

## Artículo original

# 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

Keila Esteli Torres Izarra<sup>a</sup>, Yeinmy Heliannie Moran Borges<sup>a</sup>, Elvis José Valderrama Rios<sup>b</sup>, Miguel Ángel Chiurillo Siervo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Genética Molecular “Dr. Yunis-Turbay”. Decanato de Ciencias de La Salud. Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA). <sup>b</sup>Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Antonio María Pineda. UCLA, Barquisimeto, Venezuela.

Recibido 12 de junio de 2012; aceptado 13 de septiembre de 2012

**Resumen:** *Helicobacter pylori* es una bacteria que coloniza la mucosa del estómago produciendo enfermedades gástricas crónicas. Las cepas que expresan el factor de virulencia CagA se unen al epitelio gástrico e inyectan en él esta proteína, la cual es activada por fosforilación en residuos de tirosina ubicados en el motivo EPIYA. Dependiendo del número y tipo de motivo EPIYA (EPIYA-A, B, C y D), se inducen transformaciones celulares que juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades gastroduodenales asociadas con *H. pylori*. El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de las variantes de EPIYA en cepas de *H. pylori cagA* positivas de la región centrooccidental de Venezuela. Se estudiaron 81 muestras de ADN extraídas de biopsias gástricas tomadas de individuos con gastritis crónica. El tipo de motivo EPIYA fue determinado por PCR y secuenciación. Solamente se detectaron variantes de EPIYA descritas para países occidentales: ABC (58,0%), ABCC (38,3%) y ABCCC (3,7%). La baja prevalencia detectada de cepas de *H. pylori* con tres repeticiones de EPIYA-C, las cuales se conocen por generar un mayor riesgo a cáncer gástrico, puede encontrarse entre las razones que expliquen la escasa incidencia de cambios histológicos severos en las muestras de gastritis crónica analizadas.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*, CagA, EPIYA, gastritis crónica.

## Variants of the EPIYA motif of *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric biopsies from patients with chronic gastritis from the center-occidental region of Venezuela

**Abstract:** *Helicobacter pylori* is a bacterium that colonizes stomach mucous tissue producing chronic gastric disease. The strains that express the CagA virulence factor adhere to the gastric epithelium and inject this protein, which is activated by phosphorylation at tyrosine residues located in the EPIYA motif. Depending on the number and type of EPIYA motif (EPIYA-A, B, C, and D), cellular transformations are induced which play an important role in the development of *H. pylori* associated gastro duodenal diseases. The objective of this work was to determine the frequency of the EPIYA variants in *cagA* positive *H. pylori* strains from the center-occidental region of Venezuela. The study included 81 DNA samples extracted from gastric biopsies taken from individuals with chronic gastritis. The type of EPIYA motif was determined by PCR and sequencing. Only EPIYA variants described for occidental countries were detected: ABC (58.0%), ABCC (38.3%) and ABCCC (3.7%). The low prevalence of *H. pylori* strains with three EPIYA-C repetitions detected, which are known to generate a higher gastric cancer risk, could be one of the reasons that explain the low incidence of severe histological changes in the chronic gastric samples analyzed.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, CagA, EPIYA, chronic gastritis.

\* Correspondencia:  
E-mail: mchiurillo@ucla.edu.ve

### Introducción

*Helicobacter pylori* es una bacteria gramnegativa microaerofílica de forma espiralada, reconocida como un agente causal de cáncer gástrico, siendo este último considerado como la segunda causa más común de cáncer

en el mundo, con 736.000 muertes en el año 2008 [1]. En Venezuela, el cáncer gástrico ocupa el tercer lugar como causa de muerte por neoplasias malignas [2].

La infección con *H. pylori* ocurre generalmente en la niñez a través de las vías oral-oral o fecal-oral. La bacteria se aloja en la mucosa gástrica, lo que le permite protegerse

de la acidez gástrica, a su vez metaboliza urea para liberar amonio y de esta forma neutraliza el ácido del medio [3]. Una vez adquirida, la infección persiste durante toda la vida si no es tratada con antibióticos [3-5].

*H. pylori* presenta alta variabilidad genética producto de una elevada tasa de mutaciones y eventos recombinatorios que le permiten adaptarse rápidamente a los cambios del ambiente [6,7]. A pesar de la diversidad genómica de *H. pylori*, varios elementos genéticos de la bacteria han revelado su importancia como factores de virulencia en estudios epidemiológicos, siendo el mejor estudiado la isla de patogenicidad *cag* (*cag*-PAI), la cual es un fragmento de 40 Kpb que codifica un sistema de secreción tipo IV [8]. Cuando *H. pylori* invade el organismo, inyecta la proteína antígeno citotóxico asociada al gen A (CagA) en las células epiteliales gástricas a través de dicho sistema [5,9]. Sin embargo, *cag*-PAI no es una entidad uniforme, siendo susceptible a disrupción debido a rearrreglos genéticos que pueden ocurrir interna o externamente a los genes constituyentes de la misma, lo cual puede determinar que algunas cepas de *H. pylori* no expresen CagA o sean incapaces de inyectarla a las células del hospedero [10].

Una vez en el interior de las células epiteliales, CagA es fosforilada por múltiples miembros de la familia de quinasas Src (SFK) que actúan sobre los residuos de tirosina presentes en la región C-terminal de la proteína [5,9]. Esta fosforilación le permite a la proteína CagA unirse y activar a la tirosina fosfatasa SHP-2, lo cual induce cambios morfológicos por rearrreglos del citoesqueleto (elongación celular conocida como fenotipo colibrí). Las cascadas iniciadas por la activación de SHP-2 pueden generar desregulación en el crecimiento, sobrevivencia y migración de las células epiteliales gástricas [3,5,9,11].

Las cepas de *H. pylori* productoras de CagA funcionalmente activa, pueden provocar una respuesta inflamatoria severa en las células epiteliales gástricas al inducir la secreción de moduladores proinflamatorios, como la interleucina-8 (IL-8). El incremento de la infiltración de la mucosa gástrica por linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, de persistir, puede inducir gastritis crónica superficial, la cual pudiera progresar a gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y en última instancia en cáncer [12,13]. Por otra parte, algunos individuos infectados por cepas de *H. pylori* productoras de CagA pueden desarrollar enfermedad péptica ulcerosa [14].

El sitio de fosforilación de residuos de tirosina en CagA es caracterizado por la presencia de un motivo repetido Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA), el cual se presenta en número variable en la región C-terminal de la proteína [15]. Hasta la fecha se han descrito cuatro motivos EPIYA diferentes: A, B, C y D, quienes se diferencian entre sí por la secuencia de aminoácidos adyacente a la secuencia EPIYA [15].

Ha sido descrita una distribución geográfica particular de las cepas de *H. pylori* productoras de CagA según los motivos EPIYA que presenten. Los aislados de países occidentales, provenientes de Europa, Norte América y Australia, poseen comúnmente EPIYA-A, EPIYA-B seguidas de uno a

tres motivos de EPIYA-C, mientras que gran parte de las muestras obtenidas de oriente, específicamente del este asiático, presentan EPIYA-A, EPIYA-B seguida en varios casos por EPIYA-D [5,10,15,16].

Los motivos EPIYA-C y EPIYA-D representan los principales sitios de fosforilación en CagA, siendo este último más afin a la unión con la SHP-2 que los motivos EPIYA-C. Como resultado de estas interacciones, las cepas de *H. pylori* productoras de CagA del este de Asia han sido asociadas con un alto índice de gastritis crónica y mayor potencial oncogénico; mientras que las cepas de *H. pylori* que presentan más repeticiones de los motivos EPIYA-C se ubican en segundo lugar en su capacidad oncogénica [5,10,15].

Venezuela presenta alta prevalencia de infección por *H. pylori*, particularmente por cepas portadoras de genes que han sido asociados con alta virulencia [17-19]. En un trabajo previo de nuestro grupo no se encontró correlación entre cepas de *H. pylori cagA* positivas (79,3%) y severidad de las lesiones de la mucosa estomacal en pacientes con gastritis crónica de la región centroccidental de Venezuela [19]. Aunque la falta de asociación mencionada puede deberse a factores ambientales o inherentes al hospedador, es posible que las cepas de *H. pylori* circulantes en la región expresan una proteína CagA con bajo potencial patogénico.

En este trabajo se evaluó el número y tipo de motivos EPIYA para determinar si representa un marcador importante del grado de patogenicidad de *H. pylori* y su posible asociación con el desarrollo de enfermedades gástricas en el país.

## Materiales y métodos

*Aislados clínicos:* Se estudiaron 81 muestras de ADN genómico extraído directamente de biopsias gástricas obtenidas por endoscopia superior entre los años 2005 y 2008 en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Antonio María Pineda (HAMP) de Barquisimeto, estado Lara, Venezuela. Todas las muestras son de pacientes con diagnóstico endoscópico e histopatológico de gastritis crónica (28 hombres y 53 mujeres). La edad promedio de los pacientes fue 42,9 años (rango: 18-76 años). Todas las muestras habían sido identificadas en estudios previos o en el presente como *H. pylori cagA* positivas mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) de un fragmento de la región 5' del gen empleando los oligonucleótidos *cag5c-F* (5'-GTTGATAACGCTGTGCTTC-3') y *cag3c-R* (5'-GCGTTGTATGATATTTCCATAA-3') siguiendo las condiciones descritas anteriormente [19,20].

De cada paciente se obtuvieron dos biopsias del antro y dos del cuerpo gástrico. Los criterios de exclusión fueron: menor de 18 años, cirugía gástrica previa y tratamientos previos contra *H. pylori*, antecedentes de hemorragia y trastornos de la coagulación, consumo de antibióticos durante los 3 meses anteriores a la endoscopia, consumo de sales de bismuto, inhibidores de la bomba de protones o sucralfato en el mes anterior. Este estudio fue aprobado

por la Comisión de Bioética del Decanato de Ciencias de la Salud, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes en este estudio.

Las extracciones de ADN fueron realizadas directamente de las biopsias colocando en un mismo tubo una muestra de cada región gástrica y empleando el kit Wizard Genomic DNA Purification System (Promega). El ADN extraído fue preservado a -20°C hasta su uso.

**Detección y amplificación de la secuencia EPIYA de la región de cagA:** Se usaron dos pares de iniciadores, cagA2530S (5'-GTTAARAATRGTGTRAAYGG-3', donde R= A o G y Y=ToC)/cagA3000AS(5'-TTTAGCTTCTGATACCGC-3') [16] y cag2 (5'-GGAACCCTAGTCGGTAATG-3') / cagA-p3E (5'-ATCAATTGTAGCGTAAATGGG-3') [21]. Los iniciadores cagA2530S y cagA3000AS fueron utilizados en el análisis de todas las muestras, y las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95 °C por 30 seg, anillamiento por 45 seg a 55 °C y una elongación a 72 °C por 45 seg, finalmente una extensión a 72 °C por 5 min. La mezcla de reacción (25 µL) se preparó con buffer 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 0,8 µM de cada primer, 2 µL de ADN, 1,25 U de GoTaq® flexi ADN polymerase (Promega).

Las muestras que no amplificaron para los iniciadores anteriormente mencionados fueron probadas en una segunda reacción de PCR empleando los oligonucleótidos cag2 y cagA-p3E. Para determinar la presencia del motivo EPIYA-D se emplearon los iniciadores cag2 y cagA-pD (5'-TTGATTTGCCTCATCAAAATC-3') [20], ya que el oligonucleótido reverso cagA-pD ancla específicamente en la secuencia de EPIYA-D. En ambos casos, fueron empleadas las mismas condiciones de amplificación antes mencionadas exceptuando que la temperatura de anillamiento fue de 58 °C.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV.

**Secuenciación de ácidos nucleicos:** Con el fin de confirmar la correspondencia entre el tamaño de los productos de PCR y el tipo de motivo EPIYA obtenidos en este trabajo, 9 fragmentos fueron purificados mediante el kit Wizard SV Gel y PCR clean-up System (Promega) y posteriormente sometidos a secuenciación de nucleótidos con la metodología “Dye Terminator” en un equipo ABI 310 (Applied Biosystems). Se obtuvieron las secuencias de ambas hebras de cada fragmento realizando la reacción de secuencia por separado para cada iniciador utilizado en las PCRs iniciales (cagA2530S/cagA3000AS).

**Análisis de secuencias:** Se llevaron a cabo alineamientos de las secuencias de nucleótidos y su putativa traducción a proteína por medio del programa de análisis de secuencias

DNAMAN (Lynnon Software). A su vez, fueron contrastadas las secuencias de nucleótidos y su traducción a proteínas con las secuencias depositadas en la base de datos de GenBank™ mediante análisis BLAST (BLASTn y BLASTx) en el sitio web [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

**Evaluación histopatológica:** Las muestras del antro y cuerpo gástrico fueron embebidas en parafina, y secciones de las mismas teñidas con hematoxilina y eosina. La gastritis fue histológicamente evaluada de acuerdo al sistema Sydney [22] para la presencia de gastritis atrófica, y el grado de infiltración por granulocitos (G0/G1, ausencia y leve; G2/G3, moderado y severo) y linfocitos (L0/L1, ausencia y leve; L2/L3, moderado y severo).

**Análisis estadístico:** Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS 11.0, empleando el test de Fisher o  $\chi^2$  para comparar las diferencias entre los grupos analizados. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores de  $p < 0,05$ .

## Resultados

Se detectaron 3 de los tipos de EPIYA descritos: ABC, ABCC y ABCCC. Las reacciones de PCR desarrolladas por Panayotopoulou *et al* [16] y Jones *et al* [21] permiten la amplificación de fragmentos con aproximadamente 100 pb de diferencia ante la presencia de motivos EPIYA C o D. Las diferencias de peso molecular entre las distintas variantes encontradas concuerdan con variación en el número del motivo EPIYA-C existente [16,21]. El tamaño de los fragmentos está determinado por la amplificación de EPIYA-A y EPIYA-B, seguido de una a tres repeticiones de EPIYA-C (ABC, ABCC y ABCCC) (Figura 1).

Debido a que el motivo EPIYA-D también puede presentar un tamaño de aproximadamente 100 pb, y los iniciadores reversos cagA-p3E y cagA3000AS pueden anclar en ambos tipos de motivos (C o D), se evaluaron las muestras que revelaron EPIYA tipo ABC mediante PCR con los oligonucleótidos cag2 y cagA-pD. En todos los casos analizados con estos iniciadores la amplificación resultó negativa, confirmando que las cepas evaluadas carecen de motivo EPIYA-D.

Entre las 81 muestras de *H. pylori cagA* positivas evaluadas la tipificación del motivo EPIYA mostró que 47 (58%) eran tipo ABC, 31 (38,3%) eran tipo ABCC y 3 (3,7%) presentaron 3 copias de EPIYA-C (ABCCC) (Tabla 1). No se obtuvieron productos de PCR con tamaños compatibles con menos de 3 o más de 5 repetidos EPIYA.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el tipo de EPIYA y el grado de lesión histopatológica encontrada en las biopsias, incluso cuando se consideraron en conjunto las muestras con 2 y 3 motivos EPIYA-C.

Para lograr más detalles de la región variable 3' del gen *cagA* en las muestras evaluadas, obtuvimos la secuencia de nucleótidos de 9 fragmentos (3 por cada tipo de EPIYA detectado). Las secuencias de nucleótidos obtenidas y su

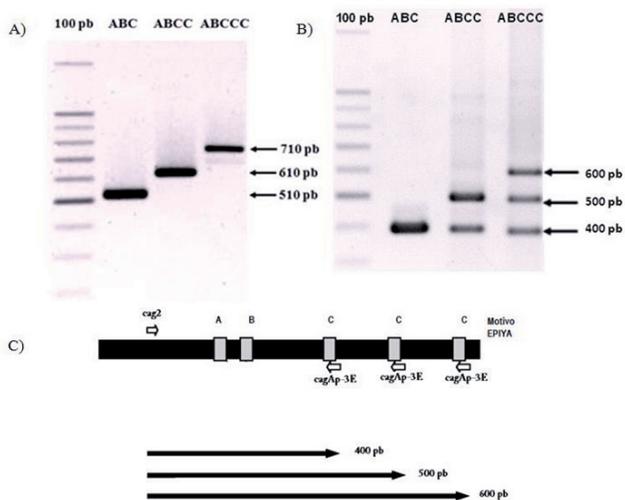


Figura 1. Amplificación por PCR de los motivos EPIYA en muestras de pacientes con gastritis crónica. A) Fragmentos obtenidos en las reacciones de PCR empleando los iniciadores CagA2530S y CagA3000AS, y B) los iniciadores cag2 y cagA-p3E, observados en electroforesis en geles de agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. C) Esquema representativo de los sitios de anclaje de los oligonucleótidos cag2 y cagA-p3E en la región 3' de cagA. Se muestra la predicción de los tamaños de productos de PCR empleando estos iniciadores según el número de motivos EPIYA-C.

traducción deducida a aminoácidos fueron contrastadas con las reportadas en la base de datos de GenBank™, obteniéndose valores de identidad de 89-100% con secuencias anotadas como cagA de H. pylori. Este análisis permitió confirmar la correlación entre el tamaño del producto de PCR y la variante de motivo EPIYA presente en la muestra.

Al obtener la traducción a aminoácidos de las secuencias obtenidas se observó correspondencia con las reportadas como conservadas para definir el tipo de motivo EPIYA: EPIYA-A: EPIYAKVNKKK(A/T/V/S)GQ; EPIYA-B: EPIY(A/T)(Q/K)VAKKVNAKI y EPIYA-C: EPIYATIDDLG [16] (Figura 2). Seis de los fragmentos caracterizados por secuenciación presentaron motivos EPIYA-B, en los cuales el residuo A (alanina) es reemplazado por T (treonina).



Figura 2. Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de CagA obtenida de los 9 fragmentos secuenciados. En las cajas sombreadas se destacan los motivos EPIYA observados. El \* indica la variante EPIY(A/T)-B.

**Discusión**

La producción de CagA por H. pylori se considera un factor importante para generar un estado inflamatorio persistente en la mucosa del estómago, el cual puede determinar la evolución de la gastritis crónica no-atrónica a gastritis atrófica, y en continuar el proceso de múltiples pasos hacia el desarrollo del adenocarcinoma gástrico [5,10]. El análisis de los motivos de fosforilación EPIYA ha sido sugerido como una forma de predecir la evolución y pronóstico de las enfermedades asociadas a la infección por H. pylori [16,23].

Las variantes de EPIYA detectadas en las muestras de pacientes con gastritis crónica (ABC, ABCC y ABCCC) corresponden a las prevalentes principalmente en poblaciones Occidentales (Europa, Norte América y Australia) [5,10,15,24], con un predominio del tipo ABC de EPIYA (58,0%). Resultados similares en cuanto a la distribución de EPIYA fueron obtenidos por Sicinschi et al [25] con muestras de pacientes del estado de Nariño en Colombia, los cuales reportaron una distribución en las muestras de 64,2% para aquellas que presentaban una repetición C, mientras que el 34,3% y el 1,5% correspondían a la presencia de dos y tres motivos de EPIYA-C, respectivamente. Otro estudio

Tabla 1. Distribución de las distintas variantes de EPIYA de acuerdo a los grados de lesión histopatológica en muestras de pacientes con gastritis crónica.

| Tipo de EPIYA | Atrofia gástrica |      | Infiltración por granulocitos |      |              |      | Infiltración por linfocitos |      |              |      | Total        |      |        |      |
|---------------|------------------|------|-------------------------------|------|--------------|------|-----------------------------|------|--------------|------|--------------|------|--------|------|
|               | Presencia (n=65) |      | Ausencia (n=16)               |      | GO/G1 (n=61) |      | G2/G3 (n=20)                |      | L0/L1 (n=54) |      | L2/L3 (n=27) |      | (n=81) |      |
|               | n                | %    | n                             | %    | n            | %    | n                           | %    | n            | %    | n            | %    | n      | %    |
| ABC           | 39               | 59,4 | 8                             | 50,0 | 35           | 56,7 | 12                          | 60,0 | 30           | 54,7 | 17           | 63,0 | 47     | 58,0 |
| ABCC          | 24               | 37,5 | 7                             | 43,8 | 24           | 40,0 | 7                           | 35,0 | 23           | 43,4 | 8            | 29,6 | 31     | 38,3 |
| ABCCC         | 2                | 3,1  | 1                             | 6,2  | 2            | 3,3  | 1                           | 5,0  | 1            | 1,9  | 2            | 7,4  | 3      | 3,7  |
| ABCC + ABCCC  | 26               | 40,0 | 8                             | 50,0 | 26           | 42,6 | 8                           | 40,0 | 24           | 44,4 | 10           | 37,0 | 34     | 42,0 |

Evaluación histológica de la gastritis según sistema Sydney [22]: infiltración por granulocitos (G0/G1, ausencia y leve; G2/G3, moderado y severo), infiltración por linfocitos (L0/L1, ausencia y leve; L2/L3, moderado y severo). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos (p<0,05).

con aislados mexicanos de *H. pylori cagA* positivos reportó cerca del 30% de los mismos con 2 o 3 motivos EPIYA-C [26].

Rizzato *et al* [27] describen en muestras de pacientes venezolanos y mexicanos con gastritis crónica, y Torres *et al* [28] en pacientes cubanos, una prevalencia aún mayor de EPIYA ABC (70.37/73,6%), mientras que los tipos ABCC y ABCCC fueron encontrados en 18,5/20,0% y 3,7/2,1%, respectivamente. En el estudio de Rizzato *et al* [27] la frecuencia detectada de EPIYA ABC en muestras provenientes de pacientes con cáncer gástrico fue de 88,4%, y no se encontraron muestras con EPIYA ABCCC en las mismas. Por último, la prevalencia de EPIYA ABC encontrada es muy similar a la reportada en un estudio que analizó cepas de *H. pylori* de Inglaterra y Escocia (62,3%) [24].

Las técnicas de PCR permiten de manera confiable establecer la correspondencia entre fragmentos amplificados con tamaños de 400/510 pb o 500/610 pb y la combinación de motivos EPIYA ABC y ABCC, respectivamente [16,21]. Adicionalmente, no detectamos amplificación de fragmentos correspondientes a *cagA* con dos repetidos EPIYA. Por lo tanto, en la gran mayoría de los casos (ABC+ABCC=96,5%), el tamaño de los productos de PCR obtenidos permitió predecir el número y tipo de EPIYA presente. Debido a que las reacciones de PCR empleadas no permiten establecer el tipo de motivo EPIYA exacto entre las combinaciones ABCCC y ABABC, las 3 muestras con tamaño correspondiente a 5 repetidos EPIYA fueron secuenciadas, confirmando la combinación ABCCC. A diferencia de estudios recientes llevados a cabo en nuestro continente, no fueron detectadas muestras con combinaciones de dos motivos EPIYA, ni con el tipo ABABC [26,28].

Evidenciamos baja prevalencia de cepas con tres repeticiones EPIYA-C, las cuales han sido asociadas en países occidentales con un mayor riesgo a cáncer gástrico, debido a que los motivos de EPIYA-C presentan una alta afinidad por la SHP-2 [5]. No se detectó en ninguna muestra la variante EPIYA ABD, la cual es característica de las muestras del este de Asia [24]. Esta variante se asocia con mayor inducción en el aumento de la oncogénesis, del fenotipo colibrí y del incremento del índice de gastritis crónica y cáncer [5,15].

Aunque hay evidencias en aumento de que la presencia de múltiples segmentos de EPIYA-C está involucrada desarrollo de enfermedades gástricas, [25,29,30] no se encontró asociación entre el número de EPIYA-C y la severidad de cambios histopatológicos en la mucosa gástrica. Resultados similares han sido reportados en otros estudios en poblaciones de Colombia e Irán, en los cuales no se detectó una correlación positiva entre el número de motivos EPIYA y diferentes enfermedades gastroduodenales asociadas a la infección por *H. pylori* [31,32]. Por otra parte, Batista *et al* [33] demostraron en cepas de *H. pylori* obtenidas de pacientes con gastritis en Brasil que el cáncer gástrico, la atrofia y la metaplasia intestinal están asociados con un mayor número de motivos EPIYA-C, sin embargo,

no encontraron asociación entre las variantes de EPIYA y la formación de úlceras duodenales.

Aunque no se obtuvo la secuencia de nucleótidos de todos los fragmentos, resulta interesante el hecho de que se detectó el motivo EPIYA-B en 6 de los 9 fragmentos secuenciados. De forma similar, Sicinski *et al* [25], reportaron que, de 76 muestras de pacientes colombianos evaluadas, la mitad de las mismas presentaron el motivo EPIYA-B, sin encontrar asociación con el diagnóstico histopatológico. Reyes-Leon *et al* [26] reportaron que en un aislado de *H. pylori* con una combinación EPIYA-ABCC con un motivo EPIYA-B indujo menores niveles de elongación celular y de secreción de IL-8 que los aislados con un patrón ABCC con EPIYA-B, lo que sugiere que esta variante pudiera presentar importancia funcional.

Nuestros resultados sugieren que las cepas de *H. pylori* analizadas presentan en mayor proporción tipos de EPIYA conocidos por su bajo potencial patogénico. Sin embargo, no podemos descartar la influencia del relativamente reducido tamaño de la muestra estudiada y/o la constitución genética del hospedador en nuestras observaciones. Estudios previos de nuestro grupo indican que existe un sinergismo entre los factores de virulencia de *H. pylori* y los polimorfismos genéticos de la citocina proinflamatoria IL-1 que presenta el hospedero con el desarrollo de formas más severas de gastritis crónica en esta región de Venezuela [19,34]. Por otra parte, estudios recientes han reportado actividades proinflamatoria y prooncogénica de CagA independientes de los motivos EPIYA que tal vez sean relevantes para el desarrollo de enfermedades gastroduodenales [25].

Aunque CagA es el marcador de virulencia de *H. pylori* mejor establecido, la sola determinación del status de *cagA* no es suficiente para predecir el resultado clínico en poblaciones con alto riesgo, en las cuales la mayoría de los individuos infectados por *H. pylori*, lo están por cepas *cagA* positivas. Por esta razón, consideramos relevante evaluar con más profundidad el papel de los factores genéticos que determinan la relación *H. pylori*/hospedero, y su influencia en la prevalencia de cáncer gástrico en el país.

## Agradecimientos

Al Dr. José Luis Ramírez por facilitar la secuenciación de ácidos nucleicos en el Centro de Biotecnología de IDEA (Caracas, Venezuela). Este trabajo es el resultado de los proyectos aprobados por el CDCHT-UCLA: 025-ME-2005 y 018-RCS-2011.

## Referencias

1. OMS (Organización Mundial de la Salud). Cáncer (2011). Nota descriptiva N°297. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>. Acceso 16 de enero de 2012.
2. Ministerio del Poder Popular para la Salud. República Bolivariana de Venezuela. Anuario de Mortalidad 2009. Disponible en: <http://www.mpps.gob.ve>. Acceso: junio 2012.

3. Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest.* 2004; 113:321–33.
4. Zúñiga G. *Helicobacter pylori*. *Rev Med Hondur.* 1992; 60:91–5.
5. Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci.* 2005; 96:835–43.
6. Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O, et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut.* 2006; 55:775–81.
7. Markovska R, Boyanova L, Yordanov D, Gergova G, Mitov I. *Helicobacter pylori* oipA genetic diversity and its associations with both disease and *cagA*, *vacA* s, m, and I alleles among Bulgarian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 71:335–40.
8. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. Cag A pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type-specific and disease associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:14648–53.
9. Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol.* 2009; 44:239–48.
10. Jenks PJ, Megraud F, Labigne A. Clinical outcome after infection with *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the cag pathogenicity island. *Gut.* 1998; 43:752–58.
11. Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:14559–64.
12. Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol.* 1995; 19:537–43.
13. Fox J, Wang T. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest.* 2007; 117:60–9.
14. Manxhuka-Kerliu S, Telaku S, Devolli-Disha E, Ahmetaj H, Sahatciu-Meka V, Kerliu A, et al. *Helicobacter pylori* gastritis updated Sydney classification applied in our material. *Prilozi.* 2009; 30:45–60.
15. 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 U S A.* 2002; 99:14428–33.
16. Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakos K, Kalliaropoulos A, Papatheodoridis G, Mentis AF, Archimandritis AJ. Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:488–95.
17. Ghose C, Pérez-Pérez GI, van Doorn LJ, Domínguez-Bello MG, Blaser MJ. High Frequency of Gastric Colonization with Multiple *Helicobacter pylori* Strains in Venezuelan Subjects. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:2635–41.
18. Ortiz-Princz D, Guariglia-Oropeza V, Avila M, Correnti M, Perrone M, Gutierrez B, et al. *Helicobacter pylori* cagA and vacA genotypes in Cuban and Venezuelan populations Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105:331–5.
19. Chiurillo M.A., Moran Y., Cañas M. Valderrama EJ, Armanie E. Infection of specific *Helicobacter pylori*-cag pathogenicity island strains is associated with interleukine-1B gene polymorphisms in Venezuelan chronic gastritis patients. *Dig Dis Sci.* 2011; 56:449–56.
20. Chattopadhyay S, Patra R, Ramamurthy T, Chowdhury A, Santra A, Dhali GK, et al. Multiplex PCR assay for rapid detection and genotyping of *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:2821–4.
21. Jones KR, Joo YM, Jang S, Yoo YJ, Lee HS, Chung IS, et al. Polymorphism in the CagA EPIYA motif impacts development of gastric cancer. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:959–68.
22. Sipponen P, Price A. The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 26:31–4.
23. 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. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:791–5.
24. Argent RH, Hale JL, El-Omar EM, Atherton JC. Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *J Med Microbiol.* 2008; 57:1062–7.
25. Sicinschi LA, Correa P, Peek RM, Camargo MC, Piazuelo 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.
26. Reyes-Leon 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; 75:3445–54.
27. Rizzato C, Torres J, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S, Camorlinga-Ponce M, et al. Variations in *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated genes and their influence in progression to gastric cancer: implications for prevention. *PLoS One.* 2012; 7:e29605.
28. Torres LE, González L, Melián K, Alonso J, Moreno A, Hernández M, et al. EPIYA motif patterns among Cuban *Helicobacter pylori* CagA positive strains. *Biomédica.* 2012; 32:23–31.
29. Yamaoka Y, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Figura N, Kim JG, Kodama T, et al. Relationship between the cagA 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology.* 1999; 117:342–9.
30. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology.* 2008; 135:91–9.
31. 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.
32. Shokrzadeh L, Baghaei K, Yamaoka Y, Dabiri H, Jafari F, Sahebkhietari 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.
33. Batista SA, Rocha GA, Rocha AM, Saraiva IE, Cabral MM, Oliveira RC, Queiroz DM. Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiol.* 2011; 11:61.
34. Chiurillo MA, Moran Y, Cañas M, Valderrama E, Alvarez A, Armanie E. Combination of *Helicobacter pylori*-iceA2 and pro-inflammatory Interleukine-1 polymorphisms is associated with the severity of histological changes in Venezuelan chronic gastritis patients. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 59:170–6.