

XIV ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES DE LA UNL
14- 15 DE OCTUBRE DE 2015. SANTA FE, ARGENTINA

**Estudio de factores asociados a la patogénesis de la infección
por *Helicobacter pylori*.**

Pamela Bucci

*Becaria de Posgrado Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral
Laboratorio de Práctica Profesional de Bioquímica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional del Litoral. Hospital Dr. J.M. Cullen. Avda. Freyre 2150. 3000. Santa Fe
Área temática: Ciencias de la Salud Sub-área: Medicina*

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un bacilo gram-negativo, curvado y microaerófilo que puede encontrarse en la mucosa gástrica del estómago humano merced a su capacidad de sintetizar y secretar la enzima ureasa, modificando el pH gástrico y generando condiciones permisivas para la colonización (Marshall y Warren, 1983). *H. pylori*, el patógeno gástrico de más amplia distribución mundial (en promedio, el 50% de la población se encuentra infectada, con regiones que alcanzan prevalencias del 90 %) es responsable de cuadros de gastritis crónica, enfermedad ulcero péptica y es un factor etiológico importante en la secuencia que conduce al carcinoma gástrico (Gohy col., 2011; Toller y col., 2011; Zabaletta, 2012). Los diversos cuadros clínicos que presentan los pacientes infectados podrían deberse, entre otras causas, a la presencia de factores de virulencia específicos de la bacteria, a la diversidad genética de diferentes cepas de la misma y a factores inherentes al huésped (Yamaoka, 2010; Hunt y col., 2011; Conteduca y col., 2013). Entre los factores de virulencia de la bacteria merecen destacarse los productos de los genes *cagA*, *vacA* y *babA2*. *CagA* activa vías que inducen la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis, un alargamiento celular típico y la respuesta inflamatoria (Ricci y col., 2011; Chung y Lim, 2014). La toxina codificada por el gen *vacA* (que puede presentar las variantes alélicas conocidas como *vacAs1m1*, *vacAs1m2*, *vacAs2m1* y *vacAs2m2*), induce a la formación de vacuolas en células epiteliales *in vitro*, causa degeneración vascular de las células gástricas y ulceración de la mucosa gástrica (Cover y Blaser, 1992). La adhesina BabA es una proteína de membrana externa codificada por los genes *babA1* y *babA2*, aunque sólo éste último es funcional. El principal papel patogénico de la proteína BabA2 consiste en el efecto sinérgico que presenta con los otros factores de patogenia, ya que optimizaría la acción de estos últimos, al dar lugar a una mayor alteración del epitelio gástrico (Chen y col. 2013). Las amplias diferencias geográficas mundiales en relación a la incidencia del cáncer gástrico y a la mortalidad atribuida a éste, indicarían que existen múltiples factores que influirían en su desarrollo, entre ellos: la infección con *H.pylori* y la virulencia de las cepas (Yamaoka, 2010), la herencia (se postula que los familiares de primer grado tienen un riesgo 2 a 3 veces superior sobre el resto de la población), mutaciones en el gen supresor de tumor *tp53*, sobre-expresión, amplificación y mutación de oncogenes (*c-kit*, *ras*, *HER-2/neu*, *c-myc*,) y polimorfismos en genes de citoquinas (entre éstos, polimorfismos de simple nucleótido, SNP, en promotores de *IL-6* e *IL-8*), entre otras causas (Sugimoto y col., 2010; da Costa y col., 2013). Se ha mencionado que existiría una relación entre la

infección por *H. pylori* e IL-6, porque los niveles de ARNm de ésta se correlacionan con el grado de inflamación en la mucosa gástrica asociada a la infección. En relación al SNP -174 G>C en el promotor del gen de IL-6, se han reportado mayores niveles de esta interleuquina en los individuos con el alelo GG (Lobo Gatti y col., 2007). En cuanto al tratamiento de erradicación de *H.pylori*, las drogas utilizadas incluyen a la claritromicina, amoxicilina y un inhibidor de la bomba de protones (IBPs) como fármacos recomendados en la terapia de primera línea. La tasa de erradicación es variable según la región, debido principalmente al aumento de la resistencia a claritromicina, la cual es una consecuencia de mutaciones puntuales en el dominio V del gen 23S ARNr, siendo las más prevalentes en todo el mundo las A2142G y A2143G (Suzuki y col, 2013).

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes antes mencionados, en el presente trabajo nos propusimos:

- a) Identificar factores de virulencia de la bacteria *H. pylori* (*cagA*, *vacA* y *babA2*) en biopsias gástricas de pacientes adultos sintomáticos infectados de nuestra región.
- b) Correlacionar los genotipos presentes con los hallazgos histológicos en cada paciente.
- c) Comenzar a evaluar polimorfismos en secuencias promotoras de genes de Interleuquinas.
- c) Detectar la presencia de mutaciones que confieren resistencia a claritromicina.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes y Muestras. Criterio de inclusión: Pacientes sintomáticos (ardor, pirosis, dolor abdominal recurrente, pérdida de peso o intolerancia selectiva a ciertas ingestas) atendidos en el Servicio de Gastroenterología del Hospital "Dr.J.M. Cullen" (Santa Fe), con indicación de fibroendoscopia digestiva alta (N=169), 18–67 años). **Criterio de exclusión:** Pacientes que hubieran recibido en los últimos 15 días terapia con antibióticos, antagonistas de receptores H₂ e Inhibidores de la bomba de protones (IBPs). En la endoscopia, se obtuvieron 6 muestras de la región antral: 2 para el test de ureasa rápida, 2 para el examen histológico y 2 para el análisis molecular. Se registraron: género, edad y diagnóstico anatomopatológico de cada paciente.

Purificación de ADN. Se purificó ADN genómico utilizando columnas de adsorción. La integridad y masa del ADN extraído se evaluó por electroforesis, y posterior lectura de absorbancia a 260 y 280 nm. Las muestras de ADN se conservaron a -20°C hasta su uso en las distintas reacciones de amplificación.

Detección molecular y genotipificación de *H. pylori*. Para la identificación molecular de *H. pylori*, se realizó una amplificación por *nested*-PCR del gen *hsp60*. Los genes *cagA*, *babA2* y las variantes alélicas del gen *vacA* fueron analizados por una PCR de punto final múltiple. En todos los casos, los productos formados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa.

Análisis del polimorfismo en el promotor del gen de Interleuquina 6. El polimorfismo -174 G/C fue analizado por RFLP-PCR. Luego de la amplificación por PCR, los productos fueron digeridos con la enzima *NlaIII* y analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Detección de mecanismos de resistencia a claritromicina por PCR-RFLP. Para la detección de mutaciones responsables de resistencia a claritromicina, se realizó una amplificación por PCR de una secuencia correspondiente al dominio V del gen 23S ARNr seguido de una digestión con las enzimas *MbolI*, para la mutación A2142G y *BsaI* para la mutación A2143G, generando los fragmentos indicados en la **Figura 1**.

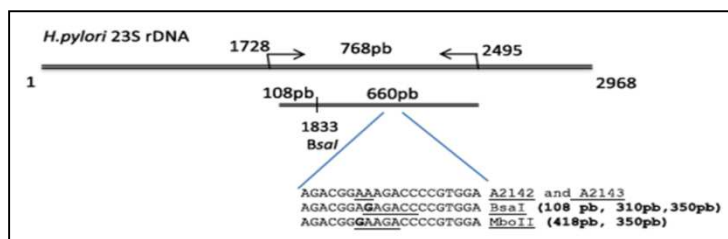


Figura 1. Representación gráfica del gen que codifica la región 23S ARNr de *H. pylori*, posición de apareamiento de *primers* usados para la PCR y fragmentos de restricción generados.

Análisis estadístico. La evaluación de los resultados obtenidos incluyó el análisis de asociación entre variables categóricas utilizando el test exacto de Fisher. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo. La fuerza de la asociación se evaluó a través de Odds ratio (OR) (intervalo de confianza del 95%).

RESULTADOS

La **Figura 2** es una imagen representativa de la PCR múltiple para los genes *cagA*, *babA2* y *vacA* (con sus variantes alélicas). La prevalencia de *H. pylori* en la población estudiada ($n=169$) fue del 42%. El total de muestras positivas para *H. pylori* ($n= 70$) tuvo diagnóstico de gastritis. En éstos, la frecuencia de los genotipos *cagA*, *vacA* y *babA2* fue de 41%, 100% y 60%, respectivamente. La combinación alélica mas frecuente del gen *vacA* fue la s1m1 (64%) (s2m2, s1m2 y s2m1 se encontraron en un 19, 16 y 1.4%, respectivamente, **Fig. 3**).

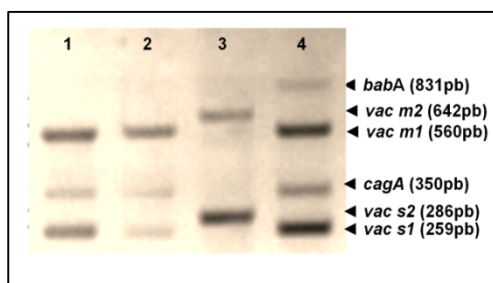


Figura 2. PCR Múltiple para *cagA*, *babA2* y *vacA*.

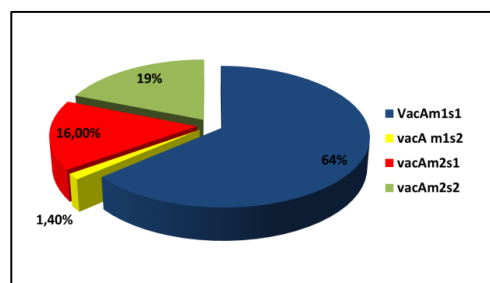
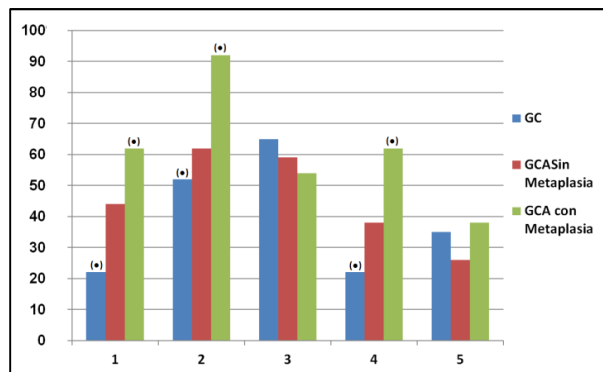


Figura 3. Variantes alélicas de *VacA*.

Los pacientes con *H. pylori* (+) pudieron clasificarse, de acuerdo al análisis histológico, en 3 grupos: a) Pacientes con **Gastritis Crónica (GC)**, b) Pacientes con **Gastritis Crónica Activa sin Metaplasia Intestinal (GCASinMI)** y c) Pacientes con **Gastritis Crónica Activa con Metaplasia Intestinal (GCAconMI)**. Llamativamente, el grupo con **GCAconMI** mostró la mayor proporción de cepas de *H. pylori* con los genotipos *cagA* (+), *vacAs1m1* y la combinación *cagA* (+)/*vacAs1m1*. No hubo diferencias significativas en la proporción de genotipos de *H. pylori* encontrados entre los grupos **GC** y **GCASinMI**. Por el contrario, el número de cepas portadoras de los genes *cagA*, *vacAs1m1* y de la combinación *cagA* (+)/*vacAs1m1* fue mayor en el grupo **GCAconMI** que en el grupo **GC** ($p < 0.05$) (Odds ratio: 5.8IC:1,3-25,3). No se encontró asociación significativa entre el genotipo "triple virulento" (*cagA*+/*vacAs1m1*/*babA2*+) y los distintos diagnósticos histopatológicos ($p > 0.05$) (**Fig.4**).

Figura 4. Frecuencia de genotipos de *H. pylori* y grupos histológicos.

- 1, *cagA* (+);
 - 2, *vacAs1m1*;
 - 3, *babA2*;
 - 4, *cagA* (+)/*vacAs1m1*;
 - 5, *cagA* (+)/*vacAs1m1/babA2*.
- (●)Diferencia significativa.



No encontramos, hasta el momento, diferencias entre los grupos **GCAsinMI** y **GCAconMI**, para los distintos genotipos analizados. En este sentido, es probable que la presencia de otros genes distintos a los estudiados en este trabajo y/o determinantes de la respuesta inflamatoria de cada individuo puedan influenciar el cuadro de los pacientes que presentaron metaplasia intestinal. Para testear esta hipótesis, comenzamos a evaluar la presencia de un polimorfismo en el promotor del gen de la IL-6 (-174 G>C) (**Fig. 5**).

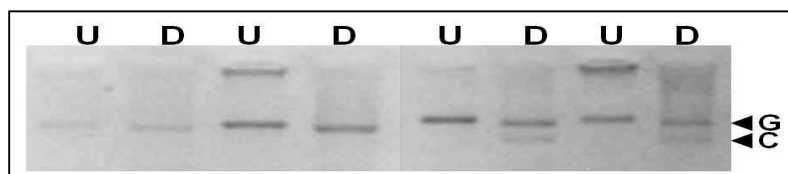


Figura 5. Análisis del polimorfismo en el promotor del gen de IL-6. U, muestra sin digerir; D, muestra digerida con la enzima *Nla III*.

Aunque la diferencia no es estadísticamente significativa, la proporción del haplotipo GG fue mayor en los pacientes que presentaban metaplasia intestinal, sin discriminar los genotipos de *H. pylori* presentes (75% vs 59%). De manera interesante, encontramos diferencias cuando el análisis incluye sólo a pacientes que presentan el genotipo *cagA*(+)/*vacAs1m1* ($p < 0.05$; Odds ratio 6.4, IC=1.4-27.4)

Finalmente, para la búsqueda de mutaciones que confieren resistencia a la claritromicina, se pudo amplificar de manera específica y con rendimientos apropiados, el producto de 768 pb dentro del cual se ubican las mutaciones bajo estudio. Luego, la digestión con *MbolI* y con *BsaI* permitió poner de manifiesto la presencia de las mutaciones A2142G y A2143G, respectivamente (**Fig. 6**). En este aspecto evaluado, se procesaron 43 muestras de pacientes infectados, en las cuales se detectaron 2 pacientes que presentaron la mutación A2142G y 4 que portaban la mutación A2143G, lo que -hasta el momento- representa un porcentaje de resistencia del 14%.

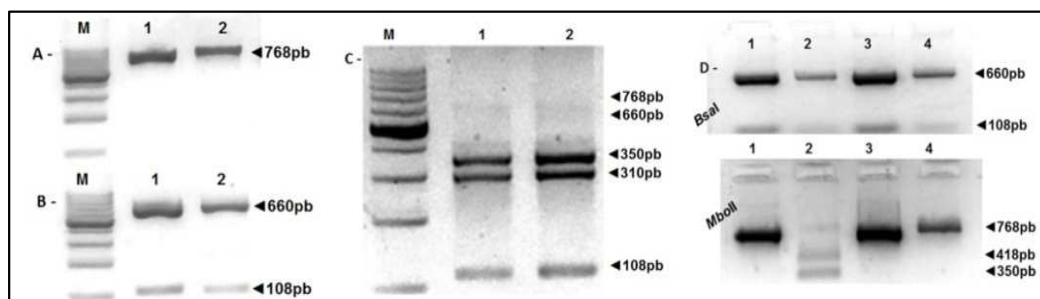


Figura 6. Detección de resistencia a claritromicina por PCR-RFLP. A, amplicones sin digerir; B, amplicones digeridos con *BsaI* (wild type); C., amplicones digeridos con *BsaI* (mutación A2143G); D, Panel superior: amplicones digeridos con *BsaI* (wild type), Panel inferior, amplicones digeridos con *MbolI*, la muestra 2 presenta la mutación A2142G.

CONCLUSIONES

- A partir de los estudios de identificación molecular y de genotipificación de *Helicobacter pylori*, hemos podido caracterizar las cepas prevalentes en nuestra región. La prevalencia de *H. pylori* encontrada es similar a lo reportado para el promedio de la población mundial.
- Histológicamente, los pacientes estudiados no constituyeron un grupo homogéneo. Se establecieron 3 grupos: pacientes con Gastritis Crónica, pacientes con Gastritis Crónica Activa sin Metaplasia y pacientes con Gastritis Crónica Activa con Metaplasia.
- Un 19% de los pacientes *H. pylori* (+) presentó lesiones pre-neoplásicas (metaplasia intestinal). En este grupo, se encontró la mayor proporción de cepas portadoras de los factores de virulencia más citotóxicos (cagA y VacAs1m1).
- Además, estos pacientes presentaron la mayor proporción del haplotipo GG cuando se analizó el polimorfismo en el promotor del gen de Interleuquina 6.
- Los resultados obtenidos hasta el momento indicarían que la combinación de factores específicos de la bacteria (factores de virulencia) con determinantes de la respuesta inflamatoria del huésped (IL-6) estarían involucrados en el desarrollo de patologías gástricas más severas.
- Finalmente, pudimos establecer los primeros datos reportados de detección de mecanismos de resistencia a claritromicina en pacientes de la provincia de Santa Fe, encontrando una significativa proporción de cepas resistentes a claritromicina.

REFERENCIAS

- Chen M, y col. (2013) Association of *Helicobacter pylori* babA2 with peptic ulcer disease and gastric cancer. *World J Gastroenterol*; 19:4242-4251.
- Chung HW, Lim JB. (2014) Role of the tumor microenvironment in the pathogenesis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*; 20:1667-1680.
- Conteduca V y col.. (2013) *H. pylori* infection and gastric cancer: State of the art (Review) *Int.J. Oncology*; 42:5-18.
- Cover TL, Blaser MJ. (1992) Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J BiolChem*; 267:10570-10575.
- da Costa DM y col. (2013) Interleukin polymorphisms and differential methylation status in gastric cancer: an association with *Helicobacter pylori* infection. *Epigenomics*; 5:167-175.
- Goh KL y col. (2011) Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection and Public Health Implications. *Helicobacter*; 16:1-9.
- Hunt RH y col. (2011) *Helicobacter pylori* in developing countries. World Gastroenterology Organization Global Guideline. *J Gastrointest Liver Dis* ; 20:299-304.
- Lobo Gatti, L, y col. (2007) Interleukin-6 Polymorphisms, *Helicobacter pylori* Infection in Adult Brazilian Patients with Chronic Gastritis and Gastric Adenocarcinoma. *Archives of Medical Research*; 38: 551-555.
- Marshall BJ, Warren JR. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*; 321:1273-1275.
- Ricci V, y col. (2011) Molecular cross-talk between *Helicobacter pylori* and human gastric mucosa. *World J Gastroenterol*; 17:1383-1399.
- Sugimoto M y col.. (2010) Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. *World J Gastroenterol*; 16:1188-1200.
- Suzuki RB y col. (2013) *Helicobacter pylori* primary resistance to clarithromycin in gastric biopsy specimens from dyspeptic patients of a city in the interior of São Paulo, Brazil. *BMC Gastroenterology*; 13:164-171.
- Toller IM y col. (2011) Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proc. Natl Acad Sci USA*; 108:14944-14949.
- Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. (2010) *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; 7:629-641.
- Zabaleta J. (2012) Multifactorial Etiology of Gastric Cancer. *Methods Mol Biol*; 863:411-435.