



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS



“Diversidad de la región variable 3’ del oncogén *cagA* de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A:

Q.B.P. Fredy Omar Beltrán Anaya

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Gloria Fernández Tilapa

Chilpancingo, Guerrero, Septiembre del 2013.





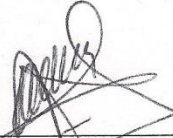
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

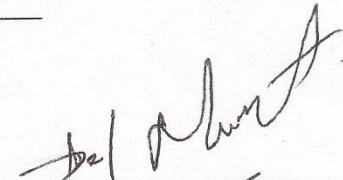
APROBACIÓN DE TESIS

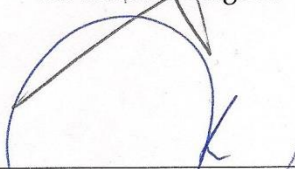
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 14 días del mes de junio de dos mil trece, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Diversidad de la región variable 3' del oncogén *cagA* de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico", presentada por el alumno Fredy Omar Beltrán Anaya, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dra. Gloria Fernández Tilapa
Dirección de tesis



Dr. Lorenzo Salgado Goytia


Dr. Oscar del Moral Hernández



Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez


Dr. Oscar Peralta Zaragoza


Vo. Bo


Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS


Vo. Bo


Dra. Eugenia Flores Alfaro
Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Chilpancingo, Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Gloria Fernández Tilapa

La asesoría de:

Dr. Oscar Peralta Zaragoza

Dr. Lorenzo Salgado Goytia

Dr. Oscar del Moral Hernández

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

La investigación se realizó con financiamiento de Universidad Autónoma de Guerrero, convocatoria 2012; por la SEP a través del PIFI-2011 y del FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT, CONVOCATORIA 2012 Clave SALUD-2012-01-182778

Durante el periodo en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el QBP. Fredy Omar Beltrán Anaya recibió beca por parte del CONACYT.

Folio: 416163

Este trabajo se realizó en colaboración con la Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopia de Chilpancingo, Gro, con el Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” de Acapulco Gro., y el Hospital General “Dr. Raymundo Abarca Alarcón” de Chilpancingo, Guerrero.

Agradecemos a los médicos endoscopistas; Reyes Betancurt Linares, Salomón Reyes Navarrete, Ivan Cruz del Carmen, José de Sampedro Reyes, Guillermo Morales Hernández, Irineo Reyna Adame. Al personal directivo de cada institución y al personal de enfermería por su apoyo en la toma de muestra.



AGRADECIMIENTOS

A **mi familia**, por su inmenso apoyo, cariño y paciencia que me han brindado para lograr llegar a esta etapa de mi vida y carrera profesional.

A mi directora de tesis, **Dra. Gloria Fernández Tilapa**, por su apoyo, paciencia y su tiempo durante el desarrollo y conclusión de este trabajo.

A mi **comité tutor académico**, por sus críticas, comentarios y sugerencias realizadas en la presente investigación.

A mis **profesores de seminario**, por guiarme desde un inicio en el desarrollo de este trabajo.

A la **Dra. Mónica Espinosa Rojo**, por sus palabras de aliento desde un inicio de este gran logro.

A mi tía **María Reyna Anaya y familia** por su gran e inmenso apoyo durante todo el tiempo que llevó a la culminación de esta etapa de mi vida. Gracias!

A mis **amigos**, por todo este tiempo compartido entre aulas y laboratorios.

Y a todas las personas que se involucraron durante el desarrollo de este trabajo, por sus críticas, comentarios, sugerencias.

DEDICATORIAS

A mi familia, a mi mamá, hermano, abuelos y tíos. Por su paciencia, cariño y comprensión. A mi papá[†].

A mi abuelo[†], por su cariño y bendiciones día a día.

A mi abuelita, por su cariño, buenos deseos y bendiciones.

A mi tía María Reyna Anaya, por su inmensa ayuda desde antes de iniciar esta etapa de mi vida profesional.

A mí, por mi perseverancia, coraje, entusiasmo y destreza, por salir adelante y concluir uno de tantos objetivos de mi vida.

**Diversidad de la región variable 3´ del oncogén *cagA*
de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica y
cáncer gástrico.**

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
MATERIAL Y MÉTODOS	12
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	24
REFERENCIAS	28

RESUMEN

Antecedentes: La infección crónica por *Helicobacter pylori* se asocia con gastritis crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico. Las cepas de *H. pylori* *cagA*-positivas incrementan el riesgo de patología gástrica. El potencial carcinogénico de CagA se relaciona con sus variantes polimórficas en sus motivos EPIYA. El propósito de este trabajo fue analizar la variabilidad de la región 3' de *cagA* de *H. pylori* e investigar si las isoformas se asocian con cáncer gástrico. **Métodos:** Se estudiaron 108 pacientes; 98 de gastritis crónica y 10 de cáncer gástrico. Los motivos EPIYA y CRPIA se detectaron en ADN total obtenido de biopsias gástricas. El tipo y número de segmentos EPIYA así como el número de secuencias CRPIA se examinaron por reacción en cadena de la polimerasa y se determinaron con base en los patrones electroforéticos. Dieciocho amplicones de la región variable 3' de *cagA* fueron purificados, secuenciados y analizados bioinformáticamente. El análisis de asociación entre el tipo de motivos EPIYA y el número de CRPIAs con cáncer gástrico se hizo mediante el cálculo del *odds ratio* (OR) a través de regresión logística con IC 95%. **Resultados:** El patrón EPIYA-ABC fue más frecuente en pacientes con gastritis crónica, 76.5% (75/98). Mientras que el patrón EPIYA-ABCC fue más frecuentemente detectado en cáncer gástrico 50% (5/10). En el 76.5% (75/98) de casos de gastritis crónica se identificó la presencia de 2 motivos CRPIA mientras que en cáncer gástrico (60%) se detectó 3 CRPIAs (6/10). Se encontró un mayor riesgo de cáncer gástrico con un OR = 4.8, IC 95% = 1.2-18.8, $p=0.021$, para los individuos infectados con *H. pylori* que posee ≥ 3 CRPIAs y un OR = 4.2, IC 95% = 1.0-17.2, $p = 0.042$ cuando *H. pylori* presentaba el patrón EPIYA-ABCC. **Conclusiones:** Las cepas *H. pylori* CagA+ que infectan pacientes del estado de Guerrero son de tipo occidental con predominio de motivos EPIYA ABC, ABCC y la presencia de 2 y 3 motivos CRPIA en CagA. Las cepas con patrones EPIYA-ABCC y con ≥ 3 CRPIAs en *cagA* se asoció con cáncer gástrico.

Palabras clave: EPIYA, CRPIA, *H. pylori*, gastritis crónica, cáncer gástrico.

ABSTRACT

Background: Chronic infection with *Helicobacter pylori* is associated with chronic gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. Strains of *H. pylori* *cagA*-positive increases the risk of gastric pathology. The carcinogenic potential of CagA is associated with polymorphic variants in their EPIYA motifs. The purpose of this study was to analyze the variability of the 3' region of *cagA* of *H. pylori* and to investigate whether the isoforms are associated with gastric cancer. **Methods:** We studied 108 patients, 98 of chronic gastritis and 10 of gastric cancer. The EPIYA and CRPIA motifs were detected in total DNA obtained from gastric biopsies. The type and number of segments EPIYA, and number CRPIA sequences were examined by chain reaction of the polymerase, and were determined based on the electrophoretic patterns. Eighteen amplicons were purified, sequenced and analyzed by bioinformatics software. The analysis of association between the type of EPIYA motifs, and the number of CRPIAs with gastric cancer, was made by calculating the odds ratio (OR) using logistic regression with 95% CI. **Results:** The EPIYA-ABC pattern was more frequent in patients with chronic gastritis, 76.5% (75/98). While EPIYA-ABCC pattern was most frequently detected in gastric cancer 50% (5/10). In 76.5% (75/98) of cases of chronic gastritis identified the presence of two CRPIA motifs whereas in gastric cancer (60%) was detected three CRPIAs (6/10). We found an increased risk of gastric cancer with an OR = 4.8, 95% CI = 1.2-18.8, $p = 0.021$, for individuals infected with *H. pylori* has ≥ 3 CRPIAs and OR = 4.2, 95% CI = 1.0-17.2, $p = 0.042$ when *H. pylori* had the EPIYA-ABCC pattern. **Conclusions:** Strains *H. pylori* CagA + patients infecting Guerrero state are Western style, with a predominance of EPIYA-ABC, ABCC and the presence of 2 and 3 CRPIA motifs in CagA. The strains with EPIYA-ABCC patterns and ≥ 3 CRPIAs in *cagA* are associated with gastric cancer.

Keywords: EPIYA, CRPIA, *H. pylori*, chronic gastritis, gastric cancer.

INTRODUCCIÓN

La infección crónica por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) está etiológicamente relacionada con gastritis crónica, úlcera gástrica y cáncer gástrico (de Martel *et al.*, 2013; Kuipers *et al.*, 1995). *H. pylori* tiene una variedad de factores de virulencia (Wroblewski *et al.*, 2010), entre ellos la citotoxina asociada al gen A (CagA) (Covacci *et al.*, 1993). El gen *cagA* codifica para la oncoproteína CagA de 120–145 kDa (Covacci *et al.*, 1993), la proteína CagA de *H. pylori* es un factor de virulencia que se asocia con la severidad de la enfermedad del sistema digestivo (Sicinschi *et al.*, 2010). Al ser inyectada al interior de la célula del epitelio gástrico por un sistema de secreción tipo IV (Rohde *et al.*, 2003), CagA sufre fosforilaciones por cinasas del hospedador, como las Src y Abl (Mueller *et al.*, 2012; Tegtmeyer and Backert, 2011). Estas fosforilaciones se dan en el aminoácido tirosina de los motivos EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) codificados en la región C-terminal de CagA (Hayashi *et al.*, 2012; Selbach *et al.*, 2002; Tammer *et al.*, 2007). El efecto de estas fosforilaciones e interacciones promiscuas le dan una acción oncogénica a CagA (Hatakeyama, 2009; Selbach *et al.*, 2002).

En base a las secuencias de aminoácidos EPIYA se distinguen cuatro tipos de motivos, EPIYA-A (KVNKKKTGQ), EPIYA-B (QVAKKVNAKI), EPIYA-C (TIDDLGGP) (Azuma *et al.*, 2004b; Salih *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2009; Truong *et al.*, 2009), y EPIYA-D (TIDFDEAN) (Azuma *et al.*, 2004b; Furuta *et al.*, 2011; Truong *et al.*, 2009). La duplicación de motivos EPIYA en la proteína CagA es frecuente en los tipos EPIYA-A, EPIYA-B y más en EPIYA-C, mientras que EPIYA-D es muy raro encontrarlo en más de un repetido (Argent *et al.*, 2008). Por otra parte, cepas de *H. pylori* aisladas en Perú, presentan alteraciones o degeneraciones en los motivos EPIYA-B, por lo cual las CagA obtenidas de estas cepas son conocidas como Amerindias, presentándose dos tipos, AM-I (ESIYT) y AM-II (GSIYT) (Suzuki *et al.*, 2011). El aumento del repetido EPIYA-C se relaciona con la severidad de las patologías gástricas tanto en países occidentales como asiáticos (Quiroga *et al.*, 2010; Salih *et al.*, 2010; Sicinschi *et al.*, 2010), mientras que los motivos EPIYA-D se

han detectado en casi el 100% de los casos de cáncer gástrico en países Asiáticos (Batista *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2009).

La proteína CagA interactúa con proteínas celulares a través de diferentes motivos EPIYA, EPIYA-C y D se unen con SHP-2 lo que lleva a la disminución de la fosforilación de FAK (cinasa de adhesión focal), una tirosina cinasa que regula los puntos de adhesión focal. Por otra parte, los motivos EPIYA-A y EPIYA-B se unen a Csk de manera dependiente de fosforilación al igual que lo hace EPIYA-C con SHP-2, estas interacciones repercuten en la desregulación celular ocasionando la inducción del fenotipo colibrí y una elevada motilidad de las células del epitelio gástrico (Tsutsumi *et al.*, 2006). Por lo tanto, para la inducción del fenotipo colibrí, la fosforilación de los motivos EPIYA es un prerrequisito que resulta en la formación de complejos CagA-SHP-2 que dan origen a la desregulación celular.

Otros motivos que han sido estudiados y observado su efecto en la desregulación celular son los motivos de repetición conservada responsables de la actividad independiente de fosforilación (CRPIA) o conocidos como secuencias de multimerización de CagA (CM). Los motivos CRPIA se caracterizan por la secuencia de 16 aminoácidos que flanquean al motivo EPIYA-C (Ren *et al.*, 2006) y en la región C-terminal de la secuencia de aminoácidos de EPIYA-D (Furuta *et al.*, 2011; Salih *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2009). De acuerdo a las secuencias de aminoácidos, cambios sutiles de los mismos y de la región geográfica donde son localizados los motivos CRPIA, se pueden clasificar en CRPIA tipo asiático (FPLKxHxKVxDLSKVG), CRPIA tipo occidental (FPLRxSAKVxDLKVG) o de tipo Amerindio-I (xxLKRxAKVDDLxKxG) y Amerindio-II (YTLKMHAGDDNLRKVG) (Ogorodnik and Raffaniello, 2013; Sicinschi *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2011).

Diversos estudios demuestran que los motivos CRPIA son indispensables para la actividad o efecto de CagA (Ren *et al.*, 2006) incluso si presentan alteraciones en su secuencia de aminoácidos, el efecto de CagA se ve disminuido en comparación de los CRPIA silvestres (Suzuki *et al.*, 2011). Los motivos CRPIA median la activación de la vía PI3K/Akt llevando a la liberación de β -catenina, la cual se transloca al

núcleo para activar la vía de señalización de NF- κ B (factor nuclear κ B), modulando así la producción de la citocina proinflamatoria IL-8. Otros factores de transcripción activados por CRPIA, a través de la activación de Met, son el factor de células T (Tcf), elemento de respuesta a suero (SER), factor nuclear activado de células T (NFAT) y, la proteína de activación 1 (AP-1). Al mediar la señalización de ERK/SRF (cinasa de regulación de señal extracelular/ factor de respuesta a suero), CRPIA potencia la producción de MCL 1 (proteína antiapoptótica de la familia Bcl2), promoviendo la colonización por *H. pylori* en modelos animales, debido a que suprime la apoptosis y regula el rápido cambio en las fosas del epitelio gástrico (Suzuki *et al.*, 2009). Los motivos CRPIA son importantes en la patogénesis inducida por CagA, sin embargo faltan estudios para demostrar la relación entre estas secuencias y la patología gástrica.

Alrededor del mundo se han identificado diversas CagA quiméricas, el proceso de transferencia horizontal de genes pudiera explicar la presencia de estas CagA atípicas, sin embargo Furuta *et al.*, (2011) proponen tres posibles eventos de recombinación que pudieron llevar a la evolución del oncogén *cagA*; recombinación homóloga entre secuencias de ADN por motivos CRPIA, recombinación entre secuencias de ADN por motivos EPIYA y recombinación entre secuencias cortas similares de ADN.

La asociación entre el genotipo y la variante de CagA en las patologías gástricas es controversial, por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar la variabilidad de la región 3' de *cagA* de *Helicobacter pylori* e investigar qué isoformas se asocian con cáncer gástrico en comparación con gastritis crónica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes: Se estudiaron 108 pacientes que fueron seleccionados de una población que padecía síntomas de dispepsia y fueron sometidos a endoscopia digestiva alta en el Hospital General Dr. Raymundo Abarca Alarcón, en la Unidad Especializada de Gastroenterología Endoscopia y en el Instituto Estatal de Cancerología de Acapulco, Guerrero. Los pacientes estudiados no habían recibido tratamiento con antimicrobianos, con inhibidores de la bomba de protones o con neutralizadores de pH gástrico durante el mes previo al procedimiento endoscópico. Los pacientes con tratamiento inmunosupresor o anti-inflamatorio no esteroideo fueron excluidos del estudio. Los participantes o sus padres firmaron una carta de consentimiento informado de acuerdo a la declaración de *Helsinki*. Se mantuvo la confidencialidad de los resultados y la información de los pacientes.

Toma de muestra y extracción de ADN: Se tomó una biopsia de antro y se colocó en un medio de preservación (*Allprotect Tissue Reagent, Qiagen*), posteriormente se realizó la extracción de ADN mediante el método comercial *AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit* de *Qiagen* de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Diagnóstico histopatológico: A cada paciente se le tomó una biopsia para ser fijada en formalina, posteriormente fueron embebidas en parafina y secciones de 4 µm se tiñeron con hematoxilina-eosina para el estudio histológico. Los hallazgos histopatológicos se usaron para establecer el diagnóstico de los pacientes. La gastritis se clasificó de acuerdo al sistema Sydney actualizado (Dixon *et al.*, 1997).

Detección de *H. pylori*: El ADN total de biopsias gástricas fue sometida a PCR para detectar la presencia específica del gen 16S rRNA de *H. pylori* usando los oligonucleótidos específicos; sentido HP16SR 5'-GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC-3' y antisentido HPGR16SR 5'-CAATCAGCGTCAGTAATGTTC-3' (Chang *et al.*, 2006). La mezcla de reacción se preparó con 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), 10 pmol de cada oligonucleótido y 1 U de Taq de DNA polimerasa Platinum (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) y 150 ng de ADN total en

un volumen de 15 µl. El programa de amplificación incluyó un ciclo a 94°C por 5 min, 40 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 1 min y un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y fueron observados con luz ultravioleta (UV). Las muestras fueron consideradas *H. pylori* positivo cuando se detectó una banda de 522 pb en el gel de agarosa. En todas las reacciones se utilizó como control positivo el ADN de la cepa J99 de *H. pylori* *cagA*-positivas y como control negativo se sustituyó el ADN por agua desionizada estéril. Todas las PCRs se hicieron en un termociclador de gradientes (*Mastercycler Ep gradient Eppendorf, Alemania*).

Genotipificación de *cagA*: Las muestras positivas al gen rRNA 16S de *H. pylori* se sometieron a PCR para detección de *cagA* por medio de los oligonucleótidos *cagAF* 5'-ACAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3' y *cagAR* 5'-TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT-3' que amplifican un amplicón de 297 pb de la región constante; los oligonucleótidos *cag28F* 5'-TTCTCAAAGGAGCAATTGGC-3' (Argent *et al.*, 2005) y *cag4R* 5'-ATCTTTGAGCTTGTCTATCG-3' (Rudi *et al.*, 1998) se usó para amplificar 500 a 850 pb de la región variable 3' de *cagA*. La mezcla de reacción se preparó con 1.7 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), 5 pmol de cada oligonucleótido, 1 U de Taq de DNA polimerasa *Platinum* (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) y 300 ng de ADN total en un volumen de 25 µl. El programa de amplificación incluyó un ciclo a 94°C por 5 min, 30 ciclos a 94°C por 40 s, 55.5°C por 30 s y 72°C por 50 s y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y fueron observados con luz ultravioleta (UV). Las muestras se consideraron *cagA*-positivas cuando al menos una de las dos bandas fue observada. En todas las reacciones se utilizó como control positivo el ADN de la cepa ATCC43504 y J99 de *H. pylori* *cagA*-positivas y como control negativo se sustituyó el ADN por agua desionizada estéril. Todas las PCRs se hicieron en un termociclador de gradientes (*Mastercycler Ep gradient Eppendorf, Alemania*).

Tipificación de motivos EPIYA: El oligonucleótido sentido cag28F se usó en las cuatro reacciones de PCR y los antisentido; cagA-P1C(5'-GTCCTGCTTTCTTTTTATTAAGTTCAGC-3'), cagAP2TA (5'-TTTAGCAACTTGAGCGTAAATGGG-3') (Argent *et al.*, 2005), CagAWest (5'-TTTCAAAGGGAAAGGTCCGCC-3'), CagAEast (5'-AGAGGGAAGCCTGCTTGATT-3') (Schmidt *et al.*, 2009) se usaron en reacciones separadas para la amplificación de los motivos EPIYA-A (~264 pb), -B (~306 pb), -C (~501 pb) y D (495 pb) respetivamente. Todas las mezclas de PCR contenían de 0.2 mM de dNTPs (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol de cada oligonucleótido, 1 U Platinun® Taq DNA Polymerase (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) y 300 ng de ADN total de biopsias gástricas, en un volumen final de 25 µl. El programa de amplificación incluyó un ciclo a 94°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 1 min, 57.9°C por 30 s y 72°C por 1 min y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se tiñeron con bromuro de etidio y se analizaron bajo luz UV. En todas las reacciones se utilizó como control positivo el ADN de la cepa ATCC43504 y J99 de *H. pylori* cagA-positivas y como control negativo se sustituyó el ADN por agua desionizada estéril. Todas las PCRs se hicieron en un termociclador de gradientes (*Mastercycler Ep gradient (Eppendorf, Alemania)*).

Tipificación de motivos CRPIA: Se diseñó un par de oligonucleótidos para amplificar los motivos CRPIA; sentido CRPIAF 5'-AACAGGACAAGTAGCTAGC -3', y antisentido CRPIAR 5'-GATTCCTTGAAAGCCCTAC-3'. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µL que contuvo 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 10 pmol de cada oligonucleótido, 1 U de Taq DNA polimerasa Platinum (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) y 200 ng de ADN total de cada muestra. Las condiciones para PCR fueron un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 7 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 40 s, 64°C por 30 s y 72°C por 28 s, con un paso de extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de PCR generados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, un amplificado de ~295 pb identifica un motivo CRPIA asiático (confirmado por la presencia de EPIYA-D); los productos de ~284 pb, ~386 pb y ~488 pb identifican a 2, 3 y 4 motivos CRPIA

occidentales respectivamente. En todas las reacciones se utilizó como control positivo el ADN de la cepa ATCC43504 y J99 de *H. pylori* *cagA*-positivas y como control negativo se sustituyó el ADN por agua desionizada estéril. Todas las PCRs se hicieron en un termociclador de gradientes (*Mastercycler Ep gradient Eppendorf, Alemania*).

Secuenciación y análisis bioinformático de la región variable 3' de *cagA*: Un subconjunto de 18 muestras fueron seleccionadas aleatoriamente para secuenciación a fin de confirmar los resultados de PCR. Para la amplificación de la región variable se usaron los oligonucleótidos *cag28F* y *cag4* que generan amplicones de ~650 a ~850 pb. La reacción de PCR se hizo en un volumen de 50 µl que contenían 15 pmol de cada oligonucleótido, 0.3 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂ y 1 U *Platinun® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)*. Las condiciones de reacción fueron: un ciclo inicial a 94°C por 5 min seguido por 30 ciclos de 94°C por 40s, 55.5°C por 30s, 72°C por 50s y una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de PCR fueron purificados a través del *PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)*, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los productos purificados fueron secuenciados empleando el Kit de secuenciación *BigDey terminator v.1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)* en un analizador genético *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City California, USA)*. La secuencia de nucleótidos fue transformada en secuencia de aminoácidos usando el programa MEGA versión 5 (Tamura *et al.*, 2011). La extensión Clustal W del programa MEGA fue usada para generar un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos. La secuencia parcial de *CagA* de la cepa *H. pylori* 43526 (*GenBank: AF001357.1*) fue usada como referencia.

Análisis estadístico: Se utilizó la prueba de *Kruskal-Wallis*, X^2 y exacta de Fisher para la búsqueda de diferencias estadísticas. La asociación entre la presencia del motivos EPIYA-ABCC y CRPIA se determinó por el cálculo del OR con intervalo de confianza al 95%, mediante modelos de regresión logística. El valor de $p < 0.05$

indicó significancia estadística. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Stata versión 11.1 (*College Station, Texas, USA*).

RESULTADOS

Características de la población

De los 108 participantes, 98 (90.7%) fueron diagnosticados histopatológicamente como gastritis crónica y 10 (9.3%) como cáncer gástrico. Del total, 64 participantes fueron mujeres y 44 hombres. La media general de edad fue de 45.5 años, en varones fue de 39.5 y en mujeres fue 51.5 años. En gastritis crónica la media de edad fue de 44.5 (35-61 años) y en cáncer gástrico fue de 54.5 (44-73 años). Más del 50% de los pacientes consumen o consumían alcohol y/o café en ambos grupos. Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p=0.003$) entre la escolaridad y los grupos de estudio (cuadro 1).

Cuadro 1. Características sociodemográficas de la población.

Características	Gastritis crónica (n=98)	Cáncer gástrico (n=10)	p
Edad (mediana)	44.5 (35-61)	54.5 (44-73)	0.146 [♦]
Género n (%)			
Femenino	57 (58.1)	7 (70)	0.469 [■]
Masculino	41 (41.8)	3 (30)	
Escolaridad n (%)			
Licenciatura y más	40 (40.8)	0	0.003 [■]
Bachillerato	13 (13.2)	0	
Secundaria	16 (16.3)	2 (20)	
Primaria	22 (22.4)	5 (50)	
Sin estudio	7 (7.1)	3 (30)	
Consumo de café n (%)			
Si o tomaba	59 (60.2)	5 (50)	0.532 [†]
No	39 (39.8)	5 (50)	
Consumo de alcohol n (%)			
Si o tomaba	76 (77.7)	7 (70)	0.694 [■]
No	22 (22.3)	3(30)	

♦: Mann-Whitney; ■ : Exacta de Fisher; †: χ^2

Segmentos EPIYA

El motivo EPIYA-ABC se encontró en el 73.2%(79/108) de los pacientes en general, mientras que el motivo ABCC representó el 25% (27/108). El patrón EPIYA-ABC fue más frecuente en pacientes con gastritis crónica (76.5%). La colonización con cepas de *H. pylori cagA*-positivas con dos motivos EPIYA-C fue más frecuente en cáncer gástrico (50%), observándose diferencias significativas entre los grupos y los diferentes tipos de motivos EPIYA (cuadro 2). Los motivos EPIYA menos frecuentes fueron el ABBCCC y ABBC en gastritis crónica y cáncer gástrico, respectivamente (figura 1 y cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencia del número y tipo de motivos EPIYA de *H. pylori cagA*+ en pacientes con gastritis crónica o cáncer gástrico.

Motivos EPIYA	Gastritis crónica	Cáncer gástrico	<i>p</i>
ABC	75 (76.5%)	4 (40%)	
ABCC	22 (22.5%)	5 (50%)	0.017*
ABBC	0	1 (10%)	
ABBCCC	1 (1%)	0	
Total	98	10	

* *Exacta de Fisher*

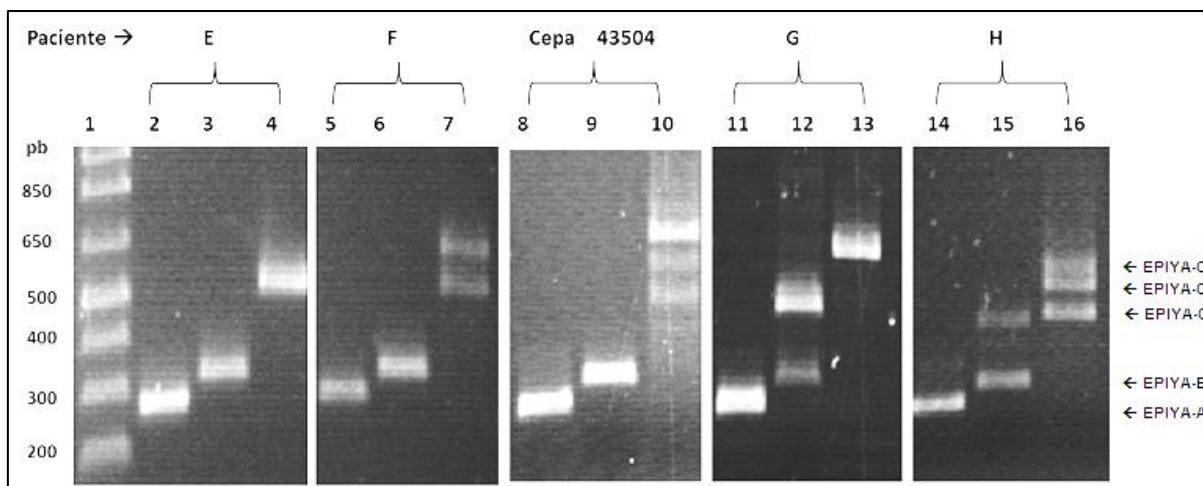


Figura 1. Amplificones de los motivos EPIYA del oncogen *cagA* de *H. pylori* a partir de ADN total obtenido de biopsia gástrica. Carril 1, MPM 100pb; carril 2,5,8,11 y 14, amplificación del motivos A; carril 3,6,9,12 y 15, amplificación del motivo B; carril 4,13,7,10 y 16, amplificación de varios motivos EPIYA-C.

Segmentos CRPIA

La presencia de dos motivos CRPIA se observó en el 73.2% de la población total estudiada, mientras que el 26.8% presentaron ≥ 3 motivos CRPIA. En pacientes con gastritis crónica con mayor frecuencia se detectaron 2 motivos CRPIA (76.5%) mientras que en cáncer gástrico se identificaron tres o más repetidos CRPIA (60%) presentándose diferencias significativas (cuadro 3).

Cuadro 3. Frecuencia del número de motivos CRPIA de *H. pylori cagA+* a partir de ADN de biopsias gástricas.

Número de Motivos CRPIA	Gastritis crónica	Cáncer gástrico	<i>p</i>
2 CRPIAs	75 (76.5%)	4(40%)	0.022*
≥ 3 CRPIAs	23 (23.5%)	6(60%)	
total	98	10	

*: exacta de Fisher

El número de motivos CRPIA depende del número de motivos EPIYA C (cuadro 4 y figura 2); un motivo EPIYA-C está flanqueado por 2 motivos CRPIA y dos EPIYA-C se acompañan por 3 motivos CRPIA. Curiosamente se detectó la presencia de un motivo CRPIA en un segundo de EPIYA-B.

Cuadro 4. Número de motivos CRPIA por número de motivos EPIYA C en patologías gástricas.

Motivos EPIYA	Gastritis crónica		Cáncer gástrico	
	2 CRPIAs	≥3 CRPIAs	2 CRPIAs	3 CRPIAs
A B C	75	0	4	0
A B B* C	0	0	0	1
A B C C	0	22	0	5
A B B C C C	0	1	0	0
Total		98		10

✕: un motivo CRPIA fue encontrado en la región N-terminal de la secuencia EPIYA-B marcada.

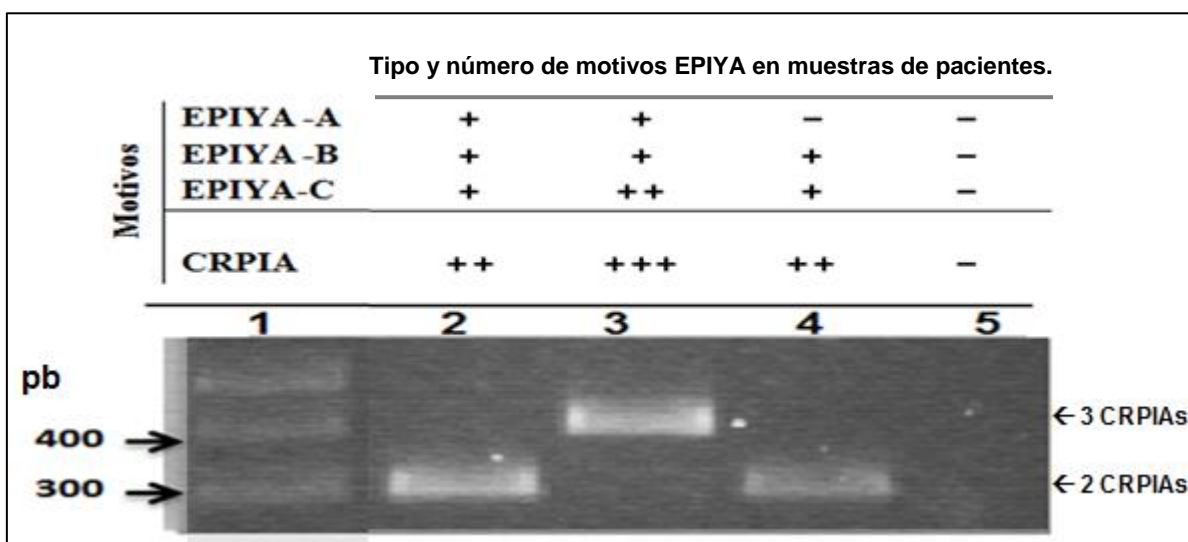


Figura 2. Amplificación de motivos CRPIA de muestras CagA positivas con diferentes motivos EPIYA. Se muestran los diferentes números de motivos CRPIA de acuerdo al motivo EPIYA detectado en diferentes muestras de pacientes. Carril 1, marcador de 1 kb. Carril 2 muestra con EPIYA-ABC y dos motivos CRPIA (284 pb); carril 3 muestra con EPIYA-ABCC y tres motivos CRPIA (386 pb); carril 4 control positivo cepa ATCC J99 EPIYA-BC con dos motivos CRPIA; carril 5, control negativo. +: Representa el número de motivos.

Asociación entre EPIYA-ABCC y CRPIA con cáncer gástrico.

El segmento EPIYA-ABCC y la presencia de ≥ 3 motivos CRPIA se asoció con cáncer gástrico (OR=4.2 y 4.8 respectivamente, cuadro 5).

Cuadro 5. Asociación entre el segmento tipo EPIYA-ABCC y número de motivos CRPIA cáncer gástrico.

	Motivos EPIYA		OR (IC95%)	p*
	ABC	ABCC		
Gastritis crónica	75 (94.9)	22 (81.5)	1.0**	0.042
Cáncer gástrico	4 (5.1)	5 (18.5)	4.2 (1.0-17.2)	
Total	79	27		

	Motivos CRPIA		OR (IC95%)	p*
	2 CRPIAs	≥ 3 CRPIAs		
Gastritis crónica	75 (94.9)	23 (79.3)	1.0**	0.021
Cáncer gástrico	4 (5.1)	6 (20.7)	4.8 (1.2-18.8)	
Total	79	29		

* Prueba χ^2 , se usó regresión logística para determinar el OR; ** grupo de referencia.

Análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de CagA

A partir de la secuencia de ADN de 9 amplicones de *cagA* obtenidas de cáncer gástrico y 9 de gastritis crónica se hizo la predicción de aminoácidos y se identificaron los motivos EPIYA y los motivos de multimerización de CagA (CM), también conocido como CRPIA. Se localizaron los aminoácidos característicos del motivo EPIYA-A, con secuencia EPIYA(K/Q)VNKKK(A/T/V/S)GQ; el patrón E(P/S)IY(A/T)(Q/K)VAKKV(N/T)(A/Q)KI, que corresponde a EPIYA-B; y el patrón EPIYATIDDLGGP para EPIYA-C (figura 3). Una muestra de gastritis crónica (MX44-G) presentó la secuencia ESIYT en el motivo EPIYA-B, y el 50% de las secuencias tuvieron el patrón EPIYT en vez de EPIYA en el motivo EPIYA-B. La modificación EPIYT fue más frecuente en cáncer gástrico y en tres de las seis muestras coincidió con dos EPIYA-C. Se encontraron algunos cambios de aminoácido en el motivo

CRPIA; FPLK(**R/K**)H(**D/G**)KVD(D/**M**)LSKVG para el primer motivo CRPIA en el N-terminal de EPIYA-C, FPLK(**R/K**)H(D/G)KVDDLSKVG en el segundo motivo CRPIA y FPLKRHDKVDDLSKV para el último CRPIA. Todos los CRPIA fueron de tipo occidental y se identificó uno de estos motivos en la región N-terminal de uno de los dos motivos EPIYA-B que contenía *cagA* en la muestra MX16-C de cáncer gástrico; en esta única muestra la secuencia de aminoácidos GKDKGPE fue localizada antes del motivo EPIYA-A (figura 3). La secuencia de *cagA* de la muestra MX16-C obtenida de un pacientes con cáncer gástrico presentó el motivo EPIYA-ABB´C, curiosamente entre la secuencia de aminoácidos de los dos motivos EPIYA-B se detectó un motivo CRPIA (FPLKKHGKVDDLSKV) (figura 3).

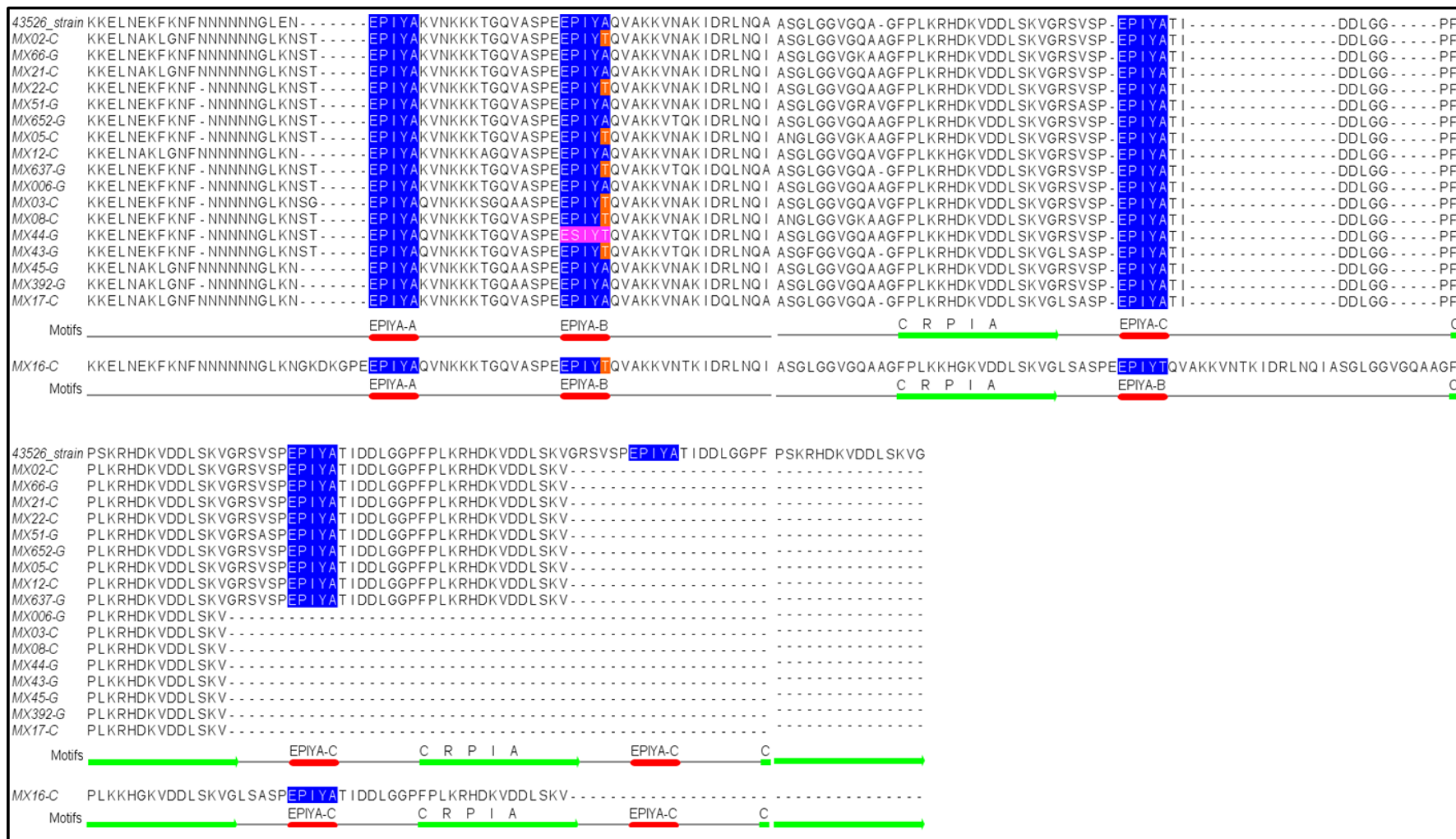


Figura 3. Alineamiento parcial de aminoácidos de CagA. En azul se muestra la secuencia de los 5 aminoácidos de la secuencia EPIYA. En rojo se representa cada uno de los patrones de los motivos EPIYA detectados. Los motivos CRPIA occidentales (verde) fueron detectados flanqueando a cada motivo EPIYA-C. Se observó variación del quinto aminoácido en EPIYA-B (naranja), una muestra de gastritis crónica presentó la secuencia Amerindia-I (rosa) en EPIYA-B, en una muestra de cáncer gástrico (MX16-C) se localizó un motivo CRPIA entre los motivos EPIYA-B, los motivos CRPIA occidentales fueron altamente conservados.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La infección con cepas de *H. pylori cagA*-positivas es reconocida como el factor de riesgo más importante para el cáncer gástrico y está asociada con gastritis atrófica y úlcera duodenal (Queiroz *et al.*, 2012; Quiroga *et al.*, 2010); no obstante la mayoría de los infectados no desarrollan enfermedades graves.

En diversos trabajos se ha encontrado asociación de CagA con la severidad de la patología gástrica (Basso *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2003; Palli *et al.*, 2007; Sahara *et al.*, 2012; Satomi *et al.*, 2006) y se ha propuesto que esa relación se explica por el número de motivos EPIYA-C en la proteína, las cuales influyen en el grado de virulencia y el potencial oncogénico de *H. pylori*-CagA+ (Azuma *et al.*, 2004a; Basso *et al.*, 2008). Se ha sugerido que la determinación de los motivos EPIYA en CagA podría ser mejor que la detección de *cagA* para evaluar el riesgo de patología gástrica grave (Argent *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2010).

El 100% de los motivos EPIYA de CagA identificados fueron tipo Occidental y su distribución fue estadísticamente diferente entre patologías ($p < 0.017$). En el 74% de la población estudiada el gen *cagA* tuvo un motivo EPIYA-C, sin embargo la secuencia ABC típica fue más frecuente en gastritis crónica (76.5%); similar a lo reportado por Batista *et al.*, (2011) en Brasil (79.4%), pero superior a lo encontrado por Quiroga (59%) (Quiroga *et al.*, 2010) y Acosta (62.5%) (Acosta *et al.*, 2010) en pacientes Colombianos.

En México, Reyes-León encontró que el motivo ABC fue el más frecuente (50%) en niños con dolor abdominal crónico (Reyes-Leon *et al.*, 2007). La frecuencia de casos de *H. pylori cagA*-positivas con dos motivos EPIYA-C fue mayor en cáncer gástrico 50%; superior a la frecuencia reportada por Acosta (27.7%) y Quiroga (35.3%) en Colombia y por Batista en Brasil (34.6%) (Acosta *et al.*, 2010; Batista *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*, 2010).

Nuestros resultados demuestran que la presencia de dos o más repetidos EPIYA-C en *cagA* representa un mayor riesgo de cáncer gástrico que las cepas de *H. pylori* con un motivo EPIYA-C. La asociación entre los polimorfismos de CagA y patologías gástricas severas (Acosta *et al.*, 2010; Basso *et al.*, 2008; Batista *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*, 2010; Sgouras *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2012) o con lesiones precancerosa es controversial (Bosques-Padilla *et al.*, 2003; Flores-Luna *et al.*, 2013; Salih *et al.*, 2010; Sicinski *et al.*, 2010). El aumento en el número de motivos EPIYA-C incrementa la posibilidad de fosforilación de CagA y su interacción con proteínas celulares que inducen la elongación de la célula epitelial, recambio celular y producción de citocinas proinflamatorias que promueven la aparición de cáncer gástrico (Argent *et al.*, 2005; Quiroga *et al.*, 2010) y que pueden relacionarse con otros resultados clínicos como la úlcera péptica.

El 81.5% de las muestras que desplegaron patrones electroforéticos con dos bandas para EPIYA-C fueron de pacientes con gastritis crónica. Es probable que una proporción de estos individuos estén en mayor riesgo de cáncer, de acuerdo con lo observado en estudios previos y con la asociación que encontramos en este estudio. Quiroga *et al.*, encontraron que cepas con dos segmentos EPIYA-C provenientes de gastritis inducen rearrreglos del citoesqueleto en proporción variable (Basso *et al.*, 2008; Quiroga *et al.*, 2010). Estos rearrreglos podrían promover la transformación y motilidad de las células del epitelio gástrico favoreciendo el desarrollo de cáncer gástrico (Hatakeyama, 2009).

Se ha demostrado que el número y la presencia de los motivos CRPIA influyen en la potenciación de multimerización, estabilidad y vida media de CagA (Acosta *et al.*, 2010; Ishikawa *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2006), favoreciendo la formación del complejo CagA-SHP2 y llevando a la desregulación celular (Lu *et al.*, 2008). Al analizar los motivos CRPIA, observamos una frecuencia de 73.2% para la presencia de 2 motivos CRPIA en el total de la población estudiada, sin embargo, en gastritis crónica la localización de 2 CRPIAs (76.5%) fue mayor en comparación con cáncer gástrico. En cáncer se identificó un alto porcentaje (60%) de ≥ 3 CRPIAs y encontramos diferencia estadística en su distribución ($p=0.022$). El incremento en el número de

CRPIAs aumenta el riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico en 3.8 veces, en comparación con las isoformas de CagA con dos de estos repetidos (OR=4.8, 95% IC=1.2-18.8, p=0.021). Estos datos apoyan la teoría de que el aumento de CRPIA favorece la actividad de CagA, llevando a la desregulación celular y como consecuencia al desarrollo de lesiones precancerosas o cáncer gástrico. Hasta el momento, no se han reportado estudios que relacionen el número de segmentos CRPIA con el desarrollo de patologías gástricas, sin embargo se sabe que, al igual que los motivos EPIYA, los motivos CRPIA se pueden clasificar como tipo occidentales o asiáticos, de esta forma CagA puede presentar motivos CRPIA exclusivamente occidentales, asiática o de forma mixta (Ogorodnik and Raffaniello, 2013; Sicinschi *et al.*, 2010). En reportes previos se sugiere que la presencia de repetidos CRPIA tipo occidentales en CagA favorecen la afinidad de CagA hacia SHP-2 en comparación con las CagA con combinaciones de CRPIA occidentales y asiáticos (Sicinschi *et al.*, 2010).

La secuencia de aminoácidos de CagA obtenida por análisis bioinformático reveló que es frecuente (9 de 18 secuencias) la sustitución del aminoácido de alanina por uno de treonina en el motivo EPIYA-B (EPIYT), se ha reportado que aislamientos ABCC con esta modificación inducen menor elongación celular y secreción de IL-8, que los que tienen el patrón ABCC normal (Reyes-Leon *et al.*, 2007). Probablemente las proteínas de CagA con cambios en EPIYA-B podrían tener efectos menos oncogénicos que las CagA típicas. No obstante, el efecto de CagA en la célula también se debe a otras secuencias de aminoácidos, como los CRPIA, por lo que es necesario evaluar si la proteína CagA con modificaciones en EPIYA-B del patrón ABCC y con la secuencia normal de CRPIA, aisladas de cáncer gástrico presenta alteraciones en su actividad.

En una muestra de gastritis crónica identificamos la modificación ESIYT en EPIYA-B de CagA; la secuencia ESIYT perteneciente a CagA Amerindia-I se ha relacionado con baja virulencia de *H. pylori*, comparada con las cepas occidentales o asiáticas (Suzuki *et al.*, 2011), sin embargo las CagA Amerindias -I y -II presentan degeneraciones o eliminaciones en sus motivos CRPIA (Kersulyte *et al.*, 2010;

Suzuki *et al.*, 2011). La presencia de CagA Amerindias han sido reportadas recientemente en grupos indígenas de México, con ancestralidad Amerindia (Camorlinga-Ponce *et al.*, 2011), curiosamente, la secuencia ESIYT que encontramos difiere de las reportadas previamente (Camorlinga-Ponce *et al.*, 2011) debido a que presentó segmentos CRPIA completos de tipo occidental. Esto es muy importante debido a que esta secuencia no es típicamente reportada en la literatura y sería interesante observar qué efecto presenta la proteína CagA en la desregulación celular. En una muestra de cáncer gástrico detectamos una secuencia CRPIA antes del motivo EPIYA-B. Este hallazgo está en acuerdo con otros reportes quienes encontraron algunas variantes de CagA que tuvieron el segmento CRPIA en los motivos EPIYA-A y -B (Acosta *et al.*, 2010; Sicinschi *et al.*, 2010). La localización del motivo CRPIA en EPIYA-B puede ser resultado de recombinación entre cepas de *H. pylori* con diferentes alelotipos de *cagA* o de inserción de secuencias de ADN que contribuyen a la diversificación de *H. pylori* (Furuta *et al.*, 2011; Ishikawa *et al.*, 2009).

En conclusión, las cepas de *H. pylori cagA* positivas que infectan pacientes del estado de Guerrero, presentaron CagA tipo occidental. Los motivos EPIYA-ABC y 2 segmentos CRPIA en CagA fueron detectados con mayor frecuencia en pacientes con gastritis crónica, mientras los EPIYA-ABCC y ≥ 3 CRPIAs fueron los más prevalentes en cáncer gástrico. Las isoformas ABBC y ABBCCC fueron las menos frecuentes. El EPIYA-ABCC y la presencia de ≥ 3 CRPIAs se asoció con cáncer gástrico, lo que sugiere que el aumento del repetido EPIYA-C y CRPIA es un factor de riesgo en cáncer gástrico; por lo tanto, la detección de estos motivos podrían ser marcadores de riesgo para la severidad de las patologías gástricas. Los cambios de alanina por treonina en EPIYA-B podrían tener un papel importante en la carcinogénesis dada a su alta prevalencia en cáncer gástrico. Finalmente la localización atípica de un motivo CRPIA ayudaría a fortalecer la hipótesis de uno de los mecanismos de evolución del gen *cagA*, mientras que la infección por *H. pylori* CagA positiva con motivos CRPIA tipo occidental podría estar potenciando el papel carcinogénico de CagA.

REFERENCIAS

- Acosta, N., A. Quiroga, P. Delgado, M. M. Bravo and C. Jaramillo. "Helicobacter Pylori Caga Protein Polymorphisms and Their Lack of Association with Pathogenesis." *World J Gastroenterol* 16, no. 31 (2010): 3936-43.
- Argent, R. H., J. L. Hale, E. M. El-Omar and J. C. Atherton. "Differences in Helicobacter Pylori Caga Tyrosine Phosphorylation Motif Patterns between Western and East Asian Strains, and Influences on Interleukin-8 Secretion." *J Med Microbiol* 57, no. Pt 9 (2008): 1062-7.
- Argent, R. H., Y. Zhang and J. C. Atherton. "Simple Method for Determination of the Number of Helicobacter Pylori Caga Variable-Region Epiya Tyrosine Phosphorylation Motifs by Pcr." *J Clin Microbiol* 43, no. 2 (2005): 791-5.
- Azuma, T., M. Ohtani, Y. Yamazaki, H. Higashi and M. Hatakeyama. "Meta-Analysis of the Relationship between Caga Seropositivity and Gastric Cancer." *Gastroenterology* 126, no. 7 (2004): 1926-7; author reply 1927-8.
- Azuma, T., S. Yamazaki, A. Yamakawa, M. Ohtani, A. Muramatsu, H. Suto, Y. Ito, M. Dojo, Y. Yamazaki, M. Kuriyama, Y. Keida, H. Higashi and M. Hatakeyama. "Association between Diversity in the Src Homology 2 Domain--Containing Tyrosine Phosphatase Binding Site of Helicobacter Pylori Caga Protein and Gastric Atrophy and Cancer." *J Infect Dis* 189, no. 5 (2004): 820-7.
- Basso, D., C. F. Zambon, D. P. Letley, A. Stranges, A. Marchet, J. L. Rhead, S. Schiavon, G. Guariso, M. Ceroti, D. Nitti, M. Rugge, M. Plebani and J. C. Atherton. "Clinical Relevance of Helicobacter Pylori Caga and Vaca Gene Polymorphisms." *Gastroenterology* 135, no. 1 (2008): 91-9.
- Batista, S. A., G. A. Rocha, A. M. Rocha, I. E. Saraiva, M. M. Cabral, R. C. Oliveira and D. M. Queiroz. "Higher Number of Helicobacter Pylori Caga Epiya C Phosphorylation Sites Increases the Risk of Gastric Cancer, but Not Duodenal Ulcer." *BMC Microbiol* 11, (2011): 61.
- Bosques-Padilla, F. J., R. Tijerina-Menchaca, G. I. Perez-Perez, J. P. Flores-Gutierrez and E. Garza-Gonzalez. "Comparison of Helicobacter Pylori Prevalence in Symptomatic Patients in Northeastern Mexico with the Rest of the Country: Its Association with Gastrointestinal Disease." *Arch Med Res* 34, no. 1 (2003): 60-3.
- Camorlinga-Ponce, M., G. Perez-Perez, G. Gonzalez-Valencia, I. Mendoza, R. Penaloza-Espinosa, I. Ramos, D. Kersulyte, A. Reyes-Leon, C. Romo, J. Granados, L. Munoz, D. E. Berg and J. Torres. "Helicobacter Pylori Genotyping from American Indigenous Groups Shows Novel Amerindian Vaca and Caga Alleles and Asian, African and European Admixture." *PLoS One* 6, no. 11 (2011): e27212.

- Chang, Y. H., L. Wang, M. S. Lee, C. W. Cheng, C. Y. Wu and M. Y. Shiau. "Genotypic Characterization of Helicobacter Pylori Caga and Vaca from Biopsy Specimens of Patients with Gastroduodenal Diseases." *Mt Sinai J Med* 73, no. 3 (2006): 622-6.
- Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang, N. Figura and et al. "Molecular Characterization of the 128-Kda Immunodominant Antigen of Helicobacter Pylori Associated with Cytotoxicity and Duodenal Ulcer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, no. 12 (1993): 5791-5.
- de Martel, C., D. Forman and M. Plummer. "Gastric Cancer: Epidemiology and Risk Factors." *Gastroenterol Clin North Am* 42, no. 2 (2013): 219-40.
- Dixon MF., Genta RM, Yardley JH, Correa P. "Histological classification of gastritis and Helicobacter pylori infection: an agreement at last? The International Workshop on the Histopathology of Gastritis." *Helicobacter*. 2 (1997)Suppl 1:S17-24.
- Flores-Luna, L., M. Camorlinga-Ponce, G. Hernandez-Suarez, E. Kasamatsu, M. E. Martinez, R. Murillo, E. Lazcano and J. Torres. "The Utility of Serologic Tests as Biomarkers for Helicobacter Pylori-Associated Precancerous Lesions and Gastric Cancer Varies between Latin American Countries." *Cancer Causes Control* 24, no. 2 (2013): 241-8.
- Furuta, Y., K. Yahara, M. Hatakeyama and I. Kobayashi. "Evolution of Caga Oncogene of Helicobacter Pylori through Recombination." *PLoS One* 6, no. 8 (2011): e23499.
- Hatakeyama, M. "Helicobacter Pylori and Gastric Carcinogenesis." *J Gastroenterol* 44, no. 4 (2009): 239-48.
- Hayashi, T., M. Senda, H. Morohashi, H. Higashi, M. Horio, Y. Kashiba, L. et al., "Tertiary Structure-Function Analysis Reveals the Pathogenic Signaling Potentiation Mechanism of Helicobacter Pylori Oncogenic Effector Caga." *Cell Host Microbe* 12, no. 1 (2012): 20-33.
- Huang, J. Q., G. F. Zheng, K. Sumanac, E. J. Irvine and R. H. Hunt. "Meta-Analysis of the Relationship between Caga Seropositivity and Gastric Cancer." *Gastroenterology* 125, no. 6 (2003): 1636-44.
- Ishikawa, S., T. Ohta and M. Hatakeyama. "Stability of Helicobacter Pylori Caga Oncoprotein in Human Gastric Epithelial Cells." *FEBS Lett* 583, no. 14 (2009): 2414-8.
- Jones, K. R., Y. M. Joo, S. Jang, Y. J. Yoo, H. S. Lee, I. S. Chung, C. H. Olsen, J. M. Whitmire, D. S. Merrell and J. H. Cha. "Polymorphism in the Caga Epiya Motif Impacts Development of Gastric Cancer." *J Clin Microbiol* 47, no. 4 (2009): 959-68.

- Kersulyte, D., A. Kalia, R. H. Gilman, M. Mendez, P. Herrera, L. Cabrera, B. Velapatino, J. Balqui, F. Paredes Puente de la Vega, C. A. Rodriguez Ulloa, J. Cok, C. C. Hooper, G. Dailide, S. Tamma and D. E. Berg. "Helicobacter Pylori from Peruvian Amerindians: Traces of Human Migrations in Strains from Remote Amazon, and Genome Sequence of an Amerind Strain." *PLoS One* 5, no. 11 (2010): e15076.
- Kuipers, E. J., G. I. Perez-Perez, S. G. Meuwissen and M. J. Blaser. "Helicobacter Pylori and Atrophic Gastritis: Importance of the Caga Status." *J Natl Cancer Inst* 87, no. 23 (1995): 1777-80.
- Kumar, S., A. Kumar and V. K. Dixit. "Diversity in the Cag Pathogenicity Island of Helicobacter Pylori Isolates in Populations from North and South India." *J Med Microbiol* 59, no. Pt 1 (2010): 32-40.
- Lu, H. S., Y. Saito, M. Umeda, N. Murata-Kamiya, H. M. Zhang, H. Higashi and M. Hatakeyama. "Structural and Functional Diversity in the Par1b/Mark2-Binding Region of Helicobacter Pylori Caga." *Cancer Sci* 99, no. 10 (2008): 2004-11.
- Mueller, D., N. Tegtmeyer, S. Brandt, Y. Yamaoka, E. De Poire, D. Sgouras, S. et al., "C-Src and C-Abl Kinases Control Hierarchic Phosphorylation and Function of the Caga Effector Protein in Western and East Asian Helicobacter Pylori Strains." *J Clin Invest* 122, no. 4 (2012): 1553-66.
- Ogorodnik, E. and R. D. Raffaniello. "Analysis of the 3'-Variable Region of the Caga Gene from Helicobacter Pylori Strains Infecting Patients at New York City Hospitals." *Microb Pathog* 56, (2013): 29-34.
- Palli, D., G. Masala, G. Del Giudice, M. Plebani, D. Basso, D. Berti, M. E. et al., "Caga+ Helicobacter Pylori Infection and Gastric Cancer Risk in the Epic-Eurgast Study." *Int J Cancer* 120, no. 4 (2007): 859-67.
- Queiroz, D. M., C. I. Silva, M. H. Goncalves, M. B. Braga-Neto, A. B. Fialho, A. M. Fialho, G. A. Rocha, A. M. Rocha, S. A. Batista, R. L. Guerrant, A. A. Lima and L. L. Braga. "Higher Frequency of Caga Epiya-C Phosphorylation Sites in H. Pylori Strains from First-Degree Relatives of Gastric Cancer Patients." *BMC Gastroenterol* 12, (2012): 107.
- Quiroga, A. J., A. Huertas, A. L. Combita and M. M. Bravo. "Variation in the Number of Epiya-C Repeats in Caga Protein from Colombian Helicobacter Pylori Strains and Its Ability Middle to Induce Hummingbird Phenotype in Gastric Epithelial Cells." *Biomedica* 30, no. 2 (2010): 251-8.
- Ren, S., H. Higashi, H. Lu, T. Azuma and M. Hatakeyama. "Structural Basis and Functional Consequence of Helicobacter Pylori Caga Multimerization in Cells." *J Biol Chem* 281, no. 43 (2006): 32344-52.
- Reyes-Leon, A., J. C. Atherton, R. H. Argent, J. L. Puente and J. Torres. "Heterogeneity in the Activity of Mexican Helicobacter Pylori Strains in Gastric

- Epithelial Cells and Its Association with Diversity in the Caga Gene." *Infect Immun* 75, no. 7 (2007): 3445-54.
- Rohde, M., J. Puls, R. Buhrdorf, W. Fischer and R. Haas. "A Novel Sheathed Surface Organelle of the Helicobacter Pylori Cag Type Iv Secretion System." *Mol Microbiol* 49, no. 1 (2003): 219-34.
- Rudi, J., C. Kolb, M. Maiwald, D. Kuck, A. Sieg, P. R. Galle and W. Stremmel. "Diversity of Helicobacter Pylori Vaca and Caga Genes and Relationship to Vaca and Caga Protein Expression, Cytotoxin Production, and Associated Diseases." *J Clin Microbiol* 36, no. 4 (1998): 944-8.
- Sahara, S., M. Sugimoto, R. K. Vilaichone, V. Mahachai, H. Miyajima, T. Furuta and Y. Yamaoka. "Role of Helicobacter Pylori Caga Epiya Motif and Vaca Genotypes for the Development of Gastrointestinal Diseases in Southeast Asian Countries: A Meta-Analysis." *BMC Infect Dis* 12, (2012): 223.
- Salih, B. A., B. K. Bolek and S. Arikan. "DNA Sequence Analysis of Caga 3' Motifs of Helicobacter Pylori Strains from Patients with Peptic Ulcer Diseases." *J Med Microbiol* 59, no. Pt 2 (2010): 144-8.
- Satomi, S., A. Yamakawa, S. Matsunaga, R. Masaki, T. Inagaki, T. Okuda, H. Suto, Y. Ito, Y. Yamazaki, M. Kuriyama, Y. Keida, H. Kutsumi and T. Azuma. "Relationship between the Diversity of the Caga Gene of Helicobacter Pylori and Gastric Cancer in Okinawa, Japan." *J Gastroenterol* 41, no. 7 (2006): 668-73.
- Schmidt, H. M., K. L. Goh, K. M. Fock, I. Hilmi, S. Dhamodaran, D. Forman and H. Mitchell. "Distinct Caga Epiya Motifs Are Associated with Ethnic Diversity in Malaysia and Singapore." *Helicobacter* 14, no. 4 (2009): 256-63.
- Selbach, M., 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* 277, no. 9 (2002): 6775-8.
- Sgouras, D. N., E. G. Panayotopoulou, K. Papadakos, B. Martinez-Gonzalez, A. Roumbani, J. Panayiotou, C. vanVliet-Constantinidou, A. F. Mentis and E. Roma-Giannikou. "Caga and Vaca Polymorphisms Do Not Correlate with Severity of Histopathological Lesions in Helicobacter Pylori-Infected Greek Children." *J Clin Microbiol* 47, no. 8 (2009): 2426-34.
- Sicinschi, L. A., P. Correa, R. M. Peek, M. C. Camargo, M. B. Piazuolo, J. Romero-Gallo, et al., "Caga C-Terminal Variations in Helicobacter Pylori Strains from Colombian Patients with Gastric Precancerous Lesions." *Clin Microbiol Infect* 16, no. 4 (2010): 369-78.
- Suzuki, M., K. Kiga, D. Kersulyte, J. Cok, C. C. Hooper, H. Mimuro, T. Sanada, S. Suzuki, M. Oyama, H. Kozuka-Hata, S. Kamiya, Q. M. Zou, R. H. Gilman, D. E. Berg and C. Sasakawa. "Attenuated Caga Oncoprotein in Helicobacter Pylori

- from Amerindians in Peruvian Amazon." *J Biol Chem* 286, no. 34 (2011): 29964-72.
- Suzuki, M., H. Mimuro, K. Kiga, M. Fukumatsu, N. Ishijima, H. Morikawa, S. Nagai, S. Koyasu, R. H. Gilman, D. Kersulyte, D. E. Berg and C. Sasakawa. "Helicobacter Pylori Caga Phosphorylation-Independent Function in Epithelial Proliferation and Inflammation." *Cell Host Microbe* 5, no. 1 (2009): 23-34.
- Tammer, I., S. Brandt, R. Hartig, W. König and S. Backert. "Activation of Abl by Helicobacter Pylori: A Novel Kinase for Caga and Crucial Mediator of Host Cell Scattering." *Gastroenterology* 132, no. 4 (2007): 1309-19.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. "Mega5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods." *Mol Biol Evol* 28, no. 10 (2011): 2731-9.
- Tegtmeyer, N. and S. Backert. "Role of Abl and Src Family Kinases in Actin-Cytoskeletal Rearrangements Induced by the Helicobacter Pylori Caga Protein." *Eur J Cell Biol* 90, no. 11 (2011): 880-90.
- Torres, L. E., L. Gonzalez, K. Melian, J. Alonso, A. Moreno, M. Hernandez, O. Reyes, L. Bermudez, J. Campos, G. Perez-Perez and B. L. Rodriguez. "Epiya Motif Patterns among Cuban Helicobacter Pylori Caga Positive Strains." *Biomedica* 32, no. 1 (2012): 23-31.
- Truong, B. X., V. T. Mai, H. Tanaka, T. Ly le, T. M. Thong, H. H. Hai, D. Van Long, K. Furumatsu, M. Yoshida, H. Kutsumi and T. Azuma. "Diverse Characteristics of the Caga Gene of Helicobacter Pylori Strains Collected from Patients from Southern Vietnam with Gastric Cancer and Peptic Ulcer." *J Clin Microbiol* 47, no. 12 (2009): 4021-8.
- Tsutsumi, R., A. Takahashi, T. Azuma, H. Higashi and M. Hatakeyama. "Focal Adhesion Kinase Is a Substrate and Downstream Effector of Shp-2 Complexed with Helicobacter Pylori Caga." *Mol Cell Biol* 26, no. 1 (2006): 261-76.
- Wroblewski, L. E., R. M. Peek, Jr. and K. T. Wilson. "Helicobacter Pylori and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk." *Clin Microbiol Rev* 23, no. 4 (2010): 713-39.