha encontrado menor número de aislamientos con múltiples EPIYA-C que los encontrados en este estudio: Grecia (20,7%), Cuba (22.1%), México (33,4%) y USA (14,8%) (16,29,22,27), 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* (40,22,41) 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

patologías (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 último explicaría que las múltiples repeticiones EPIYA-C encontradas en este estudio, pueden estar también relacionadas con la alta incidencia de cáncer gástrico en Colombia, ya que según Torres *et al* 2012, Basso *et al* 17 y Sicinschi *et al* 2010, los aislamientos *cagA* occidentales que poseen mayor número de segmentos EPIYA-C son más carcinogénicos que los que poseen menos repeticiones, así como lo reportan los siguientes estudios realizados a nivel mundial (Tabla 9) (29,17,30).

Tabla 9. Asociación entre el número de segmentos EPIYA-C y cáncer gástrico

AUTORES	PAIS	REPETICIONES EPIYA-C	OR	IC 95%*
Ferreira R <i>et al</i> 2012	Portugal	2 o más EPIYA-C	51	13-198*
Basso D <i>et al</i> 2008	Italia	2 o más EPIYA-C	32,5	8,41-125.58*
Anaya F <i>et al</i> 2014	México	2 EPIYA-C	5,9	1.5-22.1*
Batista S <i>et al</i> 2011	Brasil	2 y 3 EPIYA-C	3,08	1.74-5.45*
Quiroga A <i>et al</i> 2010	Colombia	3 EPIYA- C	12,4	2.32-66.3*

* $p < 0.003$

Sin embargo otros estudios uno realizado en Colombia, en Venezuela y otro en Irán (37,38,39), no encontraron asociación entre el número de motivos EPIYA y diferentes enfermedades gastroduodenales asociadas a la infección por *H. pylori* y esto puede ser explicado a que aunque CagA es el marcador de virulencia de *H. pylori* asociado a cancer gástrico, únicamente la determinación de CagA no es suficiente para predecir un resultado clínico, ya que el cáncer gástrico es una enfermedad multifactorial donde además de la infección por *Helicobacter pylori* deben tenerse en cuenta otros factores como características genéticas del individuo y variables como dieta, adición de sal, tabaquismo entre otros, que también pueden influir en el desarrollo de cancer gástrico. Adicionalmente estas

diferencias pueden también deberse al diseño de los estudios, a las variaciones geográficas y al tamaño de la muestra analizada.

Según Suzuki *et al* 2012 y Alarcón *et al* 1999 en países occidentales, aproximadamente el 60% de los aislamientos de *H.pylori* son *cagA* positivos (7,31). En el caso puntual de Colombia, Arévalo *et al* 2012 reporta la presencia de *cagA* en el 71% de los aislamientos (32), lo que significa que de los aislamientos *cagA* positivos analizados, 21,2% de la población tiene un riesgo 12 veces más de desarrollar cáncer gástrico presentando 3 repeticiones EPIYA-C (20).

27 de los 85 aislamientos analizados, presentaron múltiples bandas en el mismo paciente, similar a lo reportado por Yamaoka *et al* 1999, quien en su estudio encontró más de 26 aislamientos con dos o más bandas (27), 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, Argent *et al* 2004, Torres *et al* 2012.

Para confirmar esta predicción de coinfección, se realizó como estrategia metodológica la re-amplificación, siendo este el primer estudio en Colombia que utiliza este método, encontrando que cada una de las múltiples bandas son secuencias *cagA* específicas y que existe coinfección con diferentes genotipos de *cagA*. Este método aunque fue costoso y dispendioso, presenta una gran robustez debido a que ayudo a predecir exactamente de acuerdo al tamaño de cada banda los motivos EPIYA correspondientes, lo cual adicionalmente fue confirmado con secuenciación. Sin embargo otras metodologías como la realización de 3 PCR, a partir del diseño de primers específicos para *cagA* occidental, *cagA* oriental, segmento EPIYA A, EPIYA B y EPIYA C han sido utilizadas en los estudios de Argent *et al* 2005 y Torres *et al* 2012, consiguiendo igualmente detectar coinfección con cepas con más de un motivo EPIYA en el mismo paciente (33,29).

Dicha coinfección según Panayotopoulou *et al* 2006 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 (16); razón por la cual se observó la presencia de múltiples genotipos de *cagA* en el mismo paciente. Los genotipos mayormente encontrados en los pacientes fueron EPIYA-ABCC y EPIYA-ABCCC, lo cual significa que estos pacientes pueden presentar un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico que los pacientes que presentaron menor número de repeticiones EPIYA-C.

8. CONCLUSIONES

Se identificó que todos los aislamientos analizados poseen *cagA* de origen occidental, siendo el motivo EPIYA ABC (40%) el más frecuente en la población estudiada. Sin embargo de acuerdo a la distribución de los motivos EPIYA el 51,8% de los aislamientos presentaron múltiples repeticiones EPIYA-C: 26/85 ABCC (30,6%) y 18/85 EPIYA-ABCCC (21,2%), indicando así que la mitad de la población analizada, infectada con *Helicobacter pylori cagA* positivo tiene alto riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

Se confirmó con la estrategia de re-amplificación, la correlación entre los diferentes tamaños de productos de PCR y los motivos EPIYA (EPIYA AB: 400pb, EPIYA ABC: 500pb, EPIYA ABCC: 600pb y EPIYA ABCCC: 700pb)

Se observó que un paciente puede presentar coinfección con diferentes genotipos de *cagA*, de los cuales el 81,5% del total de los pacientes con coinfección presentaron motivos EPIYA con 2 y 3 repeticiones EPIYA-C, indicando que la población estudiada tiene un alto riesgo de desarrollar cáncer gástrico si la infección no es erradicada.

9. RECOMENDACIONES

- Conociendo la circulación actual de los aislamientos colombianos en la ciudad de Bogotá, es necesario realizar estudios poblacionales que incluyan distintas ciudades o regiones del país, en donde se realice una asociación de los motivos EPIYA con diferentes patologías y otras variables como la edad y sexo de los pacientes.
- Adoptar los patrones de bandeado por análisis de PCR convencional para determinar los motivos EPIYA en pacientes con coinfección
- Se recomienda realizar posteriores estudios donde se analice la influencia de las secuencias EPIYA con eventos epigenéticos, debido a que CagA y los motivos EPIYA generan un proceso inflamatorio y daño severo en la mucosa gástrica, induciendo así posiblemente mayores cambios epigenéticos.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Blumberg R, Burakoff R, Greenberger N. Diagnóstico y Tratamiento en gastroenterología, hepatología y endoscopia. Infección por *Helicobacter pylori*. México D.F: McGraw-Hill interamericana., 2011, pp 600-624
- 2 Otero W, Trespalacios A, Otero E. *Helicobacter pylori*: Tratamiento actual. Un importante reto en gastroenterología. Rev Col Gastroenterol 2009; 24: 279-292
- 3 Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F.GLOBOCAN 2012, Cáncer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CáncerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
- 4 Piazzuelo MB, Epplein M, Correa P. Gastric cancer: an Infectious Disease. Infect Dis Clin North Am 2010; 24:853-869
- 5 Kusters J, Van Vliet A, Kuipers J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; **19** (3): 449- 490.
- 6 Hatakeyama M. Anthropological and clinical implications for the structural diversity of the *Helicobacter pylori* CagA oncoproteina. *Cáncer Sci.* 2010; 102: 36-43
- 7 Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. Molecular epidemiology, population genetics and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infection, Genetics and Evolution.* 2012; 12:203-21
- 8 Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci* 2005; 95:835-843
- 9 Kenneth L, McColl (2010) *Helicobacter pylori* Infection. *The new England Journal of Medicine* 362(17):1597-1604
- 10 Harris P, Serrani C, González C (2005) Utilidad del diagnóstico serológico de la infección por *Helicobacter pylori* en niños. *Rev. Chil. Pediatr* 76(3):241-251

- 11 Posse R, Toledo R., Cabral M.: *Helicobacter pylori*: clínica, diagnóstico y tratamiento. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina* 2006; 158: 9-12
- 12 Yamaoka Y, Kato M, Asaka M (2008) Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Internal medicine* 47(2):1077-1083
- 13 Correa P, Ghoshal U, Chaturvedi R. The enigma of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer *Indian J Gastroenterol* 2010; 29:95-100
- 14 Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cellular Microbiology*. 2008; 10: 8: 1573-1581.
- 15 Kutter S, Buhrdorf R, Haas J, Schneider-Brachert W, Haas R, Fischer W. Protein Subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag Type IV Secretion System Revealed by Localization and Interaction Studies. *Journal of Bacteriology*. 2008; 190: 6 2161-2171.
- 16 Panayotopoulou E, Sgouras D, Papadakos K, Kalliaropoulos A, Papatheodoridis G, Mentis A and Archimandritis A (2006) 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* 45:488-95
- 17 Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology*. 2008; 135:91-98
- 18 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

- 19 Batista S, Rocha G, Rocha A, Saraiva I, Cabral M, Oliveira R, Queiroz D. 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
- 20 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 2010; 30:251-258
- 21 Hatakeyama M. Oncogenic Mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4: 688-694.
- 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
- 23 Anaya F, Poblete T, Roman A, Reyes S, Sampedro J, Zaragoza O, Rodriguez M The EPIYA-ABCC motif pattern in CagA of *Helicobacter pylori* is associated with peptic ulcer and gastric cancer in Mexican population 2014; 12:223-234
- 24 Arévalo G. A, Trespacios A.A, Otero W. Importancia de la proteína *cagA* en infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2009; 24 (4): 388-395.
- 25 Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Sait Y, Lu H, Ohnishi N, Azuma T, Suzuk A, Ohno S, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*. 2007; 447: 330-333.
- 26 Wen S, Moss S.F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Letters*. 2009; 1-8.
- 27 Yamaoka Y, Zimaity H, Gutierrez O, Figura N, Kim J, Kodama T, Kashima K, Graham D. Relationship between the *cagA* 3' repeat region of *Helicobacter pylori*,

gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology* 1999; 117:342–349

28 Schneider N, Krishna U, Gallo J, Israel D, Piazuolo B, Camargo MC, Sicinski L, Schneider B, Correa P. Role of *Helicobacter pylori* CagA molecular variations in induction of host phenotypes with carcinogenic potential 2010; 15: 1218-1221

29 Torres L, Gonzalez L, Melian K, Alonso J, Moreno A, Hernandez M, Reyes O, Bermudez L, Campos J, Perez G. EPIYA motif patterns among Cuban *Helicobacter pylori* CagA positive strains. *Biomedica*. 2012; 32:23-31

30 Sicinski 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.

31. Alarcon T, Domingo D, Martinez MJ, Lopez-Brea M. *cagA* gene and *vacA* alleles in Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients of different ages. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1999; 24: 215-21

32 Arevalo A, Trespacios AA, Otero W, Mercado MM, Piñales RA Prevalence of *cagA*, *vacA*, *babA2* and *iceA* Genes in *H. pylori* Strains Isolated from Colombian Patients with Functional Dyspepsia. *Polish Journal of Microbiology* 2012; 61: 33-40

33 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.

34 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

35 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 Sci USA* 2005; 102:9300-9305

- 36 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
- 37 Acosta N, Quiroga A, Delgado P, Bravo M, Jaramillo C. Helicobacter pylori CagA protein polymorphisms and their lack of association with pathogenesis. World J Gastroenterol. 2010; 16:3936–43
- 38 Izarra KE, Borges YH, Rios EJ, Siervo MA. Variantes del motivo EPIYA de la proteína CagA de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas de pacientes con gastritis crónica de la región centrooccidental de Venezuela. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 2013; 33(1): 18-23.
- 39 Shokrzadeh L, Baghaei K, Yamaoka Y, Dabiri H, Jafari F, Sahebekhtiari N, et al. Analysis of 3' end variable region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolated from Iranian population. J Gastroenterol Hepatol. 2010; 25:172–7.
- 40 Aras R, Lee Y, Kim S, Israel D, Blaser M. Natural Variation in Populations of Persistently Colonizing Bacteria Affect Human Host Cell Phenotype. J Infect Dis. 2003; 188 (4): 486-496
- 41 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(7): 2227-2235