

Genotipo cag A⁺ en cepas de *Helicobacter pylori* asociadas a úlcera péptica, gastritis crónica y cáncer gástrico

Cag A⁺ genotype in *Helicobacter pylori* strains associated with peptic ulcer, chronic gastritis and gastric cancer

María Teresa Martínez Echavarría^I; Maximino González Torres^{II}; Raúl Ferreira Capote^{III}; Juan Antonio Mas Páez^{IV}

^I Licenciada en Microbiología. Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras", La Habana, Cuba.

^{II} Especialista de I Grado en Medicina General Integral. Especialista de I Grado en Gastroenterología. Instructor. Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras", La Habana, Cuba.

^{III} Licenciado en Bioquímica. Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras", La Habana, Cuba.

^{IV} Especialista de II Grado en Gastroenterología. Profesor Auxiliar. Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras", La Habana, Cuba.

RESUMEN

Se estudiaron 171 pacientes con úlcera duodenal, úlcera gástrica, gastritis crónica y cáncer gástrico; los 3 últimos confirmados histológicamente. Se analizaron 56 casos con úlcera duodenal, 48 con úlcera gástrica, 47 con gastritis crónica y 20 con cáncer gástrico. Se detectó la presencia de *Helicobacter pylori* mediante PCR en el 98,2 % de las úlceras duodenales; en el 95,8 % de las úlceras gástricas; en el 95,0 % de los cánceres gástricos y en el 93,6 % de las gastritis crónicas, para una prevalencia total del 95,9 %. El genotipaje cag A de las cepas detectadas reportó positividad en el 80,0 % de las úlceras duodenales; en el 72,7 % de las gastritis crónicas; en el 69,6 % de las úlceras gástricas y en el 42,1 % de los cáncer gástricos, para una prevalencia total del 70,7 %. Tanto las úlceras en su conjunto, como la gastritis crónica presentaron una prevalencia de cepas *Helicobacter pylori* cag A⁺ significativamente superior al cáncer gástrico ($p = 0,19$).

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, cag A.

ABSTRACT

171 patients with duodenal ulcer, gastric ulcer, chronic gastritis and gastric cancer were studied. The last 3 were histologically confirmed. 56 cases with duodenal ulcer, 48 with gastric ulcer, 47 with chronic gastritis and 20 with gastric cancer were analyzed. The presence of *Helicobacter pylori* was detected by PCR in 98.2 % of the duodenal ulcers; in 95.8 % of the gastric ulcers; in 95.0 % of the gastric cancers; and in 93.6 % of the chronic gastritis. The cag A genotyping of the strains found proved to be positive in 80.0 % of the duodenal ulcers; in 72.7 % of the chronic gastritis; in 69.6 % of the gastric ulcers; and in 42.1 % of the gastric cancers, for a total prevalence of 70.7 %. Both, the ulcers as a whole and the chronic gastritis showed a prevalence of cag A+ strains of *Helicobacter pylori* significantly higher than gastric cancer ($p = 0,19$).

Key words: *Helicobacter pylori*, cag A.

INTRODUCCIÓN

La infección por *Helicobacter pylori* (Hp) se relaciona patogénicamente con la úlcera duodenal (UD), la úlcera gástrica (UG), la gastritis crónica (GC), el adenocarcinoma gástrico (CG) y el linfoma tipo MALT.¹

La vía de transmisión de Hp no está claramente definida. Existen evidencias de que el ciclo orofecal es más importante que la vía oral-oral, aunque ambas pueden coexistir. La transmisión nosocomial, a través de la endoscopia, también ha sido reportada.

La prevalencia de la infección por Hp se relaciona con la influencia de factores medio ambientales como el nivel higiénico sanitario y la dieta. En general, se definen 2 grupos epidemiológicos. El Grupo 1, integrado por países con precarias condiciones higiénico-sanitarias y que presentan tasas elevadas de infección en la infancia, que en algunos países alcanzan valores de hasta el 85 % y el Grupo 2 que incluye a países en los que su alto nivel de desarrollo se asocia con adecuadas condiciones higiénico-sanitarias, y en él, la infección se concentra en la edad adulta con prevalencias del 11 al 40 %.²

Cuba presenta una situación particular, pues, si bien desde el punto de vista económico debiera ser incluido en el Grupo 1, sus avances en la salud pública definen un perfil higiénico-sanitario muy superior al de este grupo y similar al del Grupo 2. Por tanto, solo estudios epidemiológicos en nuestra población, permitirán definir en qué grupo debe ser incluido nuestro país.

Relacionando las tasas de prevalencia de Hp con enfermedades gastroduodenales, las tasas muestran variaciones que dependen de diferentes factores como son: virulencia de las cepas y estado inmunitario del individuo. La virulencia de la cepa depende de sus características genéticas. El genoma de Hp tiene una región de 40 kb que contiene un conjunto de 40 genes, conocida con el nombre de cag-PAI, cuyo

marcador es el gen *cag A*. Este gen está presente en el 60 % de las cepas y siempre se expresa. Su regulación ocurre al nivel transcripcional. Al respecto se sabe que a un pH < 7 la transcripción del gen es mayor que a pH 7, lo cual indica que la *cag A* pudiera ser una respuesta ácido-tolerante de Hp, mecanismo ya descrito en otras bacterias.

La proteína *cag A* tiene de 120-140 kDa, en dependencia del número de repeticiones intragénicas y constituye la única proteína de Hp con propiedades antigénicas. Luego de su producción en el citoplasma de la bacteria, *cag A* es secretada hacia el epitelio gástrico, donde estimula la producción de la IL-8 en las células epiteliales del hospedero, lo que induce el mecanismo de la inflamación. También se ha visto que estimula la producción de las IL-1 y 6, del TNF- α y del NF- κ B.³

Trabajos recientes señalan el papel patogénico del gen *cag A* y su asociación con enfermedades gastroduodenales, con tasas de prevalencia del 100 % en la UD, cercanas al 90 % en la UG y en la GC y muy variables en el CG, se reportan valores que oscilan entre el 21 y el 95 %.⁴

Con este trabajo nos proponemos estimar la asociación presente en nuestra población entre la infección por cepas de Hp *cag A+* y diferentes enfermedades gastroduodenales, como son la UG, UD, GC y CG. Así como determinar la prevalencia de Hp en enfermos con estas afecciones, caracterizar las cepas detectadas en cuanto a su genotipo *cag A* y conocer la prevalencia de este genotipo en esos pacientes y correlacionar la presencia de Hp y de su genotipo *cag A* como indicador de citotoxicidad en el desarrollo de UG, UD, GC y CG.

MÉTODOS

Se realiza un estudio prospectivo y descriptivo de mayo de 2001 a diciembre de 2003 a 171 pacientes cubanos adultos a los que se les realizó una panendoscopia con un videogastroscoPIO PENTAX EG 2931 y pinzas o fórceps de biopsias de la firma OLYMPUS. Se incluyeron los pacientes con diagnóstico endoscópico de UD o UG, de GC y de CG, los 3 últimos confirmados histológicamente. Se excluyeron los pacientes tratados con antibióticos, derivados imidazólicos o productos bismutados, omeprazol (o sus variantes farmacológicas), aspirina, antiinflamatorios no esteroideos y esteroideos en los últimos 30 d previos a la endoscopia, con sangrado digestivo alto activo, cirugía gástrica previa (gastrectomía) y con síndrome pilórico completo o incompleto.

A los casos con diagnóstico endoscópico de GC, UG o CG se les tomó una muestra para biopsia que se sumergió en una solución de formol al 10 %, con el fin de la confirmación histológica.

Para la detección de Hp y el genotipaje *cag A*, se tomó una muestra para biopsia gástrica antral a 5 cm del píloro. La muestra obtenida se colocó en un microtubo con 0,5 mL de solución salina fisiológica estéril. Luego se sometió al proceso de extracción de ADN mediante el método de lisis total con Tween 20 y proteinasa K.⁵

Para detectar Hp se amplificó un fragmento de 204 pb del gen *ure A*, mediante un sistema seminested-primer.⁶ Se utilizaron los cebadores descritos en la [tabla 1](#), sintetizados por la GIBCO. Las reacciones se realizaron en un termociclador *minicycler research*. El programa tuvo las siguientes características: 94 °C x 1 min,

55 °C x 1 min y 72 °C x 1 min. Se realizan 30 ciclos para el primer proceso y 20 ciclos para el segundo.

En las muestras positivas para la presencia de Hp se detectó el gen *cag A* mediante la amplificación de un fragmento de 400 pb del gen, utilizando los cebadores descritos en la [tabla 2](#), sintetizados por la GIBCO.⁷ Las reacciones se realizaron en un termociclador *minicycler research*. El programa tuvo las características siguientes: 94 °C x 1 min, 63 °C x 30 s, 72 °C x 1 min, 94 °C x 1 min, 62 °C x 30 s, 72 °C x 1 min, 94 °C x 1 min, 61 °C x 30 s, 72 °C x 1 min, 94 °C x 1 min, 60 °C x 30 s, 72 °C x 1 min, 30 ciclos de: 94 °C x 1 min, 59 °C x 1 min y 72 °C x 1 min.

Ambos métodos detectan al menos 100 ufc por muestra de biopsia y no presentan reacción cruzada con genoma humano, *Providencia rettgeri*, *Morganella morganii*, *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoneae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter cinaedi* y *Escherichia coli*.

Los productos se visualizaron mediante una electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio. El tamaño del amplicón se verifica mediante comigración con el marcador de peso molecular 100 pb Ladder (Promega).

Los resultados se vertieron en una matriz de cálculo del sistema EXCEL y se realizaron cálculos de porcentajes y prueba de validación estadística chi-cuadrado.

RESULTADOS

En la muestra predominó el sexo masculino (59,6 %) con una media de 53,3 años.

En general, la prevalencia de la infección por Hp fue del 95,9 %. La UD ocupó el primer lugar con 98,2 %. Le continuó la UG con una prevalencia del 95,8 %, la GC con 93,6 % y por último, tenemos el CG con 95 % ([tabla 3](#)).

La prevalencia total de Hp *cag A+* en las enfermedades estudiadas es del 70,7 %. La UD ocupó el primer lugar con 80 %. Le continuó la GC con 72,7 %, la UG con 69,6 % y por último, tenemos el CG con 42,1 % ([tabla 4](#)).

Al compararse entre ellas las prevalencias de cepas *cag A+* en UG, UD y GC no se obtienen diferencias significativas, pero las 3 son significativamente superiores a la que se presenta en el cáncer gástrico ($p = 0,19$).

DISCUSIÓN

La prevalencia de la infección por Hp es muy alta en todas las enfermedades. Resultados similares a los nuestros fueron reportados en diferentes países integrantes del Grupo 2. En Turquía se ha reportado una prevalencia de Hp de 97,2 %; en África, de 90 %, y en la India, *Asís* obtuvo de 80 a 90 %.⁸⁻¹⁰

Valores similares a los alcanzados por nosotros se reportan en la mayoría de las series que estudian la presencia de Hp en UD por PCR, ejemplo de ellos son los

trabajos publicados por *Zhou* en China con tasas de 100 % y en Italia, el estudio de *Franco*, con 85 %.^{11,12}

En cuanto a la UG, un estudio similar en Checoslovaquia exhibe cifras de 80 % y en China se reportan valores cercanos al 100 %, al igual que en la UD.^{11,13}

En el caso de la GC, China muestra valores de infección similares a los nuestros con 94,1 %; mientras que en Sri Lanka se reportan valores más bajos (70 %), al igual que en Checoslovaquia, con cifra de 63 %.^{11,13,14}

En el CG, obtuvimos una prevalencia bastante alta. Un estudio publicado en Suiza, por *Enroth* evidenció una prevalencia de 79 %; en Rumania, *Viorel* registra una tasa de 78,4 % y en una región de alta incidencia de adenocarcinoma gástrico en China se registra 100 %, al igual que en la úlcera gastroduodenal.^{11,15,16}

La prevalencia total de Hp cag A+ encontrada en nuestro estudio muestra un valor inferior al 88,5 % reportado en otro estudio de la población cubana, pero superior al 60 % obtenido por *Valmaseda* y otros.¹⁷ Estas diferencias pudieran deberse al empleo de métodos de genotipaje de diferente sensibilidad. Muchos estudios indican la variación de la prevalencia del genotipo Hp cag A+ en diferentes regiones del mundo; nuestros resultados son similares a los encontrados en varios países de América del Sur, Central y los menos desarrollados de Europa y del Medio Oriente. Como ejemplos señalamos las prevalencias del 79,8 % reportada en Brasil, de 61,7 % en Turquía y del 68 % en Checoslovaquia.^{8,14,18}

En cuanto a las úlceras gastroduodenales, la prevalencia de estas cepas que encontramos fue similar a la de 84,2 % reportada por *Valmaseda* en su estudio compilativo mundial.¹⁷ En América del Sur, específicamente en Brasil, se han reportado asociaciones que oscilan entre 81 y 90 %.¹⁸ Cifras más elevadas se reportan en China con 100 %.¹²

En el caso de la GC se evidenció una asociación un poco mayor que el 65,4 % reportado por *Valmaceda*,¹⁷ el 60 % encontrado en Brasil y el 63 % en Checoslovaquia, pero muy inferior a los valores alrededor del 94 % reportados en áreas de alta prevalencia de Hp.^{11,14,18}

En la bibliografía revisada encontramos muchos trabajos en relación con el genotipo cag A y el CG, que presentaban una gama de resultados y variantes diferentes; por ejemplo un estudio realizado en 2 regiones de España reportó 86,5 %; *Enroth*, en Suiza, 79 % y las tasa más altas registradas en China y Asia en general, cercanas al 100 %.^{11,15,19} En nuestro estudio no encontramos valores tan altos, pero no se puede descartar que estén sesgados por el pequeño número de cepas detectadas y genotipadas (solo 19) en estos pacientes.

Estas estadísticas son muy cuestionadas, ya que en algunas regiones con elevada prevalencia de cepas de Hp cag A+, no se ha reportado gran incidencia de lesiones. Hay estudios contradictorios en cuanto al papel carcinógeno de Hp y a la baja incidencia del CG, esto se explica por la variabilidad de las cepas en diferentes regiones, así como por las características propias del hospedero y el tiempo de exposición de la mucosa gástrica a la bacteria.⁹

Se concluye que la infección por Hp presenta alta prevalencia en la muestra poblacional estudiada (95,9 %). El 70,7 % de las cepas detectadas son cag A+, lo que indica una alta prevalencia de dichas cepas en nuestra población. Se encontró una importante asociación entre las cepas de Hp cag A+ y las enfermedades estudiadas, con valores particulares superiores al 90 % en todos los casos.

Encontramos una relación de asociación del gen *cag A+* en cepas de Hp en la UG, UD y la GC, superior y con una diferencia estadística significativa al CG.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gisbert JP, Boixeda D, Martín de Argila C, García Plaza A. Helicobacter pylori y úlcera duodenal: ¿Relación causal o mera asociación? Rev Clín Española. 1997;197:693-9.
2. Martín de Argila C, Boixeda de Miguel D, Gisbert JP. Epidemiología de la infección por Helicobacter pylori ¿Dónde está el límite? Barcelona-Philadelphia: Prous Science; 1996. p. 75-91.
3. Figura N, Valassina M. Helicobacter pylori. Determinants of Pathogenicity. J Chemother. 1999;11(6):591-600.
4. Cin CW, Chang YS, Lai PY, Chang KS. Prevalence and heterogeneity of Helicobacter pylori in gastric biopsies of patients with gastroduodenal diseases. Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien J Hsueh Tsa Chih. 1997;30(2):61-71.
5. Roosendaal R, Kuipers EJ, AJC van den Brule. Importance of the fiberoptic endoscope cleaning procedure for detection of Helicobacter pylori in gastric biopsy specimens by PCR. J Clin Microbiol. 1994;32:1123-6.
6. Kawamata O, Yoshida H, Hirota K. Nested-Polymerase Chain Reaction for the detection of Helicobacter pylori infection with novel primers designed by sequence analysis of Urease A gene in clinically isolated bacterial strains. Bioch Biophys Res Comm. 1996;219(1):266.
7. Lage AP, Godfroid E. Diagnosis of Helicobacter pylori Infection by PCR: Comparison with other Invasive Techniques and Detection of Cag A Gene in Gastric Biopsy Specimens. J Clin Microbiol. 1995;33:2752-6.
8. Serin E, Yilmaz V, Kuncelile, Ozar B, Guyumardule Y. Serun positive Cag A ice patients with non-ulcer dyspepsia and peptic ulcer disease from two centers in different regions of Turkey. World J Gastroenterol. 2003;9(4):833-5.
9. Bravo LE, Van Doorn LT, Realpe JL, Correa P. Virulence-associated genotypes of Helicobacter pylori: do they explain the African enigma? Am J Gastroenterol. 2002;97(11):2839-42.
10. Asish K. Distinctiveness of genotypes Helicobacter pylori in Calcutta, India. J Bacteriol. 2000;182(11):3219-27.
11. Zhou J, Zhang J, Xu UC, He L. Cag A genotypes and variant in Chinese Helicobacter Pylori strains and relationship to gastroduodenal diseases. J Med Microbiol. 2004;53(3):231-5.
12. Busolo F, Bertollo G, Bordignon G, Madia D, Camposampiero D. Detection and characterization of Helicobacter pylori from patients with gastroduodenal diseases. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998;31:531-6.

13. Fernando N, Holton J, Vaira D, De Silva M, Fernando D. Prevalence of *Helicobacter pylori* in Sri Lanka as determined by PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (7):2675-6.
14. Potuznikova B, Soucek A, Souckova A. Detection of Cag A protein in strain of *Helicobacter pylori* isolated from patients with gastritis and gastric ulcer diseases. *Epidemiol Microbiol Inmunol.* 2003; 52(4):136-41.
15. Enroth H, Kraaz W, Engstraud L, Nyren O, Rohaut. *Helicobacter pylori* strain types and risk of gastric cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev.* 2000;9(9):981-5.
16. Porumb Viorel. *Helicobacter pylori*, Risk Factor for Gastric Cancer. *GUT* 2000; 47(3): 110.
17. Valmaseda T, Gisbert JP, Paniagua M, Pajares JM. *Helicobacter pylori* cag A antibodies in various gastroduodenal diseases from two different populations. *Med Clin.* 2002; 118(3):90-3.
18. Brito CA, Silva LM, Juca N, Leal NC, de Souza W, Queiroz D, et. al. Prevalence of cag A and vac A genes in isolates from patients with *Helicobacter pylori* associated gastroduodenal diseases in Recife, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(6):817-21.
19. Valmaseda Pérez T, Gisbert JP, Pajares García JM. Cag A gene in gastroduodenal diseases associated with *Helicobacter pylori* infection. *Rev Enferm Dig.* 2001;93(7):471-80.

Recibido: 12 de febrero de 2008.

Aprobado: 17 de abril de 2008.

Lic. *María Teresa Martínez Echavarría*. Estrada Palma No. 673 (3) esq. Goss, Santos Suárez, 10 de Octubre, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 10 500. Correo electrónico: mtemtnez@infomed.sld.cu

Tabla 1. Descripción de los cebadores del sistema ure A

Cebador	Secuencia (5' 3')	Descripción
HPA 1	ATA TTA TGG AAG AAG CGA GAG	Senso, primer proceso
HPA 2	CAT GAA GTG GGT ATT GAA G	Senso, segundo proceso
HPA 3	ATG GAA GTG TGA GCC GAT TT	Reverso, común en ambos procesos

Tabla 1. Descripción de los cebadores del sistema ure A

Cebador	Secuencia (5' 3')	Descripción
HPA 1	ATA TTA TGG AAG AAG CGA GAG	Senso, primer proceso
HPA 2	CAT GAA GTG GGT ATT GAA G	Senso, segundo proceso
HPA 3	ATG GAA GTG TGA GCC GAT TT	Reverso, común en ambos procesos

Tabla 3. Prevalencia de la infección por Hp en las enfermedades estudiadas

Enfermedades	Total de casos	Positividad a Hp	
		N	(%)
Cáncer gástrico	29	19	(95,0)
Gastritis crónica	47	44	(93,6)
Úlcera gástrica	48	46	(95,8)
Úlcera duodenal	56	55	(98,2)
Total	171	164	(95,9)

Tabla 4. Prevalencia de cepas de *Helicobacter pylori* cagA+ en las enfermedades gastroduodenales estudiadas

Enfermedades	Total de cepas de Hp	Positividad a cag A	
		N	(%)
Cáncer gástrico	19	8	(42,1)
Gastritis crónica	44	32	(72,7)
Úlcera gástrica	46	32	(69,6)