

Patrón EPIYA en cepas de *Helicobacter pylori* CagA positivas en pacientes del Hospital Regional de Talca.

ILEANA GONZÁLEZ BONET^{1,2A}, MARÍA JACQUELINE ROMERO ELIAS^{1B}, ERIK MORALES MEJÍAS^{1,2,3C}, ELIANA VALDEZ MOYANO^{3,4D}, CECILIA COFRÉ LOYOLA^{3,4D}, BELARMINO MANQUES MALDONADO^{3E} Y ARMANDO ROJAS RUBIO^{1,2F}.

EPIYA pattern in *Helicobacter pylori* CagA positive strains in patients of the Regional Hospital of Talca.

Abstract

Background: The clinical outcome of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection has been related to the presence of CagA protein. This protein is highly polymorphic and its oncogenic ability depends on the number and type of tyrosine phosphorylation sites in the EPIYAs repeat sequences (A, B, C and D).

Aim: To determine the EPIYA patterns of the CagA gene in *H. pylori* strains and its relationship with gastrointestinal pathology in infected patients of the Regional Hospital of Talca.

Material and Methods: The strains were isolated from gastric biopsies and characterized by bacteriological and molecular methods. Gastrointestinal pathology was characterized by histopathological analysis. For the determination of the presence of the cagA gene and the EPIYAs standards, the conventional PCR technique was used.

Results: 138 DNA samples from *H. pylori* strains were analyzed. 92.0% (127/138) of the isolates carried the cagA gene, of which 66 (52.0%) corresponded to the EPIYA-ABC pattern, 43 (33.8%) to the EPIYA-ABCC pattern and 21 (16.5%) to the EPIYA-ABCCC phosphorylation pattern. 50.4% (64/127) of cagA positive strains isolated from dyspeptic patients in the Maule region have more than two C sites of phosphorylation. The number of EPIYAs C motifs was associated with the presence of more severe histopathological damage in the gastric mucosa.

Key Words: *Helicobacter pylori*, EPIYA motifs, CagA Protein

a. Microbióloga, Máster en Ciencias, bBioquímico, cMédico Anatomopatólogo, dMédico Gastroenterólogo, e Tecnólogo médico, fDoctor en Ciencias Biológicas,

1. Laboratorios de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Católica del Maule.

2. Departamento de Ciencias Preclínicas, Facultad de Medicina, Universidad Católica del Maule. 3.Unidad de Anatomía Patológica, Hospital Regional de Talca. Chile.

3. Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad Católica del Maule, Talca, Chile.

4. Unidad de Gastroenterología, Hospital Regional de Talca, Chile.

Autor de referencia: Prof. Ileana Gonzalez Bonet, Laboratorios de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Ciencias preclínicas, Facultad de Medicina, Universidad Católica del Maule. Avenida San Miguel, número 3605, Talca, Chile. Teléfonos, 71 2 203373 E-mail: ileanag@ucm.cl

Introducción

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria Gram-negativa en forma de espiral que infecta el estómago y causa gastritis crónica. Además, la bacteria desempeña un papel importante en la patogénesis de la úlcera gastroduodenal y el car-

cinoma gástrico.¹ Los resultados clínicos de la infección por *H. pylori* dependen de factores de virulencia bacteriana, la susceptibilidad del huésped y los factores ambientales.²

El gen asociado a la proteína A (CagA) es un im-

portante factor de virulencia de *H. pylori* que se encuentra hasta en más del 90% de cepas aisladas en Chile y se asocia con el desarrollo de úlceras pépticas y carcinoma gástrico.^{3,4} Esta proteína, está codificada por el gen *cagA*, que se encuentra en la isla de patogenicidad Cag (cag-PAI). Posterior a la adherencia de *H. pylori* CagA positiva al epitelio gástrico, esta proteína es inyectada directamente en la célula huésped a través de un sistema de secreción de tipo IV codificado por la isla de patogenicidad cag-PAI. Dentro de la célula epitelial, CagA se fosforila en su región carboxi-terminal. Esta región es muy variable y contiene un patrón polimórfico de aminoácidos Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala denominados sitios EPIYAs.^{5,6} Se han descrito cuatro tipos de segmentos EPIYA (EPIYA-A, -B, -C, y -D).⁷ Las proteínas CagA poseen siempre los sitios EPIYA-A y EPIYA-B, pero algunas proteínas también contienen una o más repeticiones del sitio EPIYA-C. Este patrón se encuentra normalmente en cepas que circulan en países occidentales como Europa, América y Australia (CagA occidental), mientras que la presencia de sitios EPIYA-A y EPIYA-B, seguida por el sitio EPIYA-D, se ha descrito para cepas de *H. pylori* aisladas en los países asiáticos.^{7,9} Los motivos EPIYA-C y -D son los sitios principales para la fosforilación de CagA. La proteína fosforilada forma un complejo físico con la fosfatasa SHP-2 y desencadena señales celulares anormales que conducen a la desregulación del crecimiento celular, el contacto célula a célula y la migración celular, el alargamiento de las células epiteliales y el aumento del volumen de células epiteliales aumentando así el riesgo de adquirir cambios genéticos precancerosos.⁹ La presencia del motivo EPIYA-D o de múltiples repeticiones EPIYA-C se asocia con el aumento de la actividad de la fosfatasa SHP-2 inducida por CagA.^{10,11} En los países occidentales se ha demostrado que la infección con cepas que llevan repeticiones del sitio EPIYA-C, predisponen al desarrollo de lesiones precancerosas y cáncer gástrico.^{8,11} Los estudios, realizados en Chile, han demostrado una alta frecuencia del gen *cagA* entre las cepas circulantes. Además, se ha descrito que la presencia de la proteína CagA se asocia con la presencia de úlceras pépticas y cáncer gástrico.^{4,12} Sin embargo, los estudios de polimorfismo de CagA en

cepas de *H. pylori* aisladas en la región del Maule son escasas a pesar de ser una región de alta incidencia de cáncer gástrico.

El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de variantes de la región 3' del gen *cagA* en las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con síntomas dispépticos e investigar la asociación entre estas variantes genéticas y las características histopatológicas de la mucosa gástrica.

Métodos

Se realizó un estudio descriptivo prospectivo, mediante el cual se identificaron las variantes genéticas del factor de virulencia CagA en aislados clínicos de *H. pylori* procedentes de pacientes con dispepsia y se relacionaron con el daño histológico en la mucosa gástrica.

Participaron en el estudio un total de 150 individuos, seleccionados secuencialmente entre los pacientes que acudieron a realizarse endoscopia digestiva alta por presentar síntomas dispépticos, entre mayo de 2011 y junio de 2012 al Hospital Regional de Talca, VII Región del Maule, Chile. Fueron excluidos del estudio, los pacientes que habían recibido tratamiento de erradicación de *H. pylori*, inhibidores de la bomba de protones, tratamiento antiinflamatorio no esteroideo o tratamiento inmunosupresor un mes antes del procedimiento endoscópico. Los pacientes con historia de gastrectomía, esofagectomía, estenosis, sangrado activo en el tracto GI superior y embarazo también fueron excluidos.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Católica del Maule y del Servicio de Salud del Maule, VII Región, Chile. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio.

Obtención de muestras de Biopsias gástrica:

De cada participante, se recopilaron, 4 biopsias gástricas (dos de antro y dos de cuerpo) mediante endoscopia digestiva alta. Una biopsia de antro y una de cuerpo fueron utilizadas para el análisis histopatológico, las restantes muestras se destinaron cultivo de *H. pylori*.

Determinación de la presencia de *H. pylori*: La infección por *H. pylori* fue determinada mediante el cultivo bacteriológico y pruebas bioquímicas.¹³ La confirmación de especie se realizó mediante la detección de gen *glmM* por PCR.¹⁴

Extracción de ADN genómico de *H. pylori*: Se recogieron las células de *H. pylori* subcultivadas de las placas de agar y se procedió a la extracción del ADN genómico utilizando el kit PureLink Genomic DNA Mini (Invitrogen). Los ADN purificados se almacenaron a -20°C hasta su uso. Las regiones constante y variable del gen *cagA* fueron amplificadas mediante PCR convencional. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo un transiluminador de UV. El estudio incluyó muestras de pacientes en los que se aisló *H. pylori* y se obtuvo ADN bacteriano.

Amplificación de la región constante del gen *cagA*: La presencia de la región constante del gen *cagA* fue analizada en las cepas de *H. pylori* obtenidas. Las cepas positivas para esta región (constante) fueron sometidas a la determinación de la región variable (EPIYAs). La región constante del gen *cagA* se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores *CagA/F* 5'-GTGCCTGCTAGTTTGT-CAGCG-3' y *CagA/R* 5'-TTGGAAACCACCT-TTTGTATTAGC-3'.¹⁵ Se incluyeron controles negativos y positivos en todas las reacciones.

Amplificación de la región variable del gen *cagA* y determinación del patrón EPIYA: Para la amplificación de la región 3'-variable del gen *cagA*, se utilizaron los cebadores descritos por Yamaoka et al.¹⁶: CAG1: 5'-ACCCTAGTCGGTA-ATGGGTTA-3' y CAG2: 5'-GTAATTGTCTAG-TTTCGC-3'. Los productos esperados variaban desde 500 hasta 850 pb dependiendo del tipo y número de repeticiones del motivo EPIYA-C en el gen *cagA*. Se utilizaron controles positivos de los diferentes patrones del motivo EPIYA para confirmar los resultados de la PCR.

Análisis Histológico: Las biopsias fueron fijadas con formalina y embebidas en parafina. Sesiones de 4 μm fueron teñidas con hematoxilina-eosina para análisis histológico. Las biopsias fueron clasificadas según los criterios histopatológicos de Sydney para gastritis¹⁷ y de Viena para lesiones neoplásicas gastrointestinales.¹⁸ A partir de esta evaluación, se estructuraron tres grupos comparables representativos de la secuencia descrita para carcinogénesis gástrica en: i) "Gastritis crónica" (no atrófica), ii) "Condiciones preneoplásicas" (atrofia y/o metaplasia intestinal) y iii) "Displasia o

neoplasia *in situ*" (displasia epitelial glandular o adenocarcinoma *in situ*).¹⁹

Análisis estadístico: Los datos fueron procesados y analizados utilizando el programa STATA versión 11. Se realizó un análisis descriptivo inicial, utilizando porcentajes, medias y desviaciones típicas. La asociación entre los patrones EPIYAs del gen *cagA* y el diagnóstico histológico fueron analizadas mediante el test de χ^2 , considerando significativo valores de $p < 0,05$.

Resultados

Características clínico epidemiológicas de los pacientes analizados.

Fueron estudiadas 170 muestras de biopsias procedentes de pacientes mayores de 18 años (76 hombres y 94 mujeres) que acudieron a realizarse endoscopia digestiva alta, al Hospital Regional de Talca. La edad promedio de los participantes fue de 54 años con un rango etario desde los 18 hasta 80 años. El 81,2% (138/170) de los pacientes estaban infectados con *H. pylori*, de estos, 39,9% (55/138) presentaban gastritis crónica (no atrófica), 30,4% (42/138) condiciones preneoplásicas (atrofia y/o metaplasia intestinal) y 29,7% (41/138) displasia o neoplasia *in situ* (displasia epitelial glandular o adenocarcinoma *in situ*). En la Tabla 1 se exponen las características clínicas-epidemiológicas de los pacientes analizados.

Determinación de la presencia del gen *cagA* y los patrones EPIYAs.

Del total de muestras analizadas, 92% (127/138) fueron *cagA* positivas. Entre las cepas *cagA*-positivas, la tipificación del patrón EPIYA mostró que el número de motivos EPIYA C variaba de 0 a 3. El 49,6% (63/127) portaban el patrón EPIYA-ABC, 33,9% (43/127) el patrón EPIYA-ABCC y 16,5% (21/127) el patrón EPIYA-ABCCC. El 50,4% (64/127) de las cepas *cagA*-positivas aisladas de los pacientes dispépticos que acuden al Hospital Regional de Talca, poseen más de un sitio de fosforilación EPIYA tipo C. El número de motivos EPIYA tipo C se asoció con hallazgos histopatológicos más graves en las biopsias de la mucosa. Al comparar los porcentajes de pacientes infectados

con cepas *H. pylori cagA* positivos con los tres grupos de lesiones histopatológicas estudiadas (gastritis, condiciones preneoplásicas y displasia o neoplasia in situ) se observó diferencias estadísticamente significativas (nivel $p < 0,05$) como se muestra en la Tabla 2.

Discusión:

El gen *cagA* se considera un factor importante en la patogenicidad bacteriana asociada con el adenocarcinoma gástrico y las úlceras pépticas. Este hecho pone de relieve la importancia de su detección en pacientes infectados por *H. pylori*.^{12,20} De todos los pacientes positivos para *H. pylori* analizados en este estudio, el 92,0% (127/138) fueron *cagA* positivos, lo que es una prevalencia alta comparada con otros países del área y similar a la prevalencia previamente detectada en Chile.⁴ *CagA* muestra un número variable de secuencias repetidas (EPIYA) en su región 3 '20. Una vez inyectada en una célula epitelial gástrica, esta región experimenta fosforilación de tirosina e interactúa con la fosfatasa SHP-2, que tiene afinidad de unión para la EPIYA C fosforilada con tirosina. Esta interacción conduce a cambios celulares que se piensan juegan un papel importante en la proliferación del carcinoma gástrico. Cuanto mayor es el número de segmentos EPIYA-C, mayor es la afinidad por SHP-2.¹² En el presente estudio, todos los pacientes *cagA*-positivos mostraron un patrón EPIYA tipo A, B y C, lo que confirma que las cepas geográficamente occidentales poseen EPIYA C en la región C-terminal de repetición. Además, el número de segmentos EPIYA-C parece influir en la patogenicidad de la cepa, lo que concuerda con estudios previos.⁴

Los resultados muestran, que el 54,1% (26/48) de los pacientes con *H. pylori* positivo con gastritis crónica no atrófica presentaron segmentos *CagA* EPIYA-ABCC / EPIYA-ABCCC ($p = 0,046$), el 57,5 (27/40) de los pacientes infectados con cepas portadoras de más de un EPIYA C presentaban condiciones preneoplásicas ($p = 0,021$) y el 28,1% (11/39) presentaban Displasia o neoplasia in situ ($p = 0,001$). Una asociación significativa similar y las variantes *CagA* con 2 o más EPIYA C también se detectó en México, Brasil y Chile.^{4,21,22} Estos datos son consistentes con otros estudios, y la presencia de un mayor número de segmentos *CagA*

EPIYA-C se considera un factor de riesgo para el daño a nivel de mucosa gástrica.^{4,23}

Aunque la mayoría de las cepas de *H. pylori* poseen los 3 patrones de EPIYA A, B y C, no podemos excluir la hipótesis de que algunas cepas pueden poseer secuencias alternativas que no serían reconocidas por los cebadores utilizados. Sin embargo, el par de cebadores usado para la amplificación de la región 3 'de *cagA* en este estudio se ha utilizado en otros estudios que muestran una alta confianza en la determinación de la presencia de la región *cagA*.⁴

Por otro lado, es importante señalar que no sólo *cagA* contribuye a la heterogeneidad y correlación de la manifestación de la enfermedad gástrica, sino también otros factores como *vacA*, *babA* y *iceA*.^{4,23} Varios estudios han demostrado una fuerte indicación de que la asociación de los factores de virulencia puede aumentar el riesgo de desarrollar tumores malignos gástricos. Por lo tanto, los estudios de estos genes en cada región son importantes.⁴

En conclusión, se observó que la infección por cepas de *H. pylori* positivas a *cagA* que albergan múltiples repeticiones de EPIYA-C se asocia con la presencia de daños severos en la mucosa gástrica (gastritis y condiciones preneoplásicas). El análisis de la diversidad de manifestaciones clínicas asociadas con diferencias en el número de repeticiones dentro del gen *cagA* puede ser una herramienta diagnóstica y pronóstica importante para los pacientes infectados por *H. pylori* en zonas de alta prevalencia de infección por cepas *cagA* positiva y alta prevalencia de cáncer gástrico.

Referencias

- 1-de Martel C, Forman D, Plummer M. Gastric cancer: epidemiology and risk factors. *Gastroenterol Clin N Am*. 2013; 42:219–40.
- 2-Wroblewski LE, Peek RM, Jr, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23:713–39.
- 3-Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol*. 2009; 44:239–48.
- 4-González I, Romero J, Rodríguez B, Llanos J

- , Morales E, Figueroa H, et al. High prevalence of virulence associated genotypes in *Helicobacter pylori* clinical isolates in the Region del Maule, Chile. *Scand J Infect Dis*, 2011; 43(8):652-655
- 5-M. Selbach, S. Moese, C. R. Hauck, T. F. Meyer, and S. Backert, Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* *cagA* protein in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(9):6775–6778.
- 6-H. Higashi, R. Tsutsumi and A. Fujita. 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):14428–14433.
- 7- Bridge D. R. & Merrell D. S. Polymorphism in the *Helicobacter pylori* *CagA* and *VacA* toxins and disease. *Gut Microbes* 2013; 4:101–117.
- 8- Higashi H. *et al.* Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor *CagA* is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99: 14428–14433.
- 9- Nishikawa H, Hayashi T, Arisaka F, Senda T, Hatakeyama M. Impact of structural polymorphism for the *Helicobacter pylori* *CagA* oncoprotein on binding to polarity-regulating kinase PAR1b. *Sci Rep*. 2016; 22(6):30031.
- 10-Nagase L, Hayashi T, Senda T, Hatakeyama M. Dramatic increase in SHP2 binding activity of *Helicobacter pylori* Western *CagA* by EPIYA-C duplication: its implications in gastric carcinogenesis. *Sci Rep*. 2015; 28(5):15749.
- 11-Muller A. Multistep activation of the *Helicobacter pylori* effector *CagA*. *J. of clinical invest.* 2012; 122:1192–1195.
- 12- Carlsson A., Ryberg A., Dehnoei M. N., Borch K. & Monstein H. J. Association between *cagA* and *vacA* genotypes and pathogenesis in a *Helicobacter pylori* infected population from South-eastern Sweden. *BMC Microbiol.* 2012; 12, 129-136.
- 13-Ding HJ, Liu YC, Peng CF, Wang WM, Chen YW, Huang YF, Lin CC, Chen CY J. An efficient method for the culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies with two-section petri dishes. *Gastroenterol.* 2001 Apr;36(4):237-41.
- 14- Ketki Patel, Kavitha Konduru, Alok K. Patra, Dinesh S. Chandel, and Pinaki Panigrahi. Trends and determinants of gastric bacterial colonization of pre-term neonates in a NICU setting. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0114664.
- 15- C. A. Rota, J. C. Pereira-Lima, C. Blaya, and N. B. Nardi. Consensus and variable region PCR analysis of *Helicobacter pylori* 3' region of *cagA* gene in isolates from individuals with or without peptic ulcer. *J. of Clinical Microbiol.* 2001; 39(2): 606–612.
- 16- Y. Yamaoka, T. Kodama, K. Kashima, D. Y. Graham, and A. R. Sepulveda. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different H. pylori-associated diseases. *J. of Clinical Microbiol.*, 1998; 36(8):2258–2263.
- 17- Dixon M, Genta R, Yardley J, Correa P, et al. Classification and Grading of Gastritis. The Updated Sydney System. *The American Journal of Surgical Pathology* 1996; 20 (10): 1161-81.
- 18-Schlemper R, Riddell R, Kato Y, Borchard F, Cooper H, Dawsey S, et al. The Vienna Classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 2000; 47: 251-5.
- 19-Correa P and Chen VW. Gastric Cancer. *Cancer Surv* 1994; 19-20: 55-76.
- 20- Nishikawa H, Hatakeyama M. Sequence Polymorphism and Intrinsic Structural Disorder as Related to Pathobiological Performance of the *Helicobacter pylori* *CagA* Oncoprotein. *Toxins (Basel)*. 2017; 9(4): 136-142.
- 21-Beltrán-Anaya FO, Poblete TM, Román-Román A, Reyes S, de Sampedro J, et al. The EPIYA-ABCC motif pattern in *CagA* of *Helicobacter pylori* is associated with peptic ulcer and gastric cancer in Mexican population. *BMC Gastroenterol.* 2014; 24(14):223-229

22-Adenielson Vilar e Silva, Mario Ribeiro da Silva Junior, Ruth Maria Dias Ferreira Vinagre, Kemper Nunes Santos, Renata Aparecida Andrade da Costa, et al. Evaluation of the Pattern of EPIYA Motifs in the *Helicobacter pylori cagA* Gene of Patients with Gastritis and Gastric Adenocarcinoma from the Brazilian Amazon Region. *International Journal of Bacteriology*. 2014; 2014:418063.

doi:10.1155/2014/418063.

23-Li Q, Liu J, Gong Y, Yuan Y. Association of *CagA* EPIYA-D or EPIYA-C phosphorylation sites with peptic ulcer and gastric cancer risks: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(17):e6620. doi: 10.1097/MD.0000000000006620.

Tabla 1. Características clínicas-epidemiológicas de los casos analizados.

Características	Número de sujetos estudiados/ (%)	H. pylori positivo/ (%) (Hp+)	Gastritis crónica/ (%) (GC)	Condiciones preneoplásicas/ (%) (CP)	Displasia o neoplasia in situ/ (%) (D-Cis)
	n=170	n=138	n=55	n=42	n= 41
Sexo	76/(50,7)	59/(42,8)	19/(34,5)	16/(38,1)	24/(58,5)
Masculino	94/(55,3)	79/(57,2)	36/(65,5)	26/(61,9)	17/(41,5)
Femenino					
Total	170	138	55	42	41
Edad años					
Rango	18-80	20-77	22-78	20-75	20-77
Promedio	57	54	48	52	61

Tabla 2. Caracterización de los sitios EPIYAS en las cepas portadoras del gen *cagA*.

Diagnostico histológico	Presencia del gen <i>cagA</i>		P value
	Negativo/(%)	Positivo/(%)	
Gastritis crónica: n=55	7/ (12,7)	48/ (87,3)	0.368
Condiciones preneoplásicas: n=42	2/ (4,8)	40/ (95,2)	0.718
Displasia o neoplasia in situ n= 41	2/ (4,8)	39/ (95,1)	0.716
Total	11 (8,0)	127 (92,0)	138

	Patrón EPIYA del gen <i>cagA</i>			Dos colas P value ^d
	ABC	ABCC	ABCCC	
Gastritis crónica: n=48	34/ (70,8)	16/ (33,3)	10/ (20,8)	0,105/0,046 ^e
Condiciones preneoplásicas: n=40	22/ (55,0)	20/ (50,0)	7 / (17,5)	0,142/0,021 ^e
Displasia o neoplasia in situ n= 39	10 / (25,6)	7/ (17,9)	4/ (10,2)	0,004/0,001 ^e
Total	66 (52,0)	43 (33,9)	21 (16,5)	127

^d Valor de significancia p utilizando test de Fischer

^e Valor de significancia p cuando se combinan los motivos EPIYA tipo CC y CCC