

Universidad Privada Antenor Orrego
Escuela de Postgrado



“Asociación entre los patrones EPIYA de cepas de *Helicobacter pylori* y alteraciones patológicas de la mucosa gástrica de pacientes dispépticos atendidos en Hospitales de 4 ciudades del norte del Perú”

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO DE CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

AUTOR : M.C. Gustavo Adolfo FLORES TRUJILLO.

ASESORA : Ph.D. Flor de María EVANGELISTA MONTOYA.

CO-ASESOR : Ph.D. Kevin WILKINSON.

Trujillo – 2017

DEDICATORIA

*A Dios, motivo de todas las cosas.
A mis padres que con su actuar me dan el
ejemplo para salir adelante.*

AGRADECIMIENTO

A Dios, motivo de todas las cosas.

*A mis padres que con su actuar me dieron el
ejemplo para siempre salir adelante.*

*A mis asesores por guiarme en esta aventura en
el mundo de la investigación.*

*A todos las personas que con su consejo me han
permitido ser cada día una mejor persona.*

*Al Programa Nacional de Innovación para la
Competitividad
y Productividad (**PNICP-Innovate Perú**) de
acuerdo al contrato 413-PNICP-PIBA-2014 por
el apoyo mediante el financiamiento otorgado
para la ejecución de este proyecto.*

RESUMEN

Objetivo. Determinar la asociación entre el tipo de patrones EPIYA en cepas de *Helicobacter pylori* CagA+ aisladas de pacientes dispépticos atendidos en Hospitales de 4 ciudades del norte del Perú y alteraciones patológicas (atrofia, metaplasia, displasia) de la mucosa gástrica.

Material y Métodos. Se realizó un estudio analítico observacional de corte transversal, en el que se evaluaron 164 aislamientos de *H. pylori* obtenidos a partir del cultivo de biopsias gástricas de pacientes dispépticos. Se extrajo el ADN genómico de cada aislamiento y fue sometido a la amplificación del gen *cagA* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para luego determinar el tipo de patrón EPIYA presente. Paralelamente, se realizó el análisis histopatológico de las biopsias gástricas para determinar las alteraciones patológicas (atrofia, metaplasia y displasia).

Resultados. De los 164 aislamientos de *H. pylori* analizados, se encontró que el 91.5% poseen el gen *cagA* en su genoma. Se encontraron 13 tipos de patrones EPIYA: A, AABBC, AABBC, AB, ABBBC, ABBC, ABC, ABCC, ABCCC, AC, ACC, BC, BCC; siendo el más frecuente el patrón ABC. El mismo que se presentó con mayor frecuencia en biopsias con atrofia y con metaplasia. No existe ninguna asociación estadística entre el tipo de patrón EPIYA encontrado en las cepas aisladas *H. pylori* CagA + y alteraciones patológicas estudiadas, excepto entre la atrofia y el tipo de patrón EPIYA ($p = 0,018$) en las muestras obtenidas en la ciudad de Cajamarca.

Conclusiones. Se identificó por primera vez una diversidad de patrones EPIYA en las cepas de *H. pylori* CagA+ aisladas de pacientes dispépticos de 4 ciudades del norte del Perú, aunque sin asociación estadística con atrofia, metaplasia y displasia.

Palabras claves: *Helicobacter pylori*, *cagA*, EPIYA

ABSTRACT

Objective To determine the association between the type of EPIYA patterns in *Helicobacter pylori* CagA + strains isolated from dyspeptic patients from hospitals in 4 cities in northern Peru and atrophy, metaplasia, or dysplasia of the gastric mucosa.

Material and methods. A cross - sectional observational analytic study was carried out, in which 164 isolates of *H. pylori* were evaluated from cultures of gastric biopsies of dyspeptic patients. The *cagA* gene of extracted genomic DNA was amplified using polymerase chain reaction (PCR) to determine the type of EPIYA pattern. In parallel, the pathological analysis of the gastric biopsies was performed to observe atrophy, metaplasia or dysplasia of the gastric mucosa.

Results. Of the 164 isolates of *H. pylori* obtained, it was found that 91.5% have the *cagA* gene in their genome. We found 13 types of EPIYA pattern: A, AABBCC, AABBC, AB, ABBBCC, ABBCCC, ABC, ABCC, ABCCC, AC, ACC, BC, BCC; the most frequent pattern was ABC. This pattern exists more frequently in biopsies with atrophy and metaplasia. There is no statistical association between the type of EPIYA pattern found in the isolated *H. pylori* CagA+ strains and pathological alterations tested, except between atrophy and type of EPIYA pattern ($p=0.018$) in samples obtained in the city of Cajamarca.

Conclusions. A diversity of EPIYA patterns was identified for the first time in the strains of *H. pylori* CagA + isolated from dyspeptic patients from 4 cities in northern Peru; these patterns do not have a statistical association with atrophy, metaplasia and dysplasia.

Key words: *Helicobacter pylori*, *cagA*, EPIYA

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
I.MARCO TEORICO	1
II.MATERIAL Y MÉTODOS	5
II.RESULTADOS	12
III.DISCUSIÓN	33
IV.CONCLUSIONES	36
V.RECOMENDACIONES	37
VI.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
VII.ANEXOS	42

I. MARCO TEORICO

La infección por *Helicobacter pylori* es un factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma gástrico, además se ha sugerido ampliamente que la infección de dicha bacteria desencadena la carcinogénesis gástrica a través de la cadena de inflamación hacia carcinoma. (6)

Dicho riesgo se incrementa con el tipo de *H. pylori*, en especial en aquellos donde se expresan diferentes factores de virulencia. (7) El *H. pylori* es una bacteria gram negativa con capacidad de sobrevivir en la mucosa gástrica y presenta una gran variabilidad geográfica.(1) Entre estos factores tenemos a la proteína CagA; proteína citotóxica codificada por el gen *cagA* ubicado en la isla de patogenicidad *cag-PAI*.(8) Esta proteína entra en el interior de la célula huésped mediante un sistema de secreción que también es codificado por la isla de patogenicidad.(9)

La proteína CagA es fosforilada en el interior de la célula por las tirosina quinasas del huésped Src y Abl en su región C-terminal donde presenta una secuencia de aminoácidos que se repite: Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala llamados “motivos EPIYA”, por los 5 aminoácidos presentes. Se pueden distinguir cuatro tipos de motivos EPIYA según la secuencia de aminoácidos alrededor de los mismos: EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C Y EPIYA-D.(2, 10)

Dependiendo del tipo y combinación de los diferentes motivos EPIYA, se tendrá mayor magnitud y duración de la actividad de CagA con fosforilación

dependiente, lo cual puede determinar el potencial del CagA como factor de virulencia en la carcinogénesis gástrica.(11)

Durante la fosforilación la proteína CagA se une a diferentes proteínas del huésped, entre la que destaca SHP-2 fosfatasa, induciendo diferentes señales involucradas en la proliferación celular, morfogénesis y movilidad.(12)

Se puede considerar dos isoformas de la proteína CagA, una occidental en la que contienen combinaciones de los motivos A, B y C , y otra oriental que contiene combinaciones de los motivos A, B y D.

Se conoce que el incremento de número de motivos C en los patrones EPIYA está asociado con lesiones precancerosas como metaplasia y atrofia.(13, 14)

Además la unión de SHP 2 con EPIYA D es significativamente más fuerte, que con EPIYA C, por lo que la especie de CagA de oriente asiático es biológicamente más activa que su similar occidental.(14)

Atrofia, metaplasia y displasia son consideradas las mayores lesiones precursoras del cáncer gástrico por lo que su precoz identificación es de importancia para disminuir la incidencia de cáncer gástrico.

Se han realizado diferentes investigaciones con el objetivo de conocer el tipo patrón EPIYA en diversas poblaciones, y su asociación con patologías gastroduodenales, entre las que podemos mencionar lo reportado por Torres et al, en cepas cubanas de *H. pylori* donde el patrón EPIYA ABC se encuentra presente en el 72,2% de pacientes con dispepsia sin patología ulcerativa. (3)

Así también en Colombia, Fajardo et al realizaron un estudio en 84 cepas de *H. pylori cagA+*, encontrando el patrón EPIYA de tipo occidental.(4)

En otras latitudes Kalaf y colaboradores encontraron en la población Iraquí la presencia de patrón EPIYA es del tipo occidental, con un número variable de EPIYA-C, y su asociación con úlcera gástrica.(5)

Estos estudios nos confirman una variabilidad geográfica del *H. pylori* así como su asociación con diferentes patologías gástricas de acuerdo a estudios ya publicados. Sin embargo, en nuestro medio no existen estudios de asociación entre el tipo de patrón EPIYA de las cepas *H. pylori cagA+* y las alteraciones gástricas en pacientes dispépticos.

Por lo cual se plantea el siguiente problema ¿Existe asociación entre los patrones EPIYA de cepas de *Helicobacter pylori* y alteraciones patológicas de la mucosa gástrica de pacientes dispépticos del norte del Perú?

El objetivo del presente estudio fue determinar por primera vez la asociación entre el tipo de patrones EPIYA de cepas de *H. pylori cagA+* aisladas de pacientes dispépticos atendidos en hospitales de 4 ciudades del norte del Perú y las alteraciones patológicas (atrofia, metaplasia, displasia) de la mucosa gástrica. Así también se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la presencia del gen *cagA* en aislamientos de *H. pylori* obtenidos de pacientes dispépticos de 4 ciudades del norte del Perú.
- Determinar el número y tipo de patrones EPIYA de las cepas de *H. pylori cagA+* aisladas de pacientes dispépticos de 4 ciudades del norte del Perú.
- Establecer la prevalencia de infección por *H. pylori cagA+* en pacientes dispépticos con atrofia, metaplasia y displasia.
- Establecer la distribución de los patrones EPIYA de las cepas de *H. pylori cagA+* según alteraciones patológicas de la mucosa gástrica observadas en las biopsias obtenidas.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Material:

Población

Todas las biopsias gástricas con cultivo positivo para *H. pylori* obtenidas de pacientes dispépticos (15) ,mayores de 18 años, que no hayan tomado tratamiento antibiótico en los últimos tres meses, ni inhibidores de bomba de protones en el último mes, reclutados en el Servicio de Gastroenterología de los hospitales de Trujillo, Chiclayo, Cajamarca y Tarapoto para el proyecto 413-PNICP-PIBA-2014.

Muestra

Biopsias gástricas con cultivo positivo para *H. pylori* distribuidas proporcionalmente por población en las 4 ciudades incluidas en el estudio (Trujillo, Chiclayo, Cajamarca y Tarapoto) fueron elegidos para el análisis genético.

Se realizó un muestreo probabilístico estratificado con asignación proporcional, considerando que el número de biopsias gástricas positivo para *H. pylori* obtenido en el estudio general (Proyecto 413-PNICP-UPAO) es N=303 biopsias.

Se efectuaron los cálculos correspondientes para el tamaño de la muestra estimada usando el programa EPIDAT versión 3.1, considerando como Tamaño Poblacional: 303, proporción esperada 74,6% tomado de Beltrán y colaboradores (16), con un Nivel de confianza del 95% y Precisión Absoluta del 5% se encontró **n= 149**.

Por lo que la muestra quedó conformada por 149 biopsias gástricas con cultivo positivo para *H. pylori*, distribuidas de manera proporcional

al número de biopsias positivas a *H. pylori* obtenido en cada ciudad incluida en el estudio, según se muestra en la siguiente tabla:

Distribución proporcional de la muestra

Ciudad	Nh	nh
Trujillo	128	63
Chiclayo	89	44
Cajamarca	77	38
Tarapoto	9	4
Total	303	149

Unidad de análisis

Biopsia gástrica de paciente dispéptico con cultivo positivo para *H. pylori*.

Unidad de muestreo

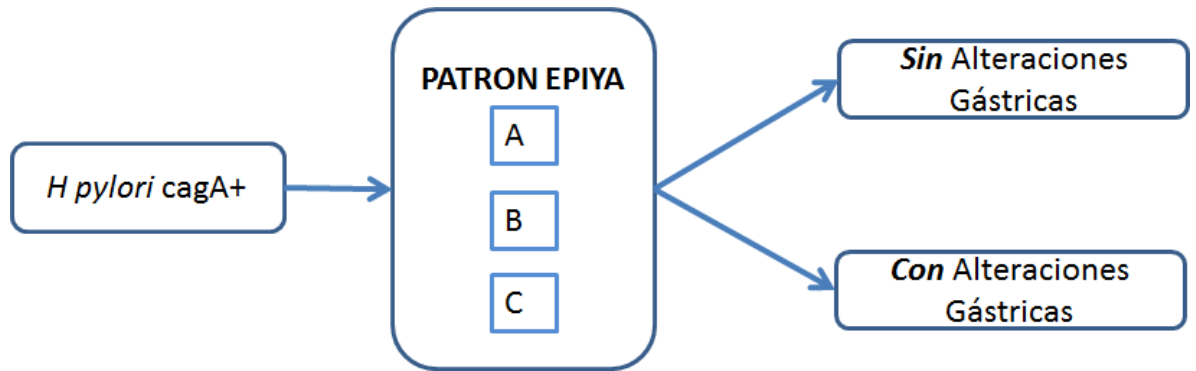
Cada ciudad considerada en el estudio.

Método:

Tipo de Estudio

Observacional, Analítico, corte Transversal.

Diseño de investigación



Variables y operativización de variables

Variable Exposición: PATRONES EPIYA

Variable Resultado: ALTERACIONES DE LA MUCOSA GÁSTRICA

Variables	Valores Finales	Criterios	Proceso de Medición	Definición Operacional	Escala Medición
PATRONES EPIYA	Combinaciones motivos EPIYA A EPIYA B EPIYA C	Tamaño en pares de bases de los motivos EPIYA A EPIYA B EPIYA C	Mediante PCR	Presencia de patrón EPIYA de <i>H. pylori</i> CagA+ aislado de biopsia de estómago mediante PCR	Nominal
ALTERACIÓN DE LA MUCOSA GÁSTRICA	Atrofia Metaplasia Displasia	Análisis patológico	Estudio de Biopsias de Estómago	Presencia de alteración histopatológica a Atrofia, Metaplasia y Displasia en la mucosa gástrica definida por Patólogo	Nominal

Procedimiento de obtención de datos

Los pacientes reclutados en el estudio fueron sometidos a endoscopia gástrica y se le tomaron 4 biopsias del estómago (2 de antro y 2 de cuerpo), previa firma del consentimiento informado.

Dos biopsias (1 de antro y 1 de cuerpo) fueron colocadas en formol al 10% y enviadas al Instituto de Investigación Biomédica “Dr. Víctor Antonio Zavaleta González” INBIOMED para el análisis histopatológico y diagnóstico histológico de infección por *H. pylori*; las dos biopsias (antro y cuerpo) restantes fueron colocadas en un tubo

estéril conteniendo medio de transporte Caldo cerebro-corazón (BHI) +20% Glicerol y se transportó al LABINM-UPAO manteniéndose en cadena de frío (4°C).

Se realizó un homogeneizado de las biopsias obtenidas en medio de transporte y se sembró en Agar Base Columbia suplementado con 7% de sangre de carnero, suplemento Isovitalex y suplemento selectivo Skirrow. (17, 18)

Se incubó a 37°C en condiciones de microaerofilia (5%O₂, 10%CO₂ y 85%N₂), en jarras de anaerobiosis durante 72 horas. Las cepas de *H. pylori* aisladas se almacenaron a 80°C en viales conteniendo 500 µL de medio Brucella suplementado con glicerol al 20%.(19, 20)

El tamaño muestral calculado fue de 149; sin embargo, se logró analizar un número mayor de biopsias disponibles en el laboratorio y se analizaron 164 biopsias con cultivo positivo para *H. pylori*. Dichos aislamientos fueron previamente identificados como *H. pylori* basados en la morfología de la colonia (pequeña, gris y translúcida); reacciones químicas como ureasa, catalasa y oxidasa positivas y la tinción de Gram para observar bacilos curvos Gram negativos.

Se obtuvo biomasa bacteriana de 2-3 placas con crecimiento abundante de cada aislamiento obtenido y se realizó la extracción de ADN genómico de las cepas de *H. pylori* aisladas utilizando un kit de purificación de ADN comercial (Thermo Scientific).

El ADN genómico extraído de los aislamientos de *H. pylori* obtenidos fue sometido a amplificación del gen *cagA* mediante PCR, usando oligonucleótidos sintetizados comercialmente, cuyas secuencias están descritas en el Anexo 2. La reacción consistió en 12.5 µL Dream Taq PCR Master mix-2x (ThermoFisher Scientific), 1 µL de cada oligonucleótido a 10 µM, 9.5 µL H₂O y 1 µL del ADN extraído de las cepas. Las condiciones de amplificación fueron 01 ciclo a 94°C por 2 minutos; 30 ciclos a 94°C por 40 segundos, 60°C por 40 segundos, y 72°C por 1 minuto; y ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos. Luego se realizó el análisis en gel de agarosa al 2% y visualizados en el documentador de geles, donde se evidenció la banda correspondiente al gen *cagA* correspondiente a 349 bp.

Para el análisis de los patrones EPIYA se utilizó el ADN genómico de las cepas con la presencia del gen *cagA*, fueron sometidos a amplificación de la región 3' variable de dicho gen por PCR, usando oligonucleótidos sintetizados comercialmente para cada motivo EPIYA, detallados en el Anexo 2. Reacciones para cada motivo consistieron en 12.5 µL Dream Taq PCR Master mix-2x (ThermoFisher Scientific), 1 µL de cada oligonucleótido a 10 µM, 9.5 µL H₂O y 1 µL del ADN de la cepa haciendo un total de 25 µL. Las condiciones de amplificación fueron 01 ciclo a 94°C por 1 minuto; 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, y 72°C por 1 minuto; y ciclo de extensión final a 72°C por 5 minutos. Luego se realizó el análisis en gel de agarosa al 2% y visualizados en el documentador de geles, donde se evidenció las bandas de acuerdo al motivo EPIYA estudiado. Para el motivo EPIYA A se evidenció una banda con 178 bp. Para el motivo EPIYA B se evidenció una banda 222 bp. Para el motivo EPIYA C se evidenció una banda de 378 bp. (2, 3, 10, 21)

El patrón EPIYA se determinó con la combinación de los motivos encontrados EPIYA A, B, C, identificados por las letras A, B, C respectivamente. Por ejemplo, si encontramos un motivo EPIYA A se le asigna la letra A; así también si encontramos el motivo EPIYA B se le asigna la letra B y si encontramos dos motivos EPIYA C le corresponde la letra C dos veces; con dichas letras conforman el patrón EPIYA ABCC.

Procesamiento y análisis de datos

Los datos encontrados fueron procesados utilizando el paquete estadístico SPSS V 22.0.

Estadística Descriptiva

En cuanto a las medidas de tendencia central se calculó la media y en las medidas de dispersión la desviación estándar, así como la distribución de frecuencias.

Estadística Analítica

En el análisis estadístico se hizo uso de la prueba Chi Cuadrado (X^2), para variables categóricas; las asociaciones fueron consideradas significativas si la posibilidad de equivocarse fue menor al 5% ($p < 0.05$).

Aspectos éticos

Los pacientes incluidos en el estudio recibieron una orientación previa a la endoscopia en la que se les explicó los beneficios, riesgos y objetivos del estudio; así mismo, leyeron y firmaron el formato de consentimiento informado. (Anexo 01). El estudio fue realizado siguiendo los principios de investigación con seres humanos de la Declaración de Helsinki II. (30)

II. RESULTADOS

Presencia del gen *cagA* en los aislamientos de *H. pylori* obtenidos

El ADN genómico extraído de los aislamientos de *H. pylori* obtenidos fue sometido a amplificación del gen *cagA* mediante PCR, seguida del análisis en gel de agarosa al 2%. (Figura 1)

De los 164 aislamientos de *H. pylori* analizados, se encontró que el 91.5% poseen el gen *cagA*. (Tabla 1).

Así mismo, entre los aislamientos de *H. pylori* obtenidos en las 4 ciudades incluidas en el estudio, se detectó la presencia de cepas de *H. pylori cagA+* con prevalencias entre 97% y 78%, siendo la ciudad de Chiclayo la que presenta mayor frecuencia (59/61), seguida de la ciudad de Cajamarca (28/30), Trujillo (56/64) y Tarapoto (7/9). (Figura 2)

Patrones EPIYA presentes en cepas de *H. pylori cagA+* circulantes en el norte del Perú

El ADN genómico extraído de las cepas de *H. pylori cagA+* fue sometido a amplificación segmentos de la región *cagA*-PAI usando oligonucleótidos específicos para los motivos EPIYA A, B y C en 3 PCRs independientes para cada cepa, seguido de análisis en geles de agarosa al 2%. (Figura 3)

En las 150 cepas *H. pylori cagA+* analizadas, se encontraron 13 tipos de patrones EPIYA: A, AABBC, AABBC, AB, ABBBC, ABBC, ABC, ABCC, ABCCC, AC, ACC, BC, BCC; siendo el más frecuente el patrón EPIYA ABC (72/150) seguido del patrón ABCC (33/150), siendo los menos frecuentes los patrones EPIYA AABBC, ABBBC y BC, que fueron identificados en sólo 1 cepa respectivamente. (Tabla 2)

Al analizar los patrones EPIYA de los aislamientos *cagA+* obtenidos en la ciudad de Trujillo, se encontraron 10 tipos diferentes: A, AABBC, AB, ABBBCC, ABC, ABCC, ABCCC, AC, ACC, BCC; en la ciudad de Chiclayo se encontraron 09 tipos de patrones: A, AABBC, AB, ABBCC, ABC, ABCC, ABCCC, AC, ACC, y en la ciudad de Cajamarca 06 tipos: A, AB, ABC, ABCC, ABCCC, BC. En estas tres ciudades el patrón más frecuente es el ABC. En las cepas *H. pylori cagA+* obtenidas en la ciudad de Tarapoto, se observaron 03 tipos de patrones EPIYA (4/7), siendo el más frecuente el patrón ABCC. (Figuras 4).

Alteraciones histopatológicas en biopsias gástricas obtenidas en 4 ciudades del norte del Perú.

Los resultados del análisis histopatológico de las biopsias gástricas de antro y cuerpo realizados en el Laboratorio INBIOMED. No se describieron alteración patológica de tipo displasia en el total de las biopsias analizadas.

Se reportó atrofia en 22 de 164 biopsias gástricas procesadas, así también se reportó metaplasia en 20 de 164 biopsias gástricas. Se evidenció que en la ciudad de Trujillo se encontró mayor cantidad de biopsias con atrofia (18/22) y con metaplasia (11/20) .(Tabla 03)

Se observó además que las biopsias gástricas con atrofia presentan cepas *H. pylori cagA+* en un 86%, así como las biopsias gástricas con metaplasia presentan cepas *H. pylori cagA+* en un 90%. (Tabla 04)

Al considerar el tipo de atrofia en las biopsias gástricas con cepas *H. pylori cagA+* según severidad se pudo encontrar que el 53% presentó atrofia Leve. (Figura 05). Así también se analizó el tipo de metaplasia en las biopsias gástricas con cepas *H. pylori cagA+* identificándose un 88.9% con metaplasia completa. (Figura 06)

Al realizar el análisis de alteraciones patológicas por ciudad, se encontró que en la ciudad de Trujillo, las biopsias gástricas con atrofia presentaron cepas *H. pylori cagA+* en un 83% (15/18). La ciudad de Cajamarca y Tarapoto mostraron 02 biopsias con atrofia asociadas al *H. pylori cagA+* respectivamente. La ciudad de Chiclayo no presentó biopsias con atrofia. (Tabla 05)

Además se encontró que en la ciudad de Trujillo, las biopsias con metaplasia presentaron *H. pylori cagA+* en un 90.9% (10/11). En la ciudad de Chiclayo se identificaron 05 biopsias con metaplasia, todas ellas presentaron *H. pylori cagA+*. En la ciudad de Cajamarca solo presentó una biopsia con metaplasia la cual presentó *H. pylori cagA+*. En la ciudad de Tarapoto se encontró que las biopsias con metaplasia presentan *H. pylori cagA+* en un 66,7% (2/3) (Tabla 05).

No se describieron alteración patológica de tipo displasia en el total de las biopsias analizadas.

Tipos de patrón EPIYA y alteraciones histopatológicas

Se realizó el análisis estadístico entre el tipo de patrón EPIYA y atrofia o metaplasia.

Entre los hallazgos se evidenció que el patrón EPIYA ABC se encuentra en el 52,6% (10/19) de las biopsias gástricas con atrofia. (Figura 07). Dicho patrón predomina en las biopsias de la ciudad de Trujillo (Figura 09) Con respecto al tipo de severidad de la atrofia, se encontró que la atrofia moderada se presenta con mayor frecuencia con el patrón EPIYA ABC (5/9), seguido del Patrón EPIYA ABCC (2/9). La atrofia leve se presentó con mayor frecuencia con el Patrón EPIYA ABC (5/10).

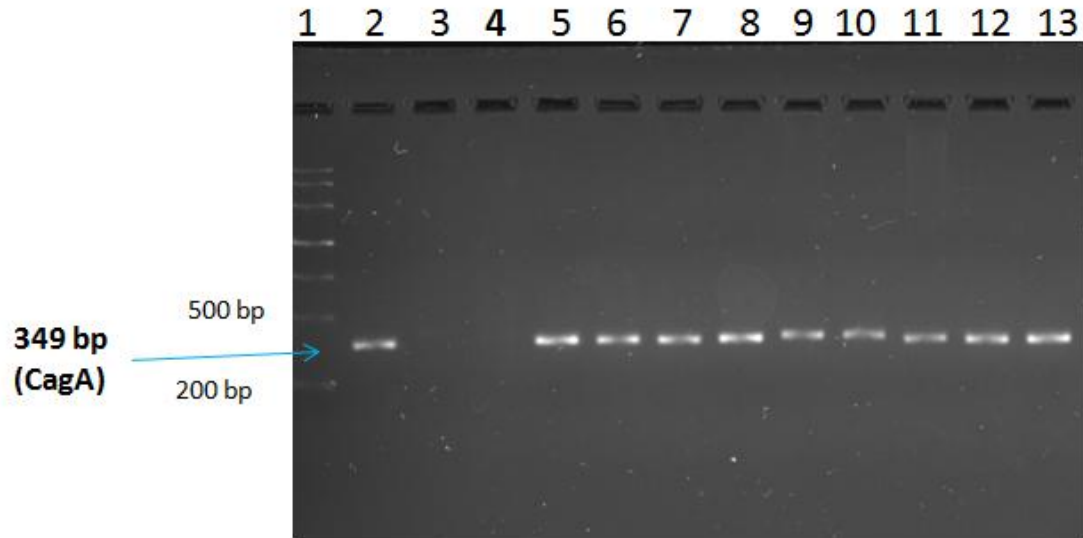
El patrón EPIYA ABC se encuentra en el 88,9% (8/9) de las biopsias gástricas con metaplasia (Figura 08) y predomina en las 4 ciudades. (Figura 10) Al analizar el grado de severidad se encontró metaplasia Completa con mayor frecuencia con el Patrón EPIYA ABC (8/16), seguido del Patrón EPIYA ABCC (2/16).

A pesar de estos hallazgos no se encontró asociación estadística entre las alteraciones patológicas observadas (atrofia y metaplasia) con los 13 patrones EPIYA identificados en las cepas de *H. pylori cagA+* analizadas de manera global. (Tabla 06)

En el análisis por ciudad, se encontró que en la ciudad de Cajamarca sólo existe relación estadística significativa entre atrofia y tipo de patrón EPIYA con $p=0.018$ (Tabla 07)

Figura N° 01

Presencia del gen *cagA* en aislamientos de *H. pylori* de biopsias gástricas de pacientes dispépticos de 4 ciudades del norte del Perú mediante PCR.



1: WideRangeDNAladder; **2:** 26695; **3:** Blanco (No ADN); **4:** CHI055A; **5:** CHI183A; **6:** CAJ001A; **7:**CAJ001C; **8:**CAJ009A; **9:** CAJ 010C; **10:** CAJ 015C; **11:** CAJ020A; **12:** CAJ020C; **13:** CAJ024C

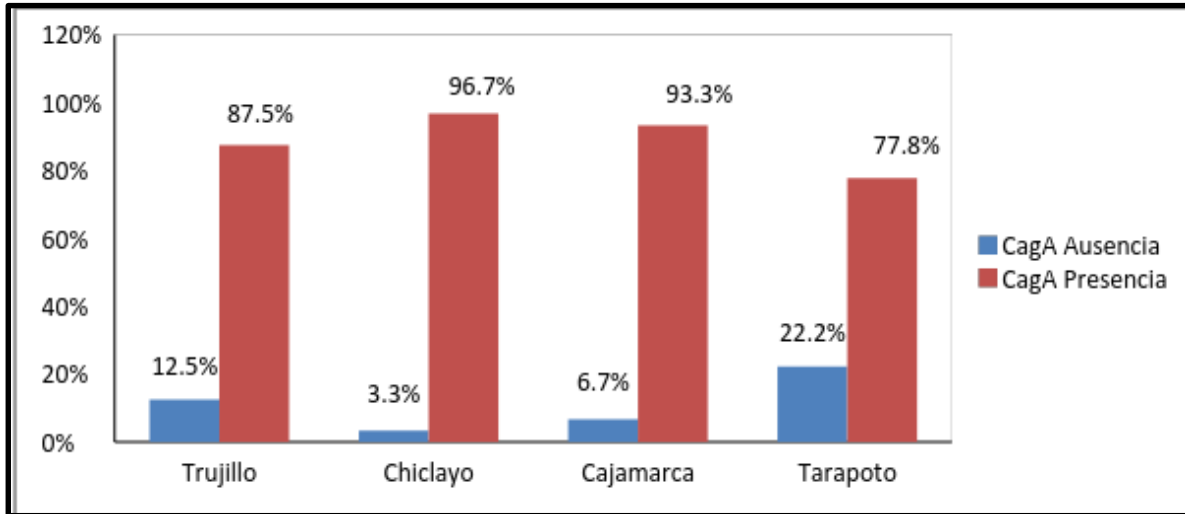
Tabla N° 01

Frecuencia del gen *cagA* en aislamientos de *H. pylori* de biopsias gástricas de pacientes dispépticos de 4 ciudades del norte del Perú

gen <i>cagA</i>		
	Frecuencia	%
Presencia	150	91.5
Ausencia	14	8.5
Total	164	100.0

Figura N° 02

Prevalencia del gen *cagA* en aislamientos de *H. pylori* de biopsias gástricas de pacientes dispépticos de 4 ciudades del norte del Perú.



Chi-Cuadrado

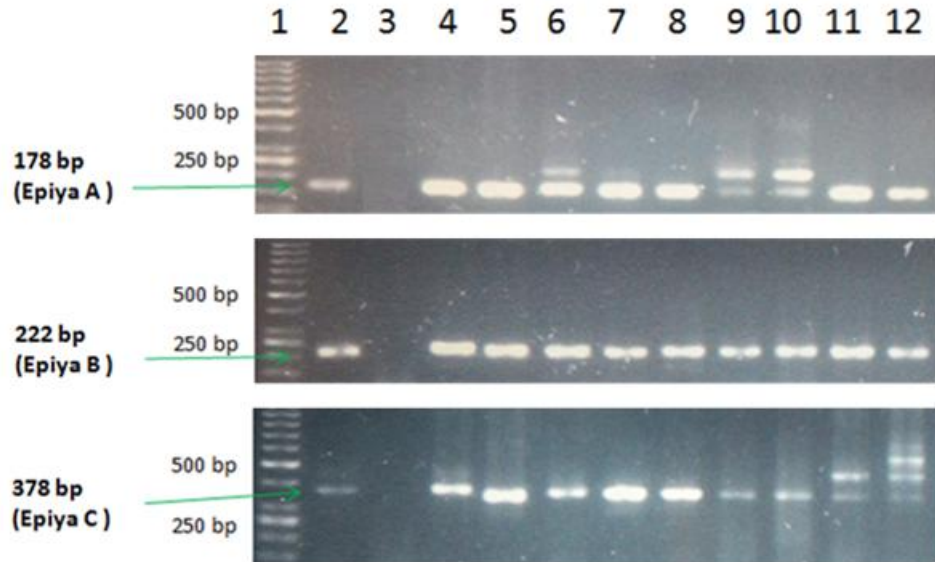
5.999

Sig.

0.111

Figura N° 03

Caracterización de motivos EPIYA A, B y C en cepas *H. pylori cagA+* mediante PCR.



	PATRON
1	<i>DNA ladder</i>
2	<i>MC15</i> ABC
3	<i>Blanco</i> -
4	<i>TRU002A</i> ABC
5	<i>TRU002C</i> ABC
6	<i>TRU005A</i> AABC
7	<i>TRU006A</i> ABC
8	<i>TRU006C</i> ABC
9	<i>TRU007A</i> AABC
10	<i>TRU007C</i> AABC
11	<i>TRU009A</i> ABCC
12	<i>TRU011A</i> ABCCC

Tabla N° 02

Patrones EPIYA en las cepas *H. pylori cagA+* analizadas mediante PCR.

TIPOS DE PATRÓN	Frecuencia	%
A	4	2.7%
AABBCC	1	0.7%
AABBC	3	2.0%
AB	7	4.7%
ABBBCC	1	0.7%
ABBCCC	2	1.3%
ABC	72	48.0%
ABCC	33	22.0%
ABCCC	12	8.0%
AC	6	4.0%
ACC	6	4.0%
BC	1	0.7%
BCC	2	1.3%
Total	150	100.0%

Figura N° 04

Tipos de Patrones EPIYA en cepas *H. pylori cagA+* de las 4 ciudades del norte del Perú.

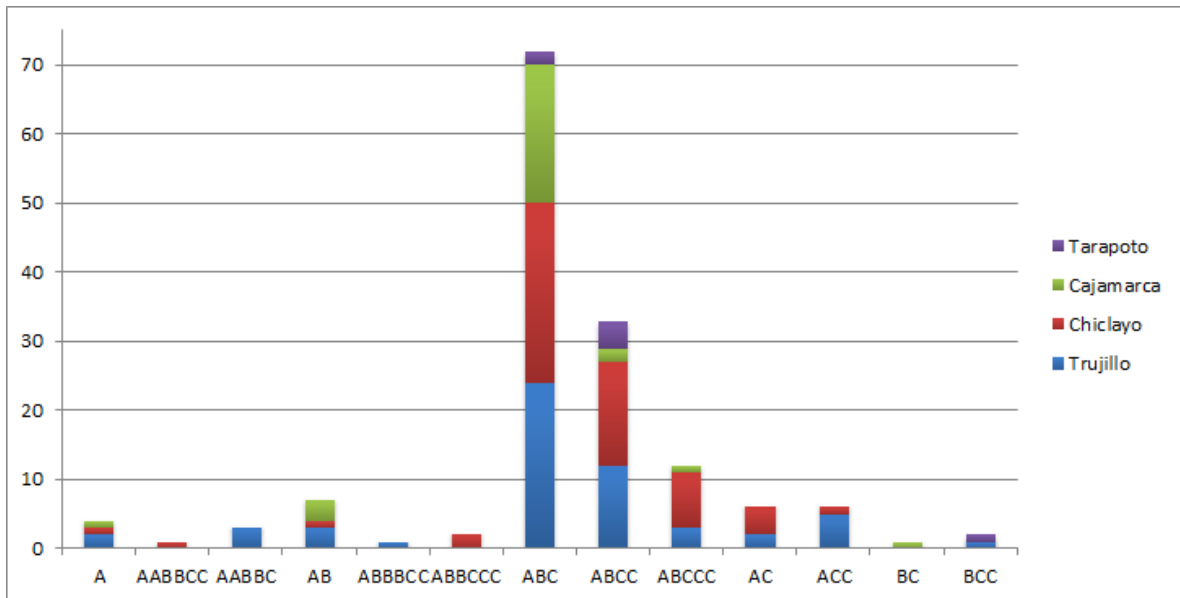


Tabla N° 03

Alteraciones patológicas en las biopsias gástricas obtenidas de 4 ciudades del norte de Perú

	Trujillo	Chiclayo	Cajamarca	Tarapoto	TOTAL
ATROFIA	18	0	2	2	22
METAPLASIA	11	5	1	3	20
DISPLASIA	0	0	0	0	0

Tabla N° 04

Prevalencia de *H. pylori cagA+* en biopsias gástricas que presentan atrofia o metaplasia

Alteración patológica	N° biopsias	<i>cagA+</i> N° (%)	<i>cagA-</i> N° (%)
Atrofia	22	19 (86)	3 (14)
Metaplasia	20	18 (90)	2 (10)

Tabla N° 05

Alteraciones patológicas en las biopsias gástricas con *H. pylori cagA+* por ciudad

	Trujillo	Chiclayo	Cajamarca	Tarapoto	TOTAL
ATROFIA	15	0	2	2	19
METAPLASIA	10	5	1	2	18

Figura N° 05

Tipos de atrofia en biopsias gástricas con *H. pylori cagA+*

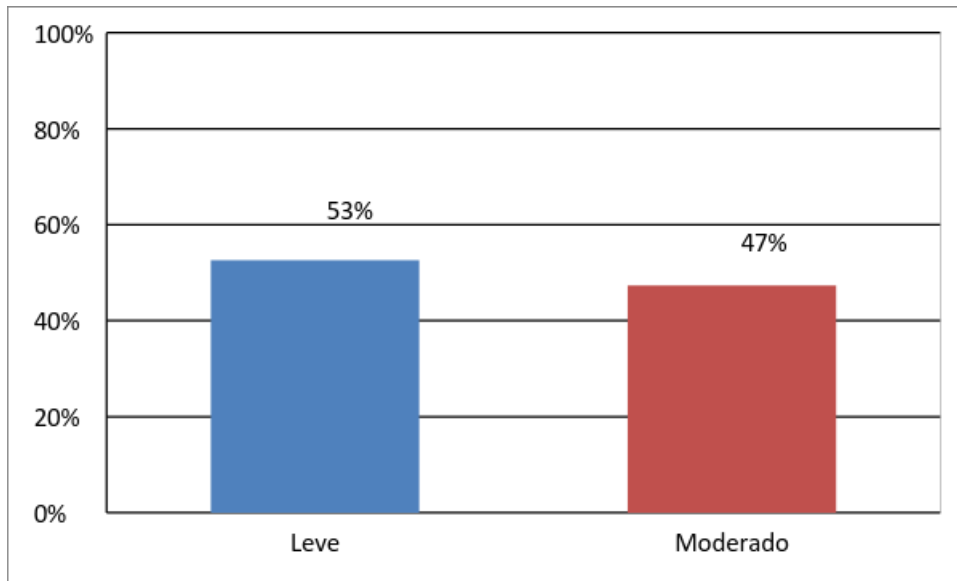


Figura N° 06

Tipos de metaplasia en biopsia gástricas con cepas *H. pylori cagA+*

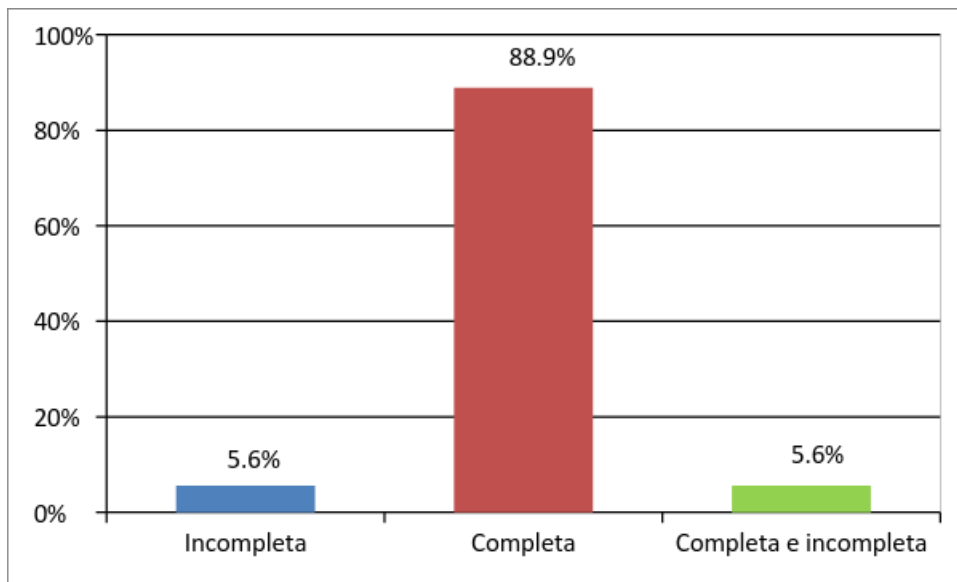


Figura N° 07

Frecuencia de patrones EPIYA y alteración patológica tipo atrofia

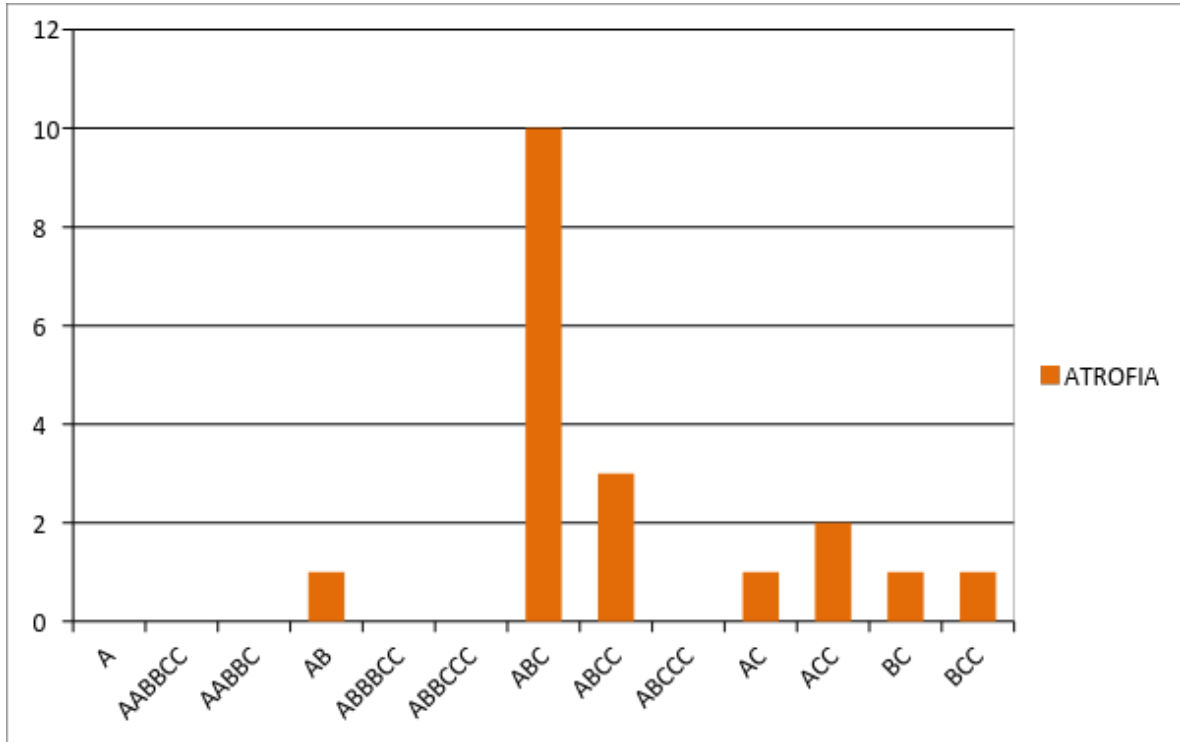


Figura N° 08

Frecuencia de Patrones EPIYA y alteración patológica tipo metaplasia.

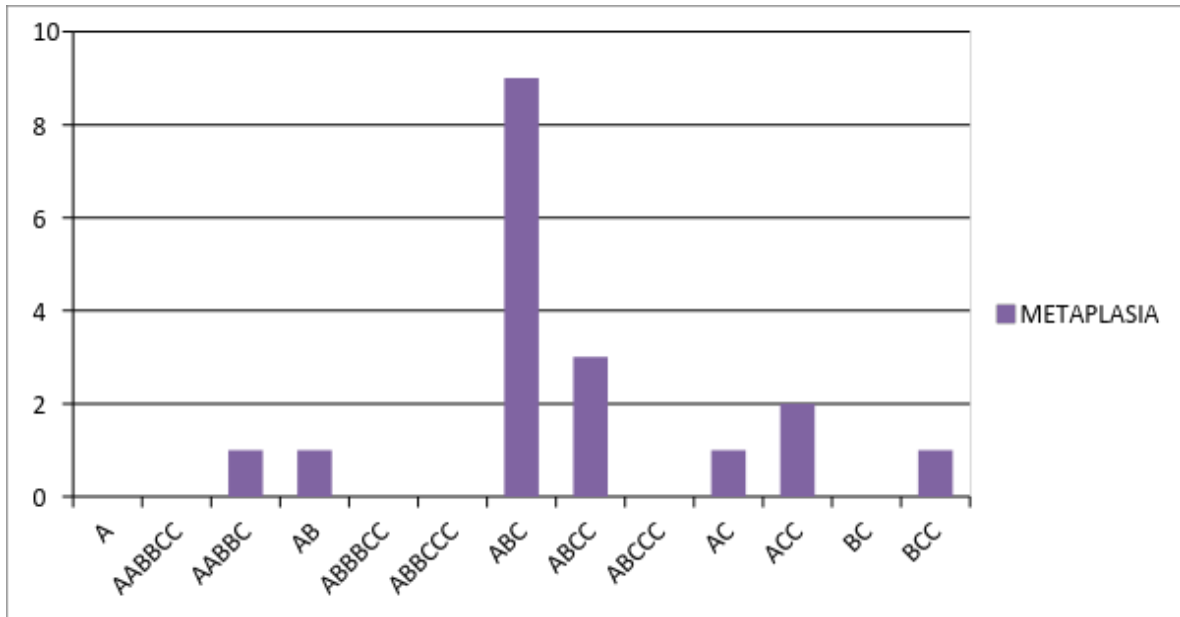


Tabla N° 06.

Asociación entre el tipo de patrón EPIYA y alteraciones patológicas tipo atrofia y metaplasia en biopsia gástricas de pacientes infectados con *H. pylori cagA+*

	Tipo de Patrón EPIYA	
	Chi-Cuadrado	Sig.
Atrofia	29.111	0.216
Metaplasia	16.253	0.998

Prueba significativa $p < 0.05$

Figura N° 09

Frecuencia de Patrones EPIYA y alteración patológica tipo atrofia en 4 ciudades del norte del Perú

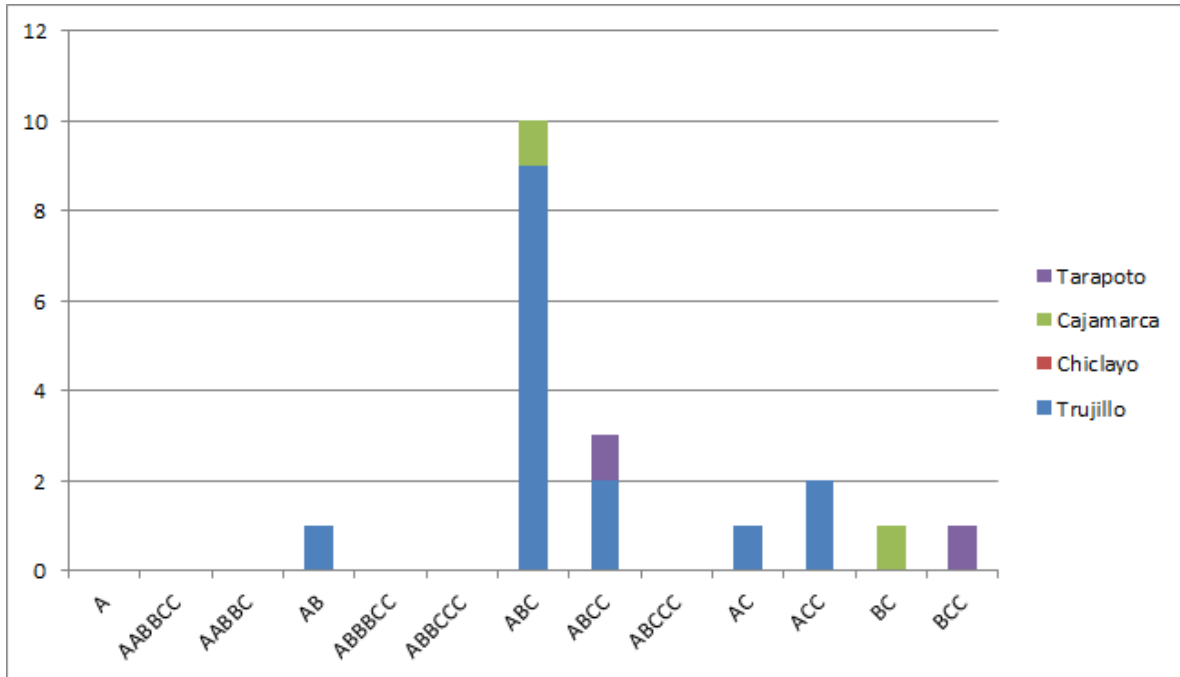


Figura N° 10

Frecuencia de Patrones EPIYA y alteración patológica tipo metaplasia en 4 ciudades del norte del Perú

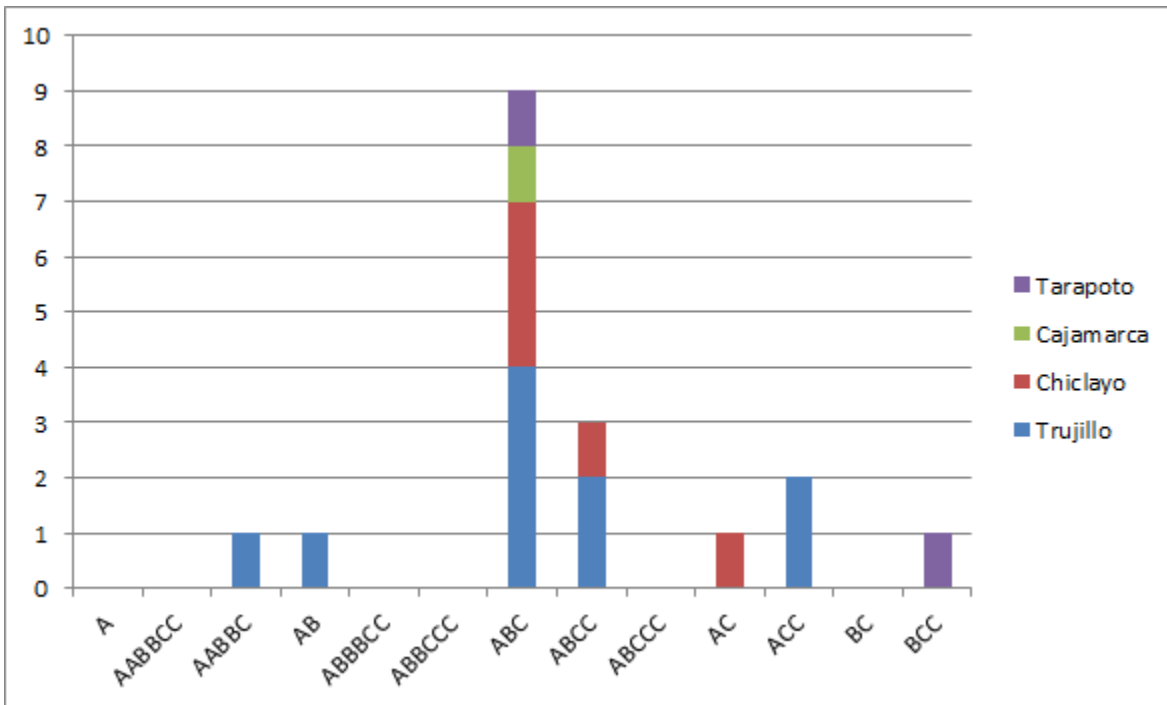


Tabla N° 07

Asociación entre el Tipo de Patrón EPIYA y alteraciones patológicas en biopsias gástricas de pacientes infectados con *H. pylori cagA+* en 4 ciudades del norte del Perú

	CIUDAD	Chi-Cuadrado	Sig. asintótica (2 caras)
Atrofia	Trujillo	11,438	.875
	Chiclayo	-	-
	Cajamarca	13,677	.018
	Tarapoto	3,325	.190
Metaplasia	Trujillo	4,642	.864
	Chiclayo	9,406	.997
	Cajamarca	,415	.995
	Trujillo	4,550	.103

Prueba significativa $p < 0.05$

III. DISCUSIÓN

En este estudio por primera vez se ha determinado la prevalencia del gen *cagA*, los patrones EPIYA y su relación con alteraciones gástricas de aislados de *H. pylori* proveniente de biopsias gástricas de pacientes dispépticos del norte del Perú; reclutados en 4 ciudades: Trujillo, Chiclayo, Cajamarca y Tarapoto.

En países occidentales la prevalencia de *H. pylori cagA* positivo es alrededor del 60 a 70%.(22). Torres y colaboradores encontraron en cepas cubanas de *H. pylori* la presencia del gen *cagA* en un 73.2%.(23)

Nuestro estudio encontró una presencia mayor del gen *cagA* (91%) en la población del norte del Perú estudiada, así como en cada ciudad siendo la ciudad de Chiclayo con mayor presencia (96,7%), seguido de la ciudad de Cajamarca (93,3%), luego Trujillo (87,5%) y finalmente Tarapoto (77,8%). Esta información es relevante, pues se conoce que las cepas de *H. pylori cagA* positivo están asociadas al incremento de riesgo de desarrollo de gastritis atrófica y de metaplasia intestinal, así como cáncer gástrico. (24, 25) Lo cual se evidenció en nuestro estudio, pues la mayoría de biopsias gástricas con atrofia presentaron *H. pylori cagA* positivo (79%), al igual que la mayoría biopsias gástricas con metaplasia (90%). No se encontraron biopsias gástricas con cáncer.

Al realizar el-análisis según ciudad se encontraron diferencias en la presencia de cepas *H. pylori cagA* positivo en biopsias gástricas con atrofia así como en biopsias con metaplasia. Siendo la ciudad de Trujillo la que tuvo una mayor presencia de cepas *H. pylori cagA* positivo en biopsias gástricas tanto en atrofia como metaplasia (Tabla 05). Estos hallazgos nos confirman la variabilidad geográfica de estas cepas.

Dentro del análisis del gen *cagA*, se procedió a realizar la identificación de los tipos y frecuencia de patrones EPIYA en nuestra población, en donde hemos evidenciado

que el patrón EPIYA más frecuente es el ABC (48%), este resultado es similar a lo reportado por Quiroga y colaboradores quienes reportaron el patrón EPIYA ABC en un 49% de cepas colombianas estudiadas.(26) Nuestro resultado es menor a lo reportado por Batista y colaboradores en cepas brasileñas (70.6%) (13), menor a lo que Beltrán y colaboradores reportaron en cepas mexicanos (69,1%) y menor a lo reportado por Torres y colaboradores en cepas cubanas (73,7%) (3).

Estos resultados nos demuestran las diferencias geográficas en la distribución de las cepas y la importancia de continuar evaluando cepas de diferentes zonas de un mismo país.

A pesar que no se encontró asociación estadística entre las alteraciones patológicas de las biopsias atrofia y metaplasia y los patrones EPIYA en la población total estudiada, nuestro estudio encontró la relación estadística significativa entre atrofia y tipo de patrón EPIYA en la ciudad de Cajamarca. Otro hallazgo de importancia es la presencia del patrón EPIYA ABC en la mayoría de biopsias gástricas con atrofia (52,6%), así como en la mitad de biopsias con metaplasia (50%), superior a lo encontrado por Acosta y colaboradores en Colombia con respecto al patrón EPIYA ABC en atrofia (22,7%) y metaplasia (24,2%).

Diferentes estudios identificaron que el patrón EPIYA con múltiple motivos C está asociado con aumento del riesgo de desarrollo de cáncer gástrico, en nuestro estudio no se encontraron biopsias con cáncer gástrico, pero se identificaron patrones EPIYA con 2 motivos C presentes en el 31,6% de biopsias gástricas con atrofia y en el 33,3 % de biopsias gástricas con metaplasia, hallazgos superiores a los reportado por Acosta y colaboradores en Colombia para los patrones EPIYA con 2 motivos C, 14,2% para atrofia y 25,7% para metaplasia; cabe mencionar que ellos reportaron patrones EPIYA con 2 motivos C en el 17,1% de biopsias con cáncer gástrico.(27). Nuestros hallazgos difieren a lo reportado a Sicinschi y colaboradores,

quienes reportaron una alta prevalencia (59%) de cepas colombianas con patrones EPIYA con 2 motivos C en biopsias con metaplasia intestinal. (16, 28).

Estos resultados evidencian la variabilidad geográfica de las cepas, además se observa menor cantidad de alteraciones patológicas en comparación a otras poblaciones, a pesar de la alta prevalencia de *H. pylori cagA* positivo encontrada en este estudio, pero que puede ser explicada por la mayor frecuencia de patrón EPIYA ABC descrita que al tener solo un motivo C, tiene baja asociación a cáncer gástrico.

Si bien en las biopsias analizadas no se encontró cáncer gástrico, lo cual podría explicarse debido a que los aislamientos obtenidos provienen de biopsias gástricas de pacientes reclutados cuya edad promedio es 47 años, y el cáncer gástrico se desarrolla generalmente por encima de los 50 años de edad; sin embargo, el hecho de haber detectado la presencia de cepas *H. pylori cagA* positivo con patrones EPIYA ABC circulando en el norte del Perú, además de la observación de atrofia y metaplasia en las biopsias origen de dichas cepas, sugiere que si persiste la circulación de estas cepas en nuestra población se incrementará el riesgo de desarrollar cáncer gástrico en los próximos años.

IV. CONCLUSIONES

El gen *cagA* tiene alta prevalencia en las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos de 4 ciudades del norte del Perú .

Se identificó por primera vez una diversidad de patrones EPIYA en las cepas de *H. pylori cagA+* aisladas de pacientes dispépticos de 4 ciudades del norte del Perú, pero no se encontró asociación estadística global con las alteraciones patológicas definidas como atrofia, metaplasia y displasia.

V. RECOMENDACIONES

Incluir cepas de *H. pylori* de otras ciudades, debido a la variabilidad geográfica descrita.

Realizar el estudio de otros factores de virulencia como *vacA*.

Realizar el seguimiento de los pacientes con *H. pylori cagA+* y los diferentes patrones EPIYA, así como de los pacientes que presentaron atrofia y metaplasia con la finalidad de prevenir el desarrollo de cáncer gástrico.

Establecer estrategias para la erradicación de estas cepas con la finalidad de reducir el riesgo de desarrollo de alteraciones patológicas y cáncer gástrico en nuestra Región.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer letters*. 2014;345(2):196-202.
2. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, et al. Biological activity of the Helicobacter pylori virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(22):14428-33.
3. Torres LE, 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.
4. Fajardo CA, Quiroga AJ, Coronado A, Labrador K, Acosta N, Delgado P, et al. CagA EPIYA polymorphisms in Colombian Helicobacter pylori strains and their influence on disease-associated cellular responses. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2013;5(3):50-9.
5. 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 Journal of Gastroenterology : Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association*. 2013;19(2):69-74.
6. Liu X, Cao K, Xu C, Hu T, Zhou L, Cao D, et al. GATA-3 augmentation down-regulates Connexin43 in Helicobacter pylori associated gastric carcinogenesis. *Cancer Biology & Therapy*. 2015;16(6):987-96.
7. Peek RM, Jr., Moss SF, Tham KT, Perez-Perez GI, Wang S, Miller GG, et al. Helicobacter pylori cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997;89(12):863-8.
8. Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in Helicobacter pylori pathogenesis. *Cellular microbiology*. 2008;10(8):1573-81.

9. Tegtmeyer N, Wessler S, Backert S. Role of the cag pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *The FEBS journal*. 2011;278(8):1190-202.
10. Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, et al. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(24):23130-7.
11. Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, Higashi H, Onoe K, Yamazaki S, et al. Influence of EPIYA-Repeat Polymorphism on the Phosphorylation-Dependent Biological Activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology*.130(4):1181-90.
12. Backert S, Tegtmeyer N, Selbach M. The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: the master key hypothesis. *Helicobacter*. 2010;15.
13. Batista SA, Rocha GA, Rocha AM, Saraiva IE, Cabral MM, Oliveira RC, et al. Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC microbiology*. 2011;11:61.
14. Hayashi T, Senda M, Suzuki N, Nishikawa H, Ben C, Tang C, et al. Differential Mechanisms for SHP2 Binding and Activation Are Exploited by Geographically Distinct *Helicobacter pylori* CagA Oncoproteins. *Cell reports*. 2017;20(12):2876-90.
15. Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada JR, et al. Functional gastroduodenal disorders. *Gastroenterology*. 2006;130(5):1466-79.
16. Beltrán-Anaya FO, Poblete TM, Román-Román A, Reyes S, de Sampedro J, Peralta-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 Gastroenterology*. 2014;14(1):223.
17. Bayona Rojas MA. Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2013;28:94-9.
18. Dent JC, McNulty CA. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *European journal of clinical microbiology & infectious*

diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 1988;7(4):555-8.

19. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*: official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 1990;9(1):1-13.

20. Jiang X, Doyle MP. Effect of environmental and substrate factors on survival and growth of *Helicobacter pylori*. *Journal of food protection*. 1998;61(8):929-33.

21. Argent RH, Zhang Y, Atherton JC. Simple method for determination of the number of *Helicobacter pylori* CagA variable-region EPIYA tyrosine phosphorylation motifs by PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43.

22. Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Journal of gastroenterology*. 2009;44.

23. Torres LE, Melián K, Moreno A, Alonso J, Sabatier CA, Hernández M, et al. Prevalence of *vacA*, *cagA* and *babA2* genes in Cuban *Helicobacter pylori* isolates. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2009;15(2):204-10.

24. Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995;87(23):1777-80.

25. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer research*. 1995;55(10):2111-5.

26. 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 middle to induce hummingbird phenotype in gastric epithelial cells. *Biomedica*. 2010;30.

27. Acosta N, Quiroga A, Delgado P, Bravo MM, Jaramillo C. Helicobacter pylori CagA protein polymorphisms and their lack of association with pathogenesis. World journal of gastroenterology. 2010;16.
28. Sicinschi LA, Correa P, Peek RM, Camargo MC, Piazzuelo 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.
29. Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of Helicobacter pylori: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Immun. 1993;61(5):1799-809.
30. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. JAMA. 2013;310(20):2191–2194.

VII. ANEXOS**ANEXO 01****CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo.....identificado con DNI....., dejó constancia por la presente que me han explicado las ventajas y desventajas de participar en el proyecto “Asociación entre los patrones EPIYA de cepas de *Helicobacter pylori* y alteraciones patológicas de la mucosa gástrica de pacientes dispépticos atendidos en Hospitales de 4 ciudades del norte del Perú”

FIRMA**DNI**

ANEXO 02

Oligonucleótidos a emplear en la genotipificación y secuenciación del gen cagA en las cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias. (29)

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	TA	Tamaño del Producto
cagA	cagF1 cagR1	GATAACAGGCAAGCTTTTGA CTGC AAAAAGATTGTTTGGCAGA	60	349

Oligonucleótidos que se emplearán para la caracterización de la región EPIYA de las cepas CagA positivo (3)

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	TA	Tamaño del Producto
cagA	cag2	GGAACCCTAGTCGGTAATG	50	400---750
	cag4	ATCTTTGAGCTTGTCTATCG		-
	cagA---P1C	GTCCTGCTTTCTTTTTATTAACCTTAGC	60	174
	cagA---P2CG	TTTAGCAACTTGAGCGTAAATGGG		220
	cagA---P3E	ATCAATTGTAGCGTAAATGGG	60	378