



Detección molecular simultánea de diferentes genotipos de *Helicobacter pylori*

Juan Carlos Bravata-Alcántara,* Rodolfo Ocadiz-Delgado,** Mónica Sierra-Martínez,* Octavio Daniel Reyes-Hernández,* Eduardo Stalin García-López, Gustavo Acosta-Altamirano,* Martín Antonio Manrique,* José Bonilla-Delgado,* Enoc Mariano Cortés-Malagón*

RESUMEN

Introducción. La infección con ciertos genotipos de *Helicobacter pylori* está ampliamente asociada con gastritis, úlcera gastroduodenal, linfoma tipo Maltoma, y es considerado un importante factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico.

Objetivo. Estandarizar un ensayo molecular en el cual se detectan de manera simultánea los diferentes genotipos de *Helicobacter pylori*. **Material y métodos.** Para esto se utilizaron tres juegos de oligonucleótidos que flanquean las regiones vacA_{s1}/vacA_{s2}, vacA_{m1}/vacA_{m2} y CagA. **Resultados.** Utilizando la cepa control 26695 y muestras provenientes de pacientes con enfermedad gástrica logramos establecer las condiciones necesarias para aplicar esta técnica diagnóstica en la tipificación de *Helicobacter pylori*. **Conclusión.** Con este estudio existe la posibilidad de detectar más rápido y sencillo los genotipos de *Helicobacter pylori* asociados con el cáncer gástrico, con menos tiempo y costo.

Palabras clave: Cáncer, *Helicobacter*, PCR, VacA, CagA.

ABSTRACT

Introduction. The bacterial pathogen *Helicobacter pylori* chronically infects the human gastric mucosa and is the leading risk factor for the development of gastric cancer. **Material and methods.** *Helicobacter pylori* culture is an invasive, time consuming method, offering quite low sensitivity, requiring significant cost, and which, in practice, tests very few antibiotics, with a questionable contribution to the management of patients. **Results.** Therefore, we evaluated a simple, novel multiplex PCR assay for rapid detection of *Helicobacter pylori* infection and for the determination of vacA and cagA genotypes. This multiplex PCR assay would be of particularly great value for molecular diagnosis laboratory of Hospital Juárez de México. **Conclusion.** In this study the possibility of faster and easier to detect genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric cancer, with less time and cost.

Key words: Cancer, *Helicobacter*, PCR, VacA, CagA.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, microareofílica, de forma espiral que infecta la mucosa gástrica de 50% de la población mundial, en los países en vías de desarrollo la tasa de infección puede ser de hasta 90%.¹ La infección con *H. pylori* usualmente ocurre durante la niñez, y un individuo infectado típicamente permanece infectado a través de su vida.² Mientras que la infección es principalmente asintomática, la enfermedad en individuos sintomáticos varía desde las formas leves (gastritis), moderadas (úlcera péptica) hasta más severas

(cáncer gástrico en la forma de adenocarcinoma o de linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas).^{2,3}

La infección con *Helicobacter pylori* es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de cáncer gástrico. Algunos estudios epidemiológicos han determinado que el riesgo atribuible para cáncer gástrico conferido por la infección con *H. pylori* es de aproximadamente 75%, aunque la infección aumenta significativamente el riesgo de desarrollar tanto adenocarcinoma gástrico de tipo difuso como intestinal, se sugiere que hay otros factores relacionados y que son diferentes para cada subtipo. La erradicación de *H. pylori* significativamente reduce el riesgo de desarrollar cáncer gástrico en individuos infectados que no tienen lesiones premalignas, reforzando el principio de que este organismo tiene influencia en las primeras etapas de la carcinogénesis gástrica. Sin embargo, sólo una pequeña proporción de personas colonizadas desarrollarán neopla-

* Laboratorio de Genética y Diagnóstico Molecular, División de Investigación del Hospital Juárez de México.

** Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Genética y Biología Molecular.

sia. El riesgo de enfermedad involucra una muy buena coreografía entre el patógeno y el huésped, lo cual a su vez depende de la cepa bacteriana y de la susceptibilidad del huésped.⁴

Helicobacter pylori posee un conjunto de factores que facilitan su desarrollo en el estómago, asegurando su supervivencia e induciendo una interacción con las células del huésped. Se han propuesto varios factores de virulencia como *cagA*, *vacA* y *babA*, entre otros. Aunque se han asociado con un mayor riesgo de enfermedad ulcerosa péptica, adenocarcinoma gástrico o linfoma tipo MALT, ninguno de ellos implica por sí mismo el desarrollo de una enfermedad en concreto. Esta asociación aumenta cuantos más factores de virulencia acumula una bacteria.⁵ La proteína VacA es una toxina codificada por el gen *vacA*, que induce vacuolización en las células epiteliales, la muerte celular y la destrucción de la integridad epitelial. Es producida por aproximadamente 50% de las cepas de *H. pylori*. La infección por cepas que producen la toxina es más frecuente en pacientes con úlcera péptica y cáncer gástrico que en pacientes que sólo padecen gastritis.⁶ Otros estudios no encuentran esta relación, y una posible explicación es que el gen *vacA* tiene una estructura mosaico con varias formas posibles de presentación. Cuatro en la secuencia señal, que son *s1a*, *s1b*, *s1c* y *s2* y tres en la región media, *m1*, *m2a* y *m2b*. De la combinación de éstos podrían generarse distintos genotipos que podrían tener comportamientos más o menos agresivos.^{7,8} Así, las cepas *s1/m1* son más citotóxicas que las *s1/m2*. VacA se une a receptores tioproteínas tirosin-fosfatasa (RPTP) y la glicosidación pos-traduccional de los dominios RPTP pueden implicar diferentes respuestas celulares a las cepas *m1* vacA o *m2* vacA. Recientemente ha sido descrita una nueva región en el gen *vacA* que es la región intermedia, y que tiene varias posibles formas de presentación, *i1* e *i2*. Las cepas con la presentación *i1* son más citotóxicas y se encuentran más asociadas con la estructura alélica *s1m1*.⁹

La isla de patogenicidad Cag (Cag PAI) es un elemento de inserción de 40 kb, el cual contiene de 27 a 31 genes flanqueados por repeticiones directas de 31 pb.¹⁰ CagA es el factor de virulencia más ampliamente estudiado. Hay dos tipos de aislados clínicos de *H. pylori*: las cepas positivas y negativas a CagA. En los países occidentales se ha reportado que los individuos infectados con cepas positivas a CagA tienen alto riesgo de desarrollar úlcera péptica o cáncer gástrico en comparación con aquéllos con cepas negativas.¹¹ En el Asia Oriental, sin embargo, la mayoría de las cepas de *H. pylori* tienen el gen CagA independientemente de la enfermedad, por lo tanto, la diferencia patogénica es difícil de explicar simplemente en términos de la presencia o ausencia del gen CagA.¹²

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Para estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR-multiplex) se utilizó la cepa control *Helicobacter pylori* 26695, así como también cinco muestras de pacientes que tenían enfermedad gástrica.

Detección de los genes de virulencia *vacA* y *cagA* de *H. pylori* por PCR multiplex

Para la detección de *vacA* y *cagA* se utilizaron los primers, descritos por Chattopadhyay y cols. (Cuadro 1).¹³ La mezcla de reacción para la PCR-multiplex se realizó a un volumen final de 25 μ L que contenía 5 pmol de los primers VAG-F y VAG-R, 10 pmol de CagA-F y CagA-R, 25 pmol de VAI-F y VAI-R, 1.5 mM de MgCl₂, 0.25 mM de dNTP's, Buffer para PCR 1X y 0.9 U de Taq pol hot star. Las condiciones de la PCR fueron: desnaturización inicial a 96 °C por 10 minutos; seguida de 40 ciclos a 94 °C por un minuto, 55 °C por un minuto, 72 °C por un minuto y extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Cuadro 1. Oligonucleótidos usados para amplificación de los alelos VacA y CagA.

Región amplificada	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del amplicón (pb)
vacAs1/vacAs2	VAI-F	5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3'	259/286
	VAI-R	5'-CTGCTTGAATGCCCAAAC-3'	
vacAm1/vacAm2	VAG-F	5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3'	567/642
	VAG-R	5'-GCGTAAAATAATTCAAGG-3'	
cagA	CagA-F	5'-GATAAACAGGCAAGCTTTGA-3'	350
	CagA-R	5' - CTGAAAAGATTGTTGGCA-3'	



Análisis de las muestras amplificadas por electroforesis en geles de agarosa

Después de la amplificación del ADN, 10 μ L de cada muestra se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.5% bajo las siguientes condiciones: 120 volts, por 130 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz UV utilizando el sistema de foto-documentación GEL LOGIC 100 IMAGING SYSTEM (KODAK).

RESULTADOS

Con el propósito de hacer una detección y genotipificación rápida de *Helicobacter pylori* se estandarizó la PCR multiplex diseñada por Chattopadhyay y cols. En un principio se utilizaron las mismas condiciones sugeridas por Chattopadhyay y cols., sin embargo, no fuimos capaces de amplificar la región de CagA, por lo tanto, cambiamos la secuencia de primers de CagA. En una segunda amplificación múltiple, utilizando los nuevos primers, la secuencia

CagA fue amplificada exitosamente; sin embargo, la secuencia VacA m1 no amplificó. En una tercera amplificación modificamos la concentración de los primers, para el caso de VAG fueron de 2.5 pmoles a 5 pmoles, para el caso de los primers restantes la concentración quedó igual a la sugerida por Chattopadhyay y cols. Cuando realizamos la electroforesis en gel de agarosa observamos tres amplificados de diferentes tamaños (Figura 1), uno de aproximadamente 259 pb que corresponde a la región VacA s1, otro de 350 pb que corresponde a la región CagA. Curiosamente amplificamos la región VacA m1; sin embargo, la banda es de aproximadamente 700 pb y no de 567/642 pb para vacA m1/vacA m2, respectivamente, como lo indican Chattopadhyay y cols.

Posteriormente, las últimas condiciones de amplificación se aplicaron a muestras que provenían de pacientes con enfermedad gástrica (Figura 2), de las cuales se puede observar que cuatro muestras son positivas para el alelo VacA s1, VacA m1 y CagA; tres muestras fueron positivas para VacA s1 y VacA m1; una muestra solamente positiva para CagA. Interesantemente encontramos una muestra positiva para el alelo VacA s2, VacA m1.

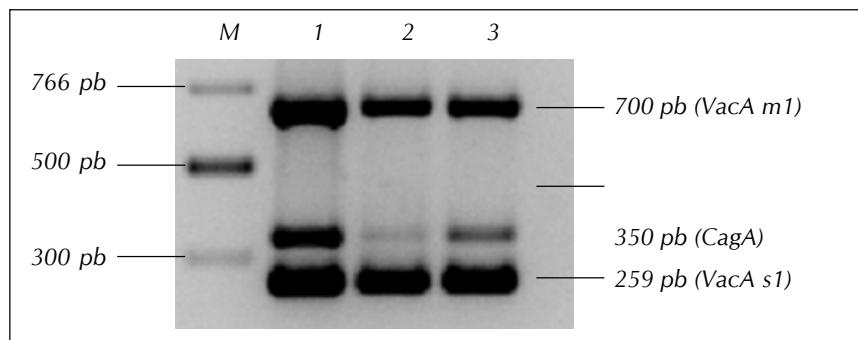


Figura 1. Amplificación de los alelos VacA s1, VacA s2, VacA m1, VacA m2 y del gen CagA. Línea M, marcador de peso molecular conocido; línea 1, cepa 26695; líneas 2 y 3, muestras HP1 y HP2 con positividad previa a CagA.

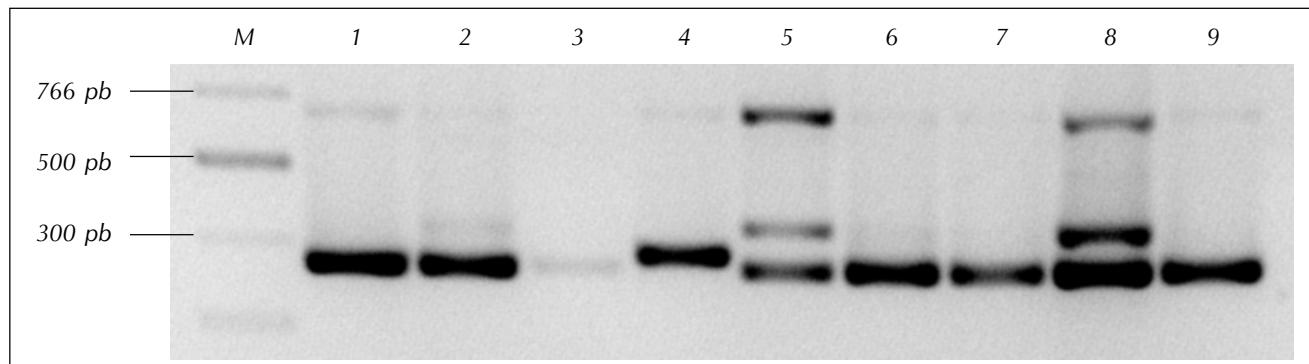


Figura 2. Amplificación de los alelos VacA s1, VacA s2, VacA m1, VacA m2 y del gen CagA en muestras provenientes de pacientes con enfermedad gástrica. Línea M, marcador de peso molecular conocido; líneas 1, 4, 7 y 9 positivas para el alelo VacA s1 y VacA m1; líneas 2, 5, 6 y 8 positivas para el alelo VacA s1, VacA m1 y CagA, línea 3 positiva para CagA; línea 4 positiva para el alelo VacA m2 y VacA m1.

DISCUSIÓN

En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas que permiten detectar la presencia del DNA de *H. pylori* directamente en la biopsia gástrica. La mayoría de las técnicas se basan en la PCR tanto clásica como a tiempo real y presentan diferentes objetivos de diagnóstico, siendo fundamentales los siguientes: la detección de genes específicos de la bacteria, de los factores de virulencia, de los mecanismos de resistencia, así como de la detección de diferentes alelos.¹⁴

Atherton y col.¹⁵ realizaron el primer reporte de la existencia de tres familias diferentes de secuencias señales de *vacA* (*s1a*, *s1b*, *s2*) y de dos diferentes familias de los alelos de la región media (*m1* y *m2*). Los autores refirieron que los genotipos *vacA* son mosaicos de las secuencias señal y regiones medias y todas las combinaciones posibles de estas regiones, han sido identificadas. A partir de ese momento muchas investigaciones han sido realizadas sobre los genotipos de *vacA* de *H. pylori*, demostrándose que *s1* y *m1* están estrechamente asociados con el nivel de actividad de VacA *in vitro*, así como de sus consecuencias clínicas [16, 17]. Aunque *vacA* está virtualmente presente en todas las cepas de *H. pylori*, sólo cerca de 50% produce VacA, que al ser purificada, es capaz de inducir necrosis epitelial gástrica y ulceración, cuando se administra por vía oral a ratones. Estudios *in vitro* han demostrado que VacA causa vacuolización masiva y muerte de un número de líneas celulares humanas.¹⁸ La coexistencia de cepas con diferentes genotipos de *vacA* puede ser explicada de diferentes formas. Una de ellas radicaría en que los genotipos diferentes de *vacA*, podrían ofrecer ventajas no competitivas a las cepas. La segunda de ellas sería que diferentes genotipos podrían conferir diferentes ventajas que permitirían que las cepas sobrevivieran en nichos ecológicos diferentes dentro de la mucosa gástrica y la posibilidad de recidivas de la infección, después del tratamiento.¹⁹

En este trabajo se introduce por primera vez en el Hospital Juárez de México la posibilidad de detectar de una forma rápida y sencilla la presencia de genotipos de *Helicobacter pylori* asociados al cáncer gástrico; asimismo, disminuyen tiempo y costo en la detección.

REFERENCIAS

- Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997; 10(4): 720-41.
- Blaser MJ. Epidemiology and pathophysiology of *Campylobacter pylori* infections. Rev Infect Dis 1990; 12(Suppl. 1): S99-106.
- Leodolter A, et al. A meta-analysis comparing eradication, healing and relapse rates in patients with *Helicobacter pylori*-associated gastric or duodenal ulcer. Aliment Pharmacol Ther 2001; 15(12): 1949-58.
- Nagini S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. World J Gastrointest Oncol 2012; 4(7): 156-69.
- Wen S, Moss SF. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. Cancer Lett 2009; 282(1): 1-8.
- Yamazaki S, et al. Distinct diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. J Clin Microbiol 2005; 43(8): 3906-16.
- Yang JC, et al. Vacuolating toxin gene polymorphism among *Helicobacter pylori* clinical isolates and its association with *m1*, *m2*, or chimeric *vacA* middle types. Scand J Gastroenterol 1998; 33(11): 1152-7.
- Rudi J, et al. Diversity of *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. J Clin Microbiol 1998; 36(4): 944-8.
- Rhead JL, et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. Gastroenterology 2007; 133(3): 926-36.
- Akopyants NS, et al. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol 1998; 28(1): 37-53.
- van Doorn LJ, et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1998; 115(1): 58-66.
- Yamaoka Y, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. J Clin Microbiol 1999; 37(7): 2274-9.
- Chattopadhyay S, et al. Multiplex PCR assay for rapid detection and genotyping of *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens. J Clin Microbiol 2004; 42(6): 2821-4.
- Polk DB, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. Nat Rev Cancer 2010; 10(6): 403-14.
- Atherton JC, et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem 1995; 270(30): 17771-7.
- Atherton JC, et al. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1997; 112(1): 92-9.
- Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. Gut 1997; 40(6): 701-3.
- Lupetti P, et al. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. J Cell Biol 1996; 133(4): 801-7.
- Morales-Espinosa R, et al. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. J Clin Microbiol 1999; 37(9): 3001-4.



Solicitud de sobretiros:

Enoc Mariano Cortés Malagón,
Laboratorio de Genética y Diagnóstico Molecular,
División de Investigación del Hospital Juárez
de México,

Av. Instituto Politécnico Nacional 5160,
Col. Magdalena de las Salinas,
Del. Gustavo A. Madero
C.P. 07760, Tel.: 5747-7560.
Correo electrónico: emcortes@cinvestav.mx