



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magister en Ciencias con
Mención en Microbiología

**Asociación de genes *nudA* y *htrA* de *Helicobacter pylori*
con severidad de patologías gástricas.
Estudio bioinformático de la proteína NudA**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención en
Microbiología

PAULINA ANDREA LINCOÑIR CAMPOS
Abril
CONCEPCIÓN-CHILE
2019

Profesor Guía: Apolinaria García Cancino
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dra. Apolinaria García Cancino
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesores Co-Guía

Dr. Alexis Salas Burgos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. José Martínez Oyanedel
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dr. Ítalo Fernández Fonseca
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Carlos González Correa
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Patricio Godoy Martínez
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



Para toda mi familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a mi familia. A mis padres Juanita y Juanito por apoyarme siempre, a mis hermanos Víctor y Cony por brindarme consejos y risas, y también a mi abuelita por ser ella misma y siempre rezar por cada integrante de su familia. De igual manera quisiera agradecer a las maravillosas personas que pude conocer durante este tiempo en el curso del magister y especialmente a un pequeño grupo que he aprendido quererlos muchos: Javiera, Susana, Marcela, Michelle, Alonso, Cristian y Marco. También agradecer a Olga y Cristian Parra por su disposición y ayuda en el laboratorio, a la profesora Apolinaria por permitirme aprender en su laboratorio y al profesor José Martínez por guiarme en los análisis bioinformáticos.

Finalmente agradecer CONICYT por el otorgamiento de la Beca Magister Nacional (folio: 22152241), que me permitió financiar los dos primeros años del programa de postgrado.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESÚMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades sobre <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2 <i>Helicobacter pylori</i> y su relación con el daño gástrico	3
1.3 Mecanismos moleculares de patogénesis de <i>Helicobacter pylori</i>	7
1.3.1 Ureasa	8
1.3.2 Adhesinas	9
1.3.3 VacA	11
1.3.4 CagA.....	13
1.4 <i>Helicobacter pylori</i> inter e intracelular	14
1.4.1 Proteasas HtrA.....	17
1.4.2 NudA.....	20
1.5 Genotipificación de <i>Helicobacter pylori</i> y daño gástrico.....	21
HIPÓTESIS DE TRABAJO	24
OBJETIVOS.....	25
OBJETIVOS GENERALES.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1 Perfil de los pacientes.....	27
2.2 Toma de muestras gástricas.....	27
2.3 Extracción de ADN desde biopsias gástricas	29
2.4 Extracción de ADN bacteriano.....	29
2.5 Análisis molecular por Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	30
2.5.1 Diseño de partidores gen <i>nudA</i>	30
2.5.2 Estandarización de partidores para gen <i>nudA</i>	31

2.5.2.1	Gradiente de temperatura de alineamiento.....	31
2.5.2.2	Determinación de sensibilidad y especificidad de los partidores.....	32
2.5.3	Estandarización de partidores para gen <i>htrA</i>	33
2.5.3.1	Gradiente de temperatura de alineamiento.....	33
2.5.3.2	Determinación de sensibilidad y especificidad.....	34
2.5.4	Detección molecular de <i>Helicobacter pylori</i> en biopsias gástrica	35
2.5.5	Perfil genético de genes de virulencia	36
2.6	Análisis estadísticos.....	39
2.7	Análisis bioinformáticos	39
2.7.1	Determinación <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos de la proteína NudA.....	40
2.7.2	Análisis de secuencia aminoacídica	40
2.7.3	Alineamiento de secuencias	41
2.7.3.1	Determinación de posición de la caja Nudix de la secuencia de NudA en relación con las subfamilias	41
2.7.3.2	Determinación de identidad y similitud de la secuencia de NudA en relación con las subfamilias de NUDIX	42
2.7.3.3	Determinación residuos del sitio catalítico y de unión al sustrato	42
2.7.4	Modelamiento de estructura de proteína con servidores	42
2.7.5	Determinación de la calidad del modelo	44
2.7.6	Modelaje comparativo con Modeller	44
2.7.7	Determinación de identidad y similitud de la secuencia de NudA en relación con secuencias de invasinas.....	45
3.	RESULTADOS.....	46
3.1	Estandarización de partidores	46
3.1.1	Estandarización de partidores para gen <i>nudA</i>	46
3.1.1.1	Gradiente de temperatura de alineamiento.....	46
3.1.1.2	Determinación de sensibilidad y especificidad.....	49
3.1.2	Estandarización de partidores para gen <i>htrA</i>	55
3.1.2.1	Gradiente de temperatura de alineamiento.....	55

3.1.2.2 Determinación de sensibilidad y especificidad.....	58
3.2 Perfil sociodemográfico de los pacientes positivos para <i>Helicobacter pylori</i>	63
3.3 Detección molecular de <i>Helicobacter pylori</i> en biopsias gástricas.....	64
3.4 Análisis de datos.....	65
3.5 Análisis bioinformáticos	75
3.5.1 Determinación de la secuencia de aminoácidos de la proteína NudA.....	75
3.5.2 Análisis de secuencia aminoacídica	77
3.5.3 Alineamiento de secuencias	79
3.5.3.1 Determinación de secuencia conservada para las subfamilias de NUDIX.....	79
3.5.3.2 Determinación de identidad y similitud de la secuencia de NudA en relación con las subfamilias de NUDIX	81
3.5.3.3 Determinación residuos del sitio catalítico y de unión al sustrato	83
3.5.4 Modelamiento de estructura de proteína con servidores	87
3.5.5 Determinación Calidad del Modelo	91
3.5.6 Modelaje comparativo con Modeller	95
3.5.7 Determinación de identidad y similitud de la secuencia de NudA en relación con secuencias de invasinas.....	99
4. DISCUSIÓN.....	100
5. CONCLUSIONES.....	113
6. PROYECCIONES.....	114
7. REFERENCIAS.....	115
ANEXOS.....	129
Anexo 1.....	129
Anexo 2.....	131

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Partidores utilizados para la detección de <i>Helicobacter pylori</i> y genes de virulencia mediante PCR	37
Tabla 3.1. Presencia de genes de virulencia para cada estado de severidad gástrica	68
Tabla 3.2. Análisis estadístico para <i>cagA</i> , con tres categorías	70
Tabla 3.3. Asociación entre los genes <i>cagA</i> y <i>vacAs2</i>	72
Tabla 3.4. Asociación entre los genes <i>cagA</i> y <i>vacAm1</i>	72
Tabla 3.5. Asociación entre los genes <i>cagA</i> y <i>vacAm2</i>	73
Tabla 3.6. Asociación entre los genes <i>vacAs2</i> y <i>vacAm1</i>	73
Tabla 3.7. Asociación entre los genes <i>vacAs2</i> y <i>vacAm2</i>	74
Tabla 3.8. Asociación entre los genes <i>vacAm1</i> y <i>vacAm2</i>	74
Tabla 3.9. Asociación entre el gen <i>vacAs1b</i> y el sexo de los pacientes	75
Tabla 3.10. Identidad y similitud de NudA con subfamilias de proteínas Nudix ..	82
Tabla 3.11. Aminoácidos correspondientes al sitio catalítico de las subfamilias AP4AP y RppH	84
Tabla 3.12. Aminoácidos correspondientes al sitio de unión al sustrato de las subfamilias AP4AP y RppH	84
Tabla 3.13. Información de los modelos generados a través de Swissmodel ..	89
Tabla 3.14. Información de los modelos generados a través de Modbase	89
Tabla 3.15. Información de los modelos generados a través de Phyre	90
Tabla 3.16. Información de los modelos generados a través de I-tasser	90
Tabla 3.17. Valores RMSD de la estructura nativa con los modelos seleccionados para cada servidor	91
Tabla 3.18. Identidad y similitud de la proteína NudA respecto a invasinas de especies bacterianas	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Progreso de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	7
Figura 3.1. Amplificación en gradiente de temperatura de alineamiento del gen <i>nudA</i> utilizando partidores F1-R1.....	47
Figura 3.2. Amplificación en gradiente de temperatura de alineamiento del gen <i>nudA</i> utilizando partidores F2-R2.....	48
Figura 3.3. Sensibilidad de partidores F1-R1 para el gen <i>nudA</i>	50
Figura 3.4. Sensibilidad de partidores F2-R2 para el gen <i>nudA</i>	51
Figura 3.5. Especificidad de los partidores F1-R1 para el gen <i>nudA</i>	53
Figura 3.6. Especificidad de los partidores F2-R2 para el gen <i>nudA</i>	54
Figura 3.7. Amplificación en gradiente de temperatura de alineamiento del gen <i>htrA</i> utilizando partidores A-F	56
Figura 3.8. Amplificación en gradiente de temperatura de alineamiento del gen <i>htrA</i> utilizando partidores C-D	57
Figura 3.9. Sensibilidad de partidores A-F para el gen <i>htrA</i>	59
Figura 3.10. Sensibilidad de partidores C-D para el gen <i>htrA</i>	60
Figura 3.11. Especificidad de los partidores A-F para el gen <i>htrA</i>	61
Figura 3.12. Especificidad de los partidores C-D para el gen <i>htrA</i>	62
Figura 3.13. Frecuencia de diagnósticos histopatológicos para la población estudiada positiva para <i>H. pylori</i> ARNr 16S.....	64
Figura 3.14. Presencia de genes de virulencia en pacientes positivos para <i>Helicobacter pylori</i> independiente de la condición gástrica.....	66
Figura 3.15. Presencia de genes de virulencia de acuerdo al daño gástrico ...	69
Figura 3.16. Secuencia de aminoácidos correspondiente a los seis marcos de lectura para el gen <i>nudA</i>	76
Figura 3.17. Proteínas de base de datos similares NudA	78
Figura 3.18. Alineamiento de secuencias pertenecientes a ADPRP.....	80
Figura 3.19. Alineamiento de secuencias pertenecientes a GDPMH.....	80
Figura 3.20. Alineamiento de secuencias pertenecientes a MutT.....	80
Figura 3.21. Alineamiento de secuencias pertenecientes a AP4AP.....	81
Figura 3.22. Alineamiento de secuencias pertenecientes a RppH.....	81
Figura 3.23. Alineamiento de NudA y AP4AP de <i>A. aeolicus</i>	85

Figura 3.24. Alineamiento de NudA y RppH de <i>Escherichia coli</i>	86
Figura 3.25. Gráfico de Ramachandran para modelo de NudA generado por Phyre	93
Figura 3.26. Z-score para modelo de NudA generado por Phyre.....	94
Figura 3.27. Gráfico de Ramachandran para modelo de NudA mejorado a través de Modeller	96
Figura 3.28. Z-score para modelo de NudA mejorado a través de Modeller....	97
Figura 3.29. Modelo de la proteína NudA	98



RESUMEN

El 50% de la población mundial se encuentra infectada por *Helicobacter pylori*, capaz de colonizar y causar patologías gástricas a través de un variado pool genético. Hay dos genes que estarían involucrados con la capacidad inter e intra-celular de *H. pylori*: *htrA* y *nudA*. Se conoce la función de *htrA*, pero no está completamente dilucidada la de *nudA*. Hasta hoy, se desconoce la asociación de estos genes con el daño gástrico, por lo que es necesario conocer su prevalencia en individuos sintomáticos positivos para *H. pylori*, y determinar la función de la potencial invasina NudA.

Mediante PCR se detectaron los genes *nudA* y *htrA* junto a otros genes de virulencia en pacientes dispépticos con indicación de endoscopia digestiva alta. La naturaleza de la proteína NudA se evaluó mediante análisis bioinformáticos. Los genes *cagA*, *vacAs1b*, *vacAm1*, *nudA* y *htrA* fueron predominantes en lesiones precancerosas y los genes *vacAs2* y *vacAm2* tuvieron mayor presencia en lesiones leves. Los análisis bioinformáticos de NudA indican que es una enzima que remueve el pirofosfato del extremo 5' de ARN trifosforilado, lo cual sugiere que no actúa como invasina.

Es la primera vez que se detecta *nudA* y *htrA* en biopsias gástricas chilenas, ambos con un alto porcentaje de detección. Sin bien NudA no correspondería a una invasina, su gen se detecta principalmente en lesiones precancerosas. Es necesario el desarrollo de nuevos estudios para continuar determinando el mecanismo por el cual *H. pylori* es capaz de ingresar a las células.

ABSTRACT

The 50% of the world population is infected by *Helicobacter pylori*, able to colonize and cause gastric pathologies through a genetic pool. There are two genes that would be involved with the inter- and intra-cellular capacity of *H. pylori*: *htrA* and *nudA*. The function of *htrA* is known, but that of *nudA* is not completely elucidated. Until today, the association of these genes with gastric damage is unknown, so it is necessary to know their prevalence in symptomatic individuals positive for *H. pylori*, and to determine the potential function of invasin NudA. Using PCR, the *nudA* and *htrA* genes were detected together with other virulence genes in dyspeptic patients with indication of upper digestive endoscopy. The nature of the NudA protein was evaluated by bioinformatic analysis. The genes *cagA*, *vacAs1b*, *vacAm1*, *nudA* and *htrA* were predominant in precancerous lesions and the *vacAs2* and *vacAm2* genes had greater presence in mild lesions. Bioinformatic analyzes of NudA indicate that it is an enzyme that removes pyrophosphate from the 5'-end of triphosphorylated RNA, which suggests that it does not act as invasin.

This is the first time that *nudA* and *htrA* are detected in Chilean gastric biopsies, both with a high percentage of detection. Even though NudA would not correspond to an invasin, its gene is detected mainly in precancerous lesions. The development of new studies is necessary to continue determining the mechanism by which *H. pylori* is able to enter the cells.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- Generalidades sobre *Helicobacter pylori*

La microbiota del sistema gastrointestinal representa un ecosistema complejo compuesto por bacterias, arqueas, virus, hongos filamentosos y levaduras (Breitbart *et al.*, 2003; Zilberstein *et al.*, 2007; Sekirov *et al.*, 2010; Flint *et al.*, 2012). La comunidad bacteriana que compone este sistema gastrointestinal es altamente diversa, habiendo informes que indican la existencia de más de 1000 especies bacterianas (Rajilic-Stojanovic *et al.*, 2007), siendo el tracto gastrointestinal donde se encuentra la mayor abundancia bacteriana, seguido por la cavidad oral, piel, vías aéreas y sistema urogenital (Peterson *et al.*, 2009). Durante mucho tiempo se creyó que el estómago humano era un lugar estéril debido al pH 2 encontrado en el jugo gástrico. No obstante, desde el inicio de siglo XX muchos autores observaron la presencia de una bacteria espiralada en el estómago, cambiando el paradigma de esterilidad del estómago. Pero no fue hasta el año 1983 en que se identificó esta bacteria como *Campylobacter pyloridis* (Warren & Marshall, 1983), conocida hoy en día como *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Desde ese momento hasta hoy en día, gracias al desarrollo de técnicas independientes de cultivo y herramientas moleculares para la identificación de especies, se ha logrado determinar que la microbiota humana

gástrica normal está compuesta por un gran conjunto de microorganismos bacterianos, correspondiendo a 13 filos bacterianos, siendo los predominantes Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Fusobacteria (Andersson *et al.*, 2008).

H. pylori, perteneciente al filo de proteobacteria, es una bacteria curvada Gram-negativa, microaerófila, capaz de colonizar la capa mucosa del epitelio gástrico de seres humanos. Sus dimensiones son de 2 a 4 μm de largo, con un diámetro de 0,1 a 1 μm ; posee entre dos a seis flagelos unipolares los cuales le otorgan la movilidad para desplazarse en el estómago. Es un patógeno altamente adaptado para vivir en el ambiente gástrico humano, se estima que coloniza con éxito alrededor del 50% de la población mundial actual (Eusebi *et al.*, 2014). La ruta de transmisión conocida más común es de persona a persona a través de contacto oral-oral y fecal-oral (Brown, 2000; Sampieri, 2013), siendo adquirida principalmente en la niñez (O’Ryan *et al.*, 2015) a través de la infección a nivel intrafamiliar (Didelot *et al.*, 2013; Osaki *et al.*, 2013; Urita *et al.*, 2013; Merino *et al.*, 2018).

Una vez infectada la persona a temprana edad, *H. pylori* coloniza el estómago y permanece normalmente toda la vida en el huésped, a menos que reciba el tratamiento adecuado para su erradicación (Lee *et al.*, 2008). Cuyo tratamiento de primera línea consiste en el uso de claritromicina, metronidazol o amoxicilina y un inhibidor de la bomba de protones (IBP); si este tratamiento fracasa se emplea el tratamiento de segunda línea o cuádruple terapia consistente en el

uso de un IBP, sales de bismuto y dos antibióticos (tetraciclina y metronidazol) (Malfertheiner *et al.*, 2017).

Después del fracaso del tratamiento de primera línea (basado en claritromicina) y del tratamiento de segunda línea (con régimen cuádruple que contiene bismuto), se recomienda utilizar un tratamiento que contenga fluoroquinolona. En regiones con una alta resistencia a las fluoroquinolonas, debe considerarse una combinación de bismuto con diferentes antibióticos o una terapia de rescate que contenga rifabutina (Malfertheiner *et al.*, 2017).

1.2.- *Helicobacter pylori* y su relación con el daño gástrico

De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer, cáncer se define como: “Un grupo de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento no controlado y diseminación de células anormales”. El origen de esta enfermedad puede estar dado por diversos factores de riesgo tanto externos como internos. Los factores externos corresponden a consumo de alcohol y tabaco, mala alimentación, sobrepeso/obesidad, inactividad física y la presencia de organismos infecciosos (Torre *et al.*, 2015). Por otro lado, los factores internos están condicionados por mutaciones heredadas, hormonas, condiciones inmunológicas y mutaciones que ocurren a partir del metabolismo (Soussi *et al.*, 1994; Figueiredo *et al.*, 2002). De acuerdo con datos estimados por la GLOBOCAN, durante el año 2018 ha habido 18.1 millones de personas diagnosticadas con cáncer y 9.6

millones de fallecidos debido a esta enfermedad a nivel mundial (Bray *et al.*, 2018).

Existen diversos tipos de cánceres, teniendo las mayores tasas de mortalidad el cáncer de pulmón, seguido por colorrectal, gástrico e hígado (Bray *et al.*, 2018).

A nivel mundial el cáncer de estómago es responsable de más de 1 millón de nuevos casos en 2018, y se estiman 783.000 muertes, siendo el quinto tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado y el tercero causante de muertes (Bray *et al.*, 2018).

Durante el año 2011, en Chile la mortalidad asociada a cáncer gástrico fue de 3.237 personas por año, lo que equivale a una tasa de mortalidad de 19/100.000 habitantes (Minsal, 2015; Csendes & Figueroa, 2017).

Durante las últimas décadas el porcentaje de mortalidad por cáncer gástrico ha disminuido en países desarrollados (Bertuccio *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2014; American Cancer Society, 2015). Sin embargo, esta tendencia se ha observado en una menor proporción en países en vías de desarrollo (American Cancer Society, 2015; Bertuccio *et al.*, 2009). Una de las causas de estas diferencias está dada por factores socioeconómicos, mejores condiciones de control de la infección de *H. pylori* y otros factores de riesgos como consumo de alimentos altos en sal y cigarrillo que potencian el desarrollo de cáncer gástrico. Diversos estudios han mostrado que entre un 59 a 63% de la incidencia de cáncer gástrico se le atribuye a la presencia de *H. pylori*, siendo la infección crónica de

este microorganismo el mayor factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de estómago (Parkin *et al.*, 2002; Rollán *et al.*, 2006).

H. pylori se adquiere generalmente en la infancia, y cuando el individuo ya es adulto la infección causa inflamación leve de la mucosa gástrica, la cual puede avanzar a gastritis crónica, la que a su vez puede progresar a gastritis crónica atrófica, la cual involucra la pérdida de la función de las células parietales encargadas de la secreción del ácido clorhídrico. Posterior a la etapa de gastritis crónica atrófica, el daño avanza a metaplasia intestinal, displasia y finalmente cáncer gástrico. Este aumento de daño histopatológico hacia la carcinogénesis se conoce como la cascada precancerosa (Correa & Houghton, 2007; Correa & Piazuelo, 2011).

En la mayor parte de los casos la infección causa gastritis leve, sin embargo, en aproximadamente el 10 % de la población infectada desarrolla patologías como úlcera péptica, entre 1-3% progresa a cáncer gástrico (Cirak *et al.*, 2007) y 0,1 % desarrolla linfoma de tejido asociado a mucosa (linfoma de MALT) (Noto & Peek, 2012). Por este motivo la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer la ha catalogado a *H. pylori* como carcinogénico clase I (IARC, 1994), siendo la única bacteria a la cual se le ha dado esta característica.

El curso clínico de la infección por *H. pylori* es muy variable y está influenciado por factores microbianos y del huésped. Los pacientes que presentan predominantemente gastritis de antro (la forma más común de gastritis por *H. pylori*) y una mayor producción de ácido están predispuestos a la formación de

úlceras duodenales. Por otro lado, pacientes con gastritis predominantemente de cuerpo y atrofia multifocal, y una menor producción de ácido, tienen más probabilidades de generar úlceras y atrofia gástrica iniciando una secuencia de eventos que conducen metaplasia intestinal y en última instancia adenocarcinoma gástrico (Suerbaum & Michetti, 2002) (Figura 1.1).

El desarrollo de estas patologías está sujeta a factores intrínsecos del huésped, ambientales y genéticos de *H. pylori*. Esta bacteria utiliza varios factores de virulencia que le permiten sobrevivir en el ambiente ácido del estómago, colonizar las células epiteliales gástricas y desencadenar una serie de procesos que llevan a la generación de una respuesta inflamatoria y eventualmente al daño de las células gástricas a través de la activación de numerosas vías de señalización (Rassow & Meinecke, 2012; Amieva *et al.*, 2003).

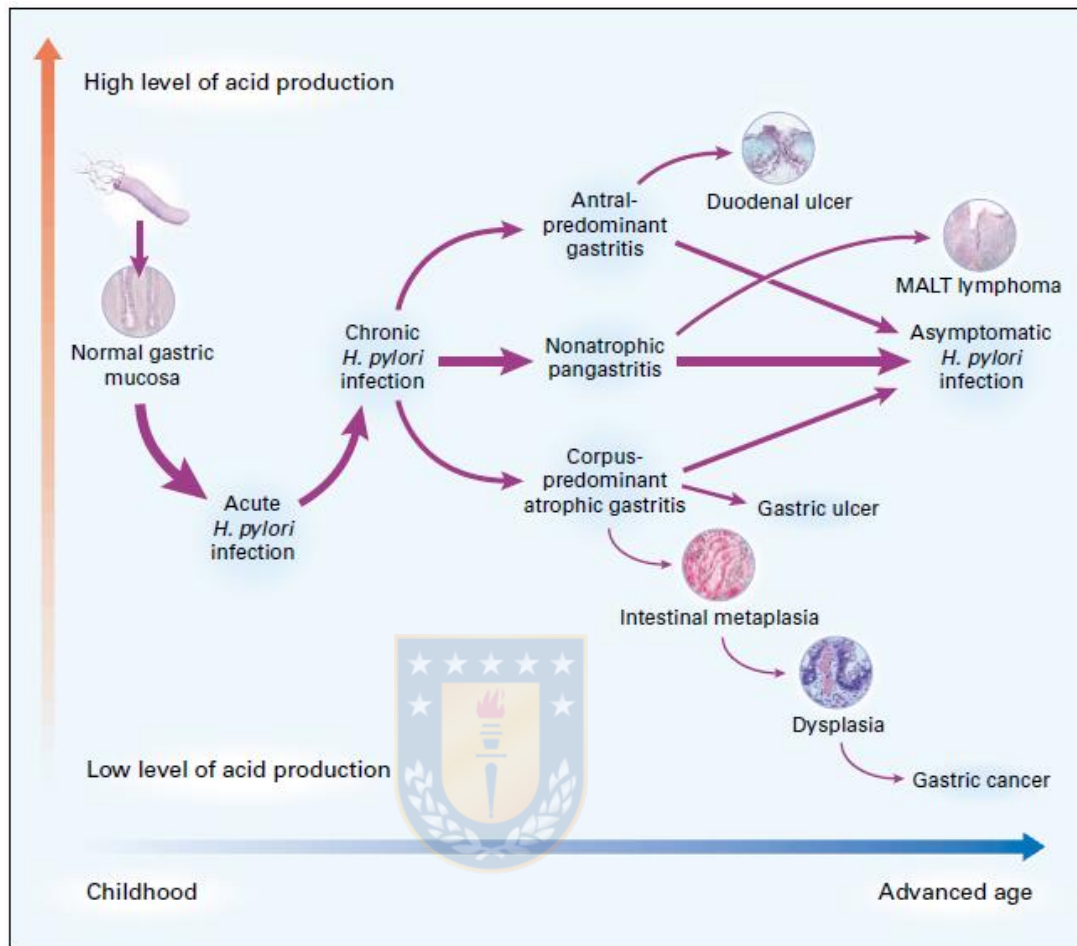


Figura 1.1. Progreso de la infección por *Helicobacter pylori*. Fuente: Suerbaum & Michetti, 2002.

1.3.- Mecanismos moleculares de patogénesis de *Helicobacter pylori*

Se ha descrito que *H. pylori* se encuentra de distintas maneras en el estómago, como vida libre en el lumen gástrico, adherido a las células epiteliales gástricas o entre las conexiones de estas células y en el citoplasma o vacuolas de las células epiteliales gástricas (Amieva *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2010; Wang *et al.*,

2016). Esta bacteria, cuenta con diversos mecanismos moleculares que le permiten llegar a cada una de estas localidades.

1.3.1.- Ureasa

H. pylori cuenta con un gran pool genético que le proporciona las herramientas para colonizar y causar patologías en el epitelio gástrico humano. La primera tarea que debe resolver *H. pylori* al momento de llegar al estómago, es mantenerse viable a pesar del pH ácido. El lumen gástrico tiene alrededor de un pH de 2 y va aumentando a medida que se acerca a la mucosa gástrica, llegando a un pH de 4,5 a 6,5 en esta zona, el hábitat de *H. pylori*.

Esta bacteria es altamente capaz de neutralizar la acidez del lumen gástrico, a través de la enzima ureasa (Ansari & Yamaoka, 2017). Esta enzima convierte la urea del huésped presente en el estómago en amonio y dióxido de carbono, la liberación del primero reacciona con el ácido clorhídrico, neutralizándolo, y se genera un ambiente de pH neutro alrededor de la bacteria, permitiéndole vivir en ambiente gástrico (Keilberg & Ottemann, 2016).

1.3.2.- Adhesinas

Para establecerse en las células epiteliales, *H. pylori* debe ser capaz de adherirse a las células blanco, este proceso lo realiza a través de distintas adhesinas, dentro de las cuales están las proteínas de membrana externa. Estas proteínas son altamente abundantes en número siendo aproximadamente 64 de ellas, destinando el 4% de su genoma a estas proteínas (Alm *et al.*, 2000). Se cree que el amplio número es el reflejo de la adaptación a un medio tan particular como el ambiente gástrico (Alm *et al.*, 2000). Las proteínas de membrana externa están compuestas por cinco familias, siendo sólo 3 de ellas las encargadas de la adherencia. La familia 1 está compuesta por las proteínas Hop y Hor. La familia 2 y 3 están compuestas por las proteínas Hof y Hom, respectivamente. Entre estas tres familias se cuentan con 43 proteínas de membrana externas dentro de las cuales hay porinas y adhesinas (Alm *et al.*, 2000). La adhesina mejor caracterizada de *H. pylori* es la proteína de adhesión a los antígenos de Lewis B, BabA o también llamada HopS, la cual interactúa con la célula epitelial a través de los antígenos de Lewis B fucosilados que forman parte del glicocálix de la membrana del epitelio gástrico (Yamaoka *et al.*, 2008, Kaladi *et al.*, 2014). Fujimoto *et al.*, (2007) determinaron que la presencia de un alelo denominado *babA2* se correlacionaba con desórdenes gastroduodenales como úlcera duodenal, lesiones premalignas, metaplasia intestinal y cáncer gástrico. La segunda adhesina mejor caracterizada

corresponde a la adhesina de unión a ácido siálico, SabA o HopP. Cuando *H. pylori* induce gastritis, neutrófilos y monocitos ingresan a la mucosa gástrica y la adhesina SabA de *H. pylori* no opsonizado se une específicamente a neutrófilos a través de carbohidratos sializados; como resultado el neutrófilo estimulado produce especies reactivas de oxígeno causando daño oxidativo al epitelio gástrico (Unemo *et al.*, 2005). Se ha sugerido que la expresión del gen *sabA* está regulado por los cambios en la secreción del ácido gástrico, ya que se ha visto que el ARN mensajero de *sabA* y los niveles de SabA disminuyen bajo condiciones ácidas (Merrell *et al.*, 2003; Yamaoka *et al.*, 2006). En cepas occidentales, la presencia de SabA se ha asociado con cáncer gástrico, metaplasia intestinal y atrofia del cuerpo gástrico (Yamaoka *et al.*, 2002). Sin embargo, esto no se ha observado en cepas asiáticas (Sheu *et al.*, 2006). Otras proteínas de membrana externa tales como AlpA, AlpB, OipA, HopZ y HomB también han sido asociadas en la adherencia y colonización gástrica de *H. pylori* (Dossumbekova *et al.*, 2006, Oleastro *et al.*, 2008, Kalali *et al.*, 2014; Roesler *et al.*, 2014).

1.3.3.- VacA

Una vez establecida la conexión *H. pylori*-huésped, esta bacteria es capaz de producir proteínas que son los principales factores de virulencia, una de éstas es la toxina vacuolizante A (VacA). VacA es una toxina formadora de poros, que desencadena la vacuolización celular y la apoptosis de la célula afectada (Rassow & Meinecke, 2012). Esta toxina es secretada por *H. pylori* utilizando el sistema de secreción autotransportador tipo V (Rassow & Meinecke, 2012). Tiene un tamaño molecular de 88 kDa, compuesta por las subunidades p33 y p55. La subunidad p33 (N-terminal, 33 kDa) forma un canal interno para el transporte de cloruros, mientras que la subunidad p55 (C-terminal, 55 kDa) es indispensable para la unión de VacA a las células huésped (Boquet & Ricci, 2012).

Una vez que se ha producido la interacción entre la parte externa de la membrana celular y VacA, esta proteína es ingresada a través de endocitosis, se interna en la membrana plasmática de la célula y forma canales por los cuales ingresa el ion cloruro (Rassow & Meinecke, 2012). Al ingresar el ion cloruro junto con agua del medio externo, aumenta el volumen de los endosomas dando lugar a vacuolas en la célula huésped. VacA también es capaz de formar poros en la membrana interna de las mitocondrias de las células, llevando a una disminución del ATP celular, liberación del citocromo C, y la posterior apoptosis de las células epiteliales gástricas (Galmiche *et al.*,

2000; Willhite *et al.*, 2003; Rassow & Meinecke, 2012). Además, se ha visto que VacA puede interrumpir las conexiones estrechas de las células epiteliales y obstruir la activación y proliferación de linfocitos T en la lámina propia. Interrumpir la autofagia es otro mecanismo por el cual VacA induce inflamación gástrica y contribuye a la carcinogénesis gástrica (Palframan *et al.*, 2012; Raju *et al.*, 2012).

A pesar que VacA está presente en todas las cepas de *H. pylori* descritas, existen diferencias entre los alelos de cada uno, mostrando diferencias en tres regiones principales: la región de señal (s) que contiene los alelos s1 (s1a, s1b y s1c) o s2, la región intermedia (i) que contiene los alelos i1 o i2 y la región media (m) que contiene los alelos m1 o m2 (m2a y m2b) (Rhead *et al.*, 2007). Se pueden producir diferentes combinaciones de alelos *vacA* s, i y m, lo que da como resultado toxinas VacA con capacidades distintas para inducir la vacuolización en las células epiteliales (Roesler *et al.*, 2014). Se ha demostrado que las cepas *vacA* s1/m1 inducen la formación de vacuolas a diferencia de las cepas *vacA* s2/m2. Por otro lado, las cepas *vacA* s1/m2 pueden inducir o no vacuolización según el genotipo de la región i, siendo las que contienen el alelo i1 las vacuolizadoras a diferencia de las cepas que poseen el alelo i2 (Rhead *et al.*, 2007; Roesler *et al.*, 2014; Pinto-Ribeiro *et al.*, 2016).

Diversos estudios han demostrado que cepas *H. pylori vacA* s1 y m1 se asocian con un aumento de la inflamación de la mucosa gástrica y con un mayor riesgo de úlcera, atrofia gástrica, metaplasia intestinal y carcinoma en comparación

con las cepas *vacA* s2 y m2 (Miehlke *et al.*, 2000; Rhead *et al.*, 2007; Basso *et al.*, 2008, Roesler *et al.*, 2014; Bagheri *et al.*, 2016; Israel & Peek, 2018).

1.3.4.- CagA

Otro factor de virulencia altamente importante es la proteína CagA junto con la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*), el cual se encuentra presente entre el 50 a 70% de los aislados de *H. pylori* (Peek & Crabtree, 2006). La isla de patogenicidad *cag* posee aproximadamente 40 kb y está compuesto de 27 a 31 genes, los cuales codifican para la proteína CagA (Gen A asociado a la Citotoxina) y un conjunto de proteínas que forman el sistema de secreción tipo IV (SST4), el cual permite transferir proteínas y ADN al citoplasma de la célula huésped (Müller, 2012).

Se ha determinado que la formación del SST4 durante la infección de células polarizadas ocurre predominantemente en las membranas basolaterales y no en los sitios apicales. *H. pylori* logra esto al secretar una serina proteasa, HtrA, que escinde las uniones célula-célula, clivando las proteínas de unión epitelial: ocludina, claudina-8 y E-cadherina (Schmidt *et al.*, 2016; Tegtmeyer *et al.*, 2017). Una vez perdida las uniones célula-células a través de la actividad de HtrA, *H. pylori* puede transmigrar paracelularmente a través células epiteliales polarizadas y así llegar a las membranas basolaterales. Se ha demostrado que al llegar *H. pylori* a los sitios basolaterales, las proteínas del pilus del SST4

interactúan directamente con el ectodominio de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y la integrina β -1 de la célula huésped, activando el SST4 y dando como resultado la translocación de la oncoproteína CagA a las células huésped (Van Nhieu *et al.*, 2009; Tegtmeyer *et al.*, 2017).

Una vez que *H. pylori* es capaz de ingresar la proteína CagA en las células epiteliales gástricas (Backert *et al.*, 2000), ésta es fosforilada y dependiendo del estado de fosforilación es capaz de interactuar con diferentes componentes celulares. CagA fosforilada conduce a la elongación celular como los cambios morfológicos descritos como fenotipo colibrí (o de pájaro carpintero), esto debido a que produce la activación de un oncogén que desencadena alteraciones en las uniones de adherencia celular y altera la integridad de la célula (Amieva *et al.*, 2003). CagA no fosforilado interactúa con proteínas que desencadenan vías de señalización que afectan en procesos tales como respuestas inflamatorias, proliferación celular, polaridad y uniones entre célula-célula (Murata-Kamiya *et al.*, 2007; Saadat *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2009).

1.4.- *Helicobacter pylori* inter e intracelular

Los pacientes a los cuales se le ha diagnosticado la presencia de la bacteria *H. pylori* son sometidos a la terapia convencional para su erradicación, que en primera instancia consiste en la utilización de dos antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones (Malfertheiner *et al.*, 2017). Sin embargo, en algunas

ocasiones la efectividad de esta terapia falla, existiendo persistencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica. Puede ser que una de las causas además de la resistencia a antibiótico sea debido a que *H. pylori* es capaz de ingresar entre las uniones estrechas de las células epiteliales gástricas (Wang *et al.*, 2016). Estas observaciones ya se publicaron en los años 1984 (Shousha *et al.*, 1984), 1986 (Buck *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1986) y 1987 (Tricottet *et al.*, 1986) en pacientes con gastritis y úlceras, en donde se observaban “organismos tipo *Campylobacter*” que invadían los espacios intercelulares. A partir del año 1990, la investigación de la naturaleza invasiva de *H. pylori* da un nuevo giro, en donde por diversos estudios se confirmó la capacidad invasiva de esta bacteria en células del epitelio gástrico en pacientes con gastritis, úlcera péptica, lesiones precancerosas y cáncer gástrico (Wyle *et al.*, 1990; Noach *et al.*, 1994; El-Shoura, 1995; Papadogiannakis *et al.*, 2000; Semino-Mora *et al.*, 2003). Años posteriores, Amieva *et al.* (2002), determinaron que *H. pylori* es capaz de ingresar en diversas líneas celulares de células epiteliales tales como AGS de adenocarcinoma gástrico, Caco-2 de adenocarcinoma de colon y MDCK de riñón, en los cuales tenían la capacidad de ingresar a vacuolas citoplasmáticas, donde permanecieron viables, móviles y capaces de sobrevivir a altas concentraciones de gentamicina extracelular. La repoblación hacia el medio extracelular de *H. pylori* (intracelular), es paralela a la desaparición de bacterias al interior de las vacuolas, sugiriendo una liberación del nicho intravacuolar. Este estudio también determinó que las proteínas VacA y CagA no son

necesarias para que *H. pylori* mutado pueda entrar y sobrevivir dentro del nicho intravacuolar (Amieva *et al.*, 2002). Posteriormente, durante el año 2003 (Semino-Mora *et al.*, 2003) y el 2007 (Necchi *et al.*, 2007), se confirmaba que *H. pylori* era una bacteria intracelular viable, ya que se observó que era capaz de expresar ARN mensajero y producir antígenos, junto con la preservación de la ultraestructura de la bacteria. Hoy en día, se tiene conocimiento de que la capacidad invasiva de esta bacteria no sólo se limita a células del epitelio gástrico (Chu *et al.*, 2010), sino que también a macrófagos (Wang *et al.*, 2009), células dendríticas (Wang *et al.*, 2010) y en otras células eucariontes tal como las levaduras, específicamente miembros del género *Candida* (Siavoshi *et al.*, 2005; Saniee *et al.*, 2013a; Saniee *et al.*, 2013b; Siavoshi *et al.*, 2013; Siavoshi & Saniee, 2014; Saniee & Siavoshi, 2015, Siavoshi *et al.*, 2018).

Estudios de *H. pylori* intra-levadura, se iniciaron en el año 1998 cuando por microscopía óptica se detectó la presencia de “cuerpos tipo bacteria” en movimiento dentro de vacuolas de *Candida* gástrica (Siavoshi *et al.*, 1998). En este estudio, se detectó por PCR que correspondían a bacterias de la especie *H. pylori* y al tratar las levaduras a altas temperaturas, disecación, pH ácido y biocida, tanto *Candida* como *H. pylori* intracelular continuaban viables (esta última mostrando movimiento activo), a diferencia de la cepa control de *H. pylori* el cual fue inactivado por estas condiciones de estrés. A partir de entonces, se han generado estudios en donde se han logrado aislar levaduras de la especie *Candida albicans* de distintos orígenes corporales y que dentro de sus vacuolas

está alojada *H. pylori* activa no-cultivable (Siavoshi *et al.*, 2005; Salmanian *et al.*, 2008; Siavoshi *et al.*, 2013; Saniee *et al.*, 2013a; Saniee *et al.*, 2013b; Saniee & Siavoshi, 2015; Siavoshi *et al.*, 2018).

1.4.1.- Proteasas HtrA

Las proteínas que requieren altas temperaturas A (HtrA) son una familia de proteínas compuestas por chaperonas y serina proteasas ampliamente diversificada tanto en eucariontes como procariontes (Page & Di Cera, 2008), cumpliendo importantes funciones de control de calidad de otras proteínas. Las proteínas HtrA contienen un péptido señal amino-terminal, seguido de un módulo de serina proteasa similar a la tripsina y uno o dos dominios PDZ para permitir las interacciones proteína-proteína (Backert *et al.*, 2013). Los dominios PDZ son módulos de proteínas que median interacciones proteína-proteína y se unen preferentemente a los extremos 3 y 4 C-terminales de la proteína diana. Las proteínas HtrA bacterianas mejor caracterizadas pertenecen a *E. coli*, cuyo genoma codifica tres miembros de HtrA: DegP, DegQ y DegS. DegP está ampliamente caracterizada como una chaperona proteasa independiente de ATP, cuya función principal es degradar proteínas mal plegadas en péptidos más pequeños en el espacio periplásmico (Tegtmeyer *et al.*, 2016). Además de esta actividad proteolítica, se ha determinado que DegP presenta actividad chaperona a bajas temperaturas, a diferencia de su actividad proteolítica que

aumenta a temperaturas de 42°C; por otro lado, DegS es una proteasa reguladora que procesa el factor anti-sigma RseA (Tegtmeyer *et al.*, 2016). DegQ funciona como una proteína y chaperona relacionada con el pH, que participa en el control de la calidad de las proteínas, teniendo un rol importante en condiciones de estrés ácido (Sawa *et al.*, 2011).

Se ha descrito que las proteínas DegP/HtrA participarían en la patogenicidad de *S. typhimurium*, *Y. enterocolitica* y *S. flexneri*, específicamente en la capacidad de ingresar en las células huésped (Raivio, 2005). De igual manera en *Bartonella henselae*, donde la sobreexpresión de *degP/htrA* ha demostrado estar ligado al aumento con la transición de un entorno extra a intracelular (Resto-Ruiz *et al.*, 2000). Por otro lado, se han registrado que mutantes de *htrA* de *Campylobacter jejuni* son incapaces de ingresar a una línea celular de intestino, a diferencia de la cepa nativa (Boehm *et al.*, 2015), apoyando resultados previos en que HtrA estaría involucrada en la adhesión de *C. jejuni* e invasión de las células epiteliales de intestino (Bæk *et al.*, 2011).

La proteasa HtrA de *H. pylori*, ha sido descrita como un factor de virulencia que es secretado al espacio extracelular (Tegtmeyer *et al.*, 2017) la cual cliva el ectodominio de la proteína E-cadherina de adhesión celular. E-cadherina es una proteína de superficie celular en mamíferos que es esencial para adhesión celular y supresión de tumores, siendo la liberación proteolítica del ectodominio de E-cadherina un marcador importante de pronóstico de cáncer gástrico (Chan, 2006). El desprendimiento de E-cadherina interrumpe las funciones de la

barrera epitelial, permitiendo que *H. pylori* pueda acceder al espacio intercelular, específicamente en las uniones de las membranas basolaterales de las células.

Se ha determinado que *htrA* está codificada en un operón altamente conservado en muestras clínicas mundiales, confirmándose la presencia del gen *htrA* en 992 muestras correspondientes a aislados de *H. pylori* y biopsias gástricas de pacientes infectados, provenientes de Alemania, Singapur, Japón, Estados Unidos, México y Colombia (Tegtmeyer *et al.*, 2016). Estas muestras contienen el gen *htrA* cuyo tamaño es de 1.428 pb, y cuyas secuencias de proteínas se encuentran altamente conservadas en el dominio péptido señal, módulo de proteasa y los dos dominios PDZ.

Se ha observado que la eliminación del gen *htrA* en *C. jejuni* conduce a un defecto en el desprendimiento de E-cadherina y al deterioro de la trans migración de las bacterias a través de monocapas de células epiteliales polarizadas *in vitro* (Boehm *et al.*, 2012).

De igual manera, HtrA es crucial para el clivaje de E-cadherina de los patógenos *S. Typhimurium*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* enteropatogénica y *P. mirabilis* (Backert *et al.*, 2018).

Este mecanismo explica cómo *H. pylori* altera la barrera epitelial, paso importante en la patogénesis bacteriana, determinando que el gen *htrA* es un gen bifuncional con funciones intracelulares y extracelulares cruciales.

1.4.2.- NudA

Posterior a los descubrimientos de *H. pylori* intracelular, surge la duda respecto a qué mecanismo molecular no descrito es el causante de darle la capacidad a esta bacteria de ser intracelular facultativa y favorecer la persistencia en el epitelio gástrico.

En bacterias como *Yersinia enterocolitica* se ha visto una proteína relacionada con la invasión, el gen *invA* y la proteína InvA, permite la entrada de esta bacteria a las células intestinales M (Isberg *et al.*, 2000). Se ha encontrado la secuencia homóloga del gen *invA* y la proteína InvA en la cepa *H. pylori* J99 y en la cepa *H. pylori* 26695, la cual lleva por nombre *nudA*. De igual forma también se ha encontrado el homólogo en el genoma de la cepa *H. pylori* HPAG1 (Oh *et al.*, 2006). Esta proteína recibe el nombre de NudA debido a que corresponde a una hidrolasa Nudix. Las enzimas de esta familia catalizan la hidrólisis de Nucleósidos Difosfatos ligados a otros motivos X (sigla: Nudix) y contienen en común una secuencia motivo o caja nudix: "GX5EX7REUXEEXGU". Donde X es cualquier residuo de aminoácido y U es un residuo hidrofóbico voluminoso (Mildvan *et al.*, 2005).

Se ha descrito que la proteína NudA de *H. pylori* J99 pertenece a un subgrupo de hidrolasa nucleósido polifosfato que hidroliza diadenosina tetrafosfato con el resultado de la escisión de la molécula asimétrica en ATP y AMP (Lundin *et al.*, 2003). Los análisis de secuencia de los genomas sugieren que sólo existe una

secuencia homóloga a la proteína NudA, siendo la única hidrolasa nucleósido polifosfato en el genoma de *H. pylori* (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). Se ha determinado que la escisión de este gen en cepas mutantes produce una disminución de la capacidad invasiva de *H. pylori* sobre la línea celular AGS (Liu *et al.*, 2012).

Si bien los resultados de Liu y colaboradores (2012) parecen ser prometedores respecto a la determinación del gen involucrado en la capacidad invasiva de *H. pylori*, es necesario adquirir más información respecto esta proteína. Un modelo de ésta nos ayudaría a comprender en la funcionalidad y mecanismo por el cual *H. pylori* es capaz de ingresar a células eucariontes, y si esta proteína es funcionalmente similar a las descritas por otras proteínas de naturaleza invasiva como *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella typhimurium*.

1.5.- Genotipificación de *Helicobacter pylori* y daño gástrico

Mediante análisis moleculares es posible determinar que ciertos genes de virulencia de *H. pylori* están relacionados con patologías gástricas. Salimzadeh *et al.* (2015) detectaron relaciones significativas entre *cagA*, *vacA* y *oipA* con el desarrollo de gastritis crónica.

Por otro lado, en estudios realizados por Melo-Narváez *et al.* (2018), determinaron que dentro de un número de 124 cepas de *H. pylori*, el 32,3% fue

vacA s1/m1/i1-cagA positivo, presentes mayormente en pacientes con gastritis folicular, gastritis crónica y posible metaplasia. Encontrando también una asociación significativa entre la presencia de *cagA* con el genotipo *vacA s1/m1/i1* y la ausencia de *cagA* con el genotipo *vacA s2/m2/i2*.

En pacientes dispépticos, el genotipo *vacA* más común fue *s1b/m2*, seguido de *s1a/m1* y en las muestras positivas para *cagA*, éstas estaban fuertemente relacionadas con *vacA s1a/m1* (Ahmad *et al.*, 2009).

Por otro lado, se ha encontrado una asociación significativa entre metaplasia intestinal y los genotipos *vacA s1* y *m1* en pacientes mayores de 50 años, a diferencia de individuos más jóvenes. Este genotipo también está asociado al cáncer gástrico (Alaoui Boukhri *et al.*, 2013).

En el ámbito nacional durante el 2006 (García *et al.*, 2006), se detectó la presencia de los genes *vacAs1a* y *vacAm2*, con mayor porcentaje en relación con el resto de los genotipos del gen *vacA* en un universo de 66 aislados, y con una moderada presencia del gen *cagA* (16 aislados, 24,2%). En esta oportunidad cinco aislados mostraron un perfil ulcerogénico, *cagA* y *vacs1m1* positivo. Por otro lado, análisis de detección de *cagA* desde muestras de pacientes del año 2008-2009 (Paredes-Osses *et al.*, 2017), determinaron un 15,2% de presencia en un total de 132 pacientes. No asociándose la presencia de este gen con daño gástrico.

Actualmente parece estar claro el efecto de genes de virulencia como *cagA* y *vacA* sobre el daño en el epitelio gástrico; sin embargo, no se ha establecido una relación entre genes asociados con las características invasivas de *H. pylori* sobre ciertas patologías gástricas. Es por esto que evaluar estos dos nuevos genes no estudiados en la población chilena nos permitirían determinar su relación con el daño gástrico, su relación con otros genes de virulencia de *H. pylori* y prevalencia actual en la población infectada con este microorganismo. Por otro lado, es necesario determinar el mecanismo por el cual *H. pylori* es capaz de ingresar a células eucariontes como células epiteliales y levaduras. Con el fin de que la información generada sirva de precedente para el desarrollo de futuras alternativas que eviten la persistencia de *H. pylori* y su potencial propagación a través de levaduras altamente difundida en el cuerpo humano.

La presente tesis evaluó la asociación de diversos genes de virulencia que están presentes en las cepas clínicas en circulación dentro de la población de la Región del Biobío infectada por *H. pylori* y determinar la importancia de la proteína NudA sobre la capacidad invasiva de esta bacteria.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

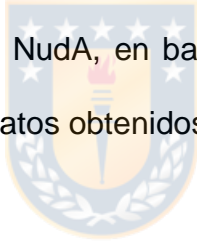
- 1.- Los genes *htrA* y *nudA* están relacionados con la severidad del daño gástrico en pacientes infectados por *H. pylori* y con indicación de endoscopia digestiva alta.
- 2.- El estudio del modelo estructural de la proteína NudA, deducida *in silico*, permite predecir su función potencial.



OBJETIVOS

Objetivos Generales:

- 1.- Determinar la relación entre diagnósticos histopatológicos con los factores de virulencia de *H. pylori* y la presencia de genes *nudA* y *htrA*, en biopsias gástricas de pacientes sintomáticos con indicación de endoscopía digestiva alta en la Comuna de Concepción, Región del Biobío.
- 2.- Determinar la función de NudA, en base a un modelo bioinformático de la misma, consistente con los datos obtenidos *in silico* a partir de su secuencia.



Objetivos específicos:

1. Detectar mediante técnica molecular los genes involucrados en la capacidad invasiva de *H. pylori*, *nudA* y *htrA*, desde biopsias gástricas obtenidas desde pacientes con diverso daño gástrico.
2. Detectar mediante técnica molecular los genes de virulencia *cagA* y *vacA*, incluido los alelos de este último, desde biopsias gástricas obtenidas desde pacientes con diverso daño gástrico.

3. Determinar las correlaciones entre los genes de virulencia detectados con los diagnósticos histopatológicos de muestras gástricas.
4. Obtener un modelo *in silico* de la proteína NudA y en base a su estructura proponer su función.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Perfil de los pacientes

Las muestras de biopsias gástricas se obtuvieron desde pacientes adultos (entre 18 a 88 años), con una edad promedio de 51,3 años y media de 54 años, 91 pacientes fueron mujeres y 55 hombres. Todos estos pacientes tenían indicación médica de endoscopia digestiva alta, y fueron atendidos en el centro de salud Inmunomédica ubicado en Concepción, Región del Biobío, durante los meses de abril a diciembre del año 2016. Los pacientes que accedieron a participar del estudio firmaron voluntariamente el documento de consentimiento informado (Anexo 1) aceptado por el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción.

2.2.- Toma de muestras gástricas

Las muestras de biopsias gástricas fueron obtenidas por el médico Rolando Burgos Muñoz, gastroenterólogo director de la Unidad de Gastroenterología de Inmunomédica, utilizando un video endoscopio de canal simple modelo Olympus GIF-V (2,8mm channel) con pinzas para biopsias FB 55 V-1 o FB-53-1 (2,8 mm channel). Los pacientes fueron previamente inyectados por vía

intravenosa con Midazolán y realizaron gárgaras con Dimecaína al 10 % durante tres minutos. Se recolectaron 2 biopsias de antro y 2 de cuerpo.

Las muestras fueron trasladadas en suero fisiológico al Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción. En el caso de las muestras de biopsias para extracción de ADN, éstas se mantuvieron a una temperatura de -20° C hasta ser procesadas.

Con la asesoría de un patólogo clínico (Dr. Ramón Gutiérrez, Bioclas, Concepción) se realizaron clasificaciones de la severidad de la patología gástrica de acuerdo con criterios establecidos en conjunto con el fin de realizar los análisis estadísticos. Estas clasificaciones fueron:

- 1.- Cuatro categorías: Edema, gastritis leve, gastritis crónica (no atrófica y atrófica) y metaplasia intestinal (incompleta y completa).
- 2.- Tres categorías: Edema, gastritis leve-gastritis crónica no atrófica y gastritis crónica atrófica-metaplasia intestinal.
- 3.- Dos categorías: Patologías no severas (edema, gastritis leve, gastritis crónica no atrófica) y severas (gastritis crónica atrófica-metaplasia intestinal).

2.3.- Extracción de ADN desde biopsias gástricas

Se extrajo el ADN de las biopsias gástricas de pacientes con indicación médica de endoscopia digestiva alta, a través del kit E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega Bio-tek), según las indicaciones del proveedor. El ADN extraído fue cuantificado mediante el equipo Infinite 200 NanoQuant (Tecan) y se seleccionaron las muestras que cuenten con rango de absorbancia 260/280 entre 1,8 y 2,1. El ADN extraído se mantuvo a -20°C para el análisis molecular posterior.



2.4.- Extracción de ADN bacteriano

A partir de un cultivo puro de la bacteria *Escherichia coli* cepa 25922, se realizó extracción de ADN para ser utilizada como control negativo en los ensayos posteriores. De igual manera se realizó extracción de ADN para las cepas de referencia de *H. pylori* J99, 43504, G27, SS1. El protocolo para extracción de ADN se realizó con el kit UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio), según las indicaciones del proveedor. El ADN extraído fue cuantificado mediante el equipo Infinite 200 NanoQuant2 (Tecan) y se seleccionaron las muestras que cuenten con rango de absorbancia 260/280 entre 1,8 y 2,1. El ADN extraído se mantuvo a -20°C para el análisis molecular posterior.

2.5.- Análisis molecular por Reacción en Cadena de la Polimerasa

2.5.1.- Diseño de partidores gen *nudA*

A partir de la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) se descargaron las secuencias en formato fasta del gen NUDIX de las cepas de referencia J99, 26695, Aklavik117, Aklavik86, F16, G27, HPAG1, Lituania75, P12, PeCan18, PeCan4, Shi470, Shi169, SAT 464, SNT49 y v225d. Estas secuencias se ingresaron al programa Vector NTI Advance 10 (Invitrogen) y se realizó alineamiento de estas secuencias para obtener una secuencia consenso. Esta última fue ingresada al programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) para obtener el diseño de dos pares de partidores sentido y antisentido (Tabla 2.1). Esta estrategia se realizó con el fin de observar si existe alguna variación en los tamaños correspondientes de amplificación. Una vez obtenidos los partidores se verificó que son complementarios a secuencias conservadas en la secuencia consenso.

Posterior a su diseño, los partidores se analizaron para determinar si tienen capacidad de formar dímeros, para esto se utilizó el programa Vector NTI Advance 10 (Invitrogen) y se determinó que los partidores diseñados no posean un dG inferior a -3.0, para disminuir la probabilidad de formación de estas estructuras.

Para garantizar la especificidad de reconocimiento, se realizó una búsqueda por alineamiento local con BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a los partidores, con tal de determinar si las secuencias de los partidores son complementarias a secuencias de ADN de otros microorganismos.

Posterior al diseño y verificación *in silico* de su calidad, los partidores se enviaron a sintetizar a la empresa IDT, USA (<http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx>).

2.5.2.- Estandarización de partidores para gen *nudA*

2.5.2.1.- Gradiente de Temperatura de Alineamiento

Los partidores diseñados se estandarizaron probando distintas condiciones de temperatura de alineamiento, a través de gradiente de T_m en el termociclador Thermal cycler T960 (Heal Force Ltda). Las condiciones de amplificación consistieron en: denaturación inicial a 94°C por 1 minuto, 30 ciclos de denaturación a 98°C por 5 segundos, gradiente de temperatura de alineamiento de 50°C; 50,6°C; 51,4°C; 52,6°C; 54,2°C; 55,7°C; 56,9°C; 58,3°C; 59,8°C; 60,8°C; 61,5°C y 62,0°C por 5 segundos, y extensión a 72°C por 40 segundos. El mix de reacción consistió en 25 μ L finales de reacción con 12,5 μ L del mix SapphireAmp Fast PCR Master Mix (TAKARA BIO INC.), 1 μ L de los partidores sentido y antisentido a una concentración de 10 μ M cada uno, 1 μ L de templado de ADN y 9,5 μ L de agua grado PCR libre de nucleasas.

Para realizar las amplificaciones se utilizó ADN de *H. pylori* J99 y agua PCR libre de nucleasas para el control del blanco.

Este procedimiento se realizó para ambos pares de partidores diseñados: F1-R1 y F2-R2.

2.5.2.2.- Determinación de sensibilidad y especificidad

Se seleccionó la temperatura de alineamiento en que se generó una sola banda de amplificación en los tamaños correspondientes para ambos pares de partidores: 220 pares de bases (pb) para F1-R1 y 159 pb para F2-R2.

Para determinar la sensibilidad de los partidores, se probaron concentraciones de 95,5; 70; 50; 25; 10; 5; 0,5 y 0,05 ng/μl de ADN de la cepa *H. pylori* J99. Se amplificaron las muestras de acuerdo con las condiciones presentadas en la sección 2.5.2.1, con la temperatura de alineamiento seleccionada.

La especificidad de los partidores se determinó a través de la amplificación de diversas especies de microorganismos: *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus rhamnosus* LGG, *E. coli* 25922, *S. aureus* 25923, *C. albicans* 10231, una muestra de biopsia gástrica negativa y otra positiva para ARNr 16S *H. pylori* y las cepas SS1, 43504, J99, G27 de *H. pylori*. Se amplificaron las muestras de acuerdo con las condiciones presentadas en la sección 5.2.1, con la temperatura de alineamiento seleccionada.

Los resultados de las amplificaciones por PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa (Ultrapure™ agarose, Invitrogen) al 1,2% p/v junto con 1,8µL de GelRed (Biotium, EEUU). Las condiciones de la electroforesis fueron de 80V, 60mA por 80 minutos en fuente de poder (Nyx Technik Voltronyx) y se observó a través del sistema de fotodocumentación ENDURO GDS (Labnet International, Inc.). Se utilizó el marcador de peso molecular de 100pb (MaestroGen).

2.5.3.- Estandarización de partidores para gen *htrA*

2.5.3.1.- Gradiente de Temperatura de Alineamiento

Para verificar la presencia del gen *htrA*, se enviaron a sintetizar a IDT (EEUU) partidores obtenidos desde literatura (Tegtmeyer *et al.*, 2016). El par de partidores A y F amplifican el gen completo de *htrA*, con un tamaño de 1428 pb. El set de partidores C y D amplifican el dominio proteasa de *htrA*, con un fragmento de 573 pb (Tabla 2.1).

Los partidores se estandarizaron probando distintas condiciones de temperatura de alineamiento. El protocolo consistió de: denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos con denaturación a 94°C por 1 minuto, temperatura de alineamiento de 54; 54,5; 55,2; 56,2; 57,4; 58,6; 59,8; 60,9; 62,0; 63,0; 63,4; 64,0°C por 50 segundos y extensión a 72°C por 2 minutos, y posteriormente una elongación final a 72°C por 10 minutos.

El mix de reacción consistió en 25 μL finales de reacción con 12,5 μL del mix SapphireAmp Fast PCR Master Mix (TAKARA BIO INC, Japón), 1 μL de los partidores sentido y antisentido a una concentración de 10 μM cada uno, 1 μL de templado de ADN y 9,5 μL de agua grado PCR.

Como control positivo se utilizó ADN extraído de *H. pylori* J99 y agua PCR libre de nucleasa como control del blanco.

Los resultados de las amplificaciones por PCR, se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa (UltrapureTM agarose, Invitrogen) al 1,2% p/v junto con 1,8 μL de GelRed (Biotium, EEUU). Las condiciones de la electroforesis fueron de 80V, 60mA por 80 minutos en fuente de poder (Nyx Technik Voltronyx) y se observó a través del sistema de fotodocumentación ENDURO GDS (Labnet International, Inc.). Se utilizó el marcador de peso molecular de 1 Kb (MaestroGen).

2.5.3.2.- Determinación de sensibilidad y especificidad de los partidores

Se seleccionó la temperatura de alineamiento en que se generó una sola banda de amplificación en los tamaños correspondientes para ambos pares de partidores: 1.428 pb para A-F y 573 pb para C-D.

Para determinar la sensibilidad de los partidores, se probaron concentraciones de 750; 70; 50; 25; 10; 5; 0,5 y 0,05 ng/ μl de ADN de la cepa *H. pylori* J99. Se

amplificaron las muestras de acuerdo con las condiciones presentadas en la sección 5.2.1, con la temperatura de alineamiento seleccionada.

La especificidad de los partidores se determinó a través de la amplificación de diversas especies de microorganismos: *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus rhamnosus* LGG, *E. coli* 25922, *S. aureus* 25923, *C. albicans* 10231, una muestra de biopsia gástrica negativa y otra positiva para *ARNr 16S H. pylori* y las cepas SS1, 43504, J99, G27 de *H. pylori*.

Se amplificaron las muestras de acuerdo con las condiciones presentadas en la sección 2.5.3.1, con la temperatura de alineamiento seleccionada.



2.5.4.- Detección molecular de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas

Se realizó detección molecular de *H. pylori* desde las biopsias gástricas correspondiente a antro, amplificando el gen ARN ribosomal 16S (*ARNr 16S*) de *H. pylori* a través de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), según metodología estandarizada en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Se realizó un mix de 25 µL volumen final de reacción que contenía 12,5 µL del mix SapphireAmp Fast PCR Master Mix (TAKARA BIO INC, Japón), 1 µL de los partidores Hp1 y Hp2 a una concentración de 10 µM cada uno, 5 µL de templado de ADN y 5,5 µL de agua grado PCR. Las condiciones de amplificación correspondieron a las siguientes: denaturación inicial a 94°C por 1

minuto, 30 ciclos con denaturación a 98°C por 5 segundos, alineamiento a 53°C por 5 segundos y extensión a 72°C por 40 segundos.

Como control positivo se utilizó ADN extraído de *H. pylori* J99, control negativo la cepa *E. coli* 25922 y agua PCR libre de nucleasas para el control blanco.

2.5.5.- Perfil genético de genes de virulencia

A las muestras de biopsias que resultaron positivo para ARNr 16S de *H. pylori*, se les realizó la amplificación de los genes *cagA*, *vacAs1a*, *vacAs1b*, *vacAs2*, *vacAm1*, *vacAm2*, *nudA* y *htrA* a través de PCR, según metodología estandarizada en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. El mix de reacción consistió en 25 µL finales de reacción con 12,5µL de SapphireAmp Fast PCR Master Mix (TAKARA BIO INC, Japón), 1µL de los partidores sentido y antisentido a una concentración de 10µM cada uno, 5µL de templado de ADN y 5,5µL de agua grado PCR. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: denaturación inicial a 94°C por 1 minuto, 30 ciclos con denaturación a 98°C por 5 segundos, temperatura de alineamiento dependiendo de los partidores (Tabla 2.1) por 5 segundos y extensión a 72°C por 40 segundos. Las características de los partidores utilizados en los diversos PCR se muestran en la tabla 2.1.

Los resultados de las amplificaciones por PCR para detectar el gen ARNr 16S de *H. pylori* y genes de virulencia se observaron por electroforesis en gel de

agarosa (Ultrapure™ agarose, Invitrogen) al 1,2% p/v junto con 1,8µL de GelRed (Biotium, EEUU). Las condiciones de la electroforesis fueron de 80V, 60mA por 80 minutos en fuente de poder (Nyx Technik Voltronyx) y se observó a través del sistema de fotodocumentación ENDURO GDS (Labnet International, Inc.). Se utilizó el marcador de peso molecular de 100pb o 1kb (MaestroGen).

Tabla 2.1. Partidores utilizados para la detección de *H. pylori* y genes de virulencia mediante PCR.

Gen	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Amplicón (pb)	Referencia
<i>ARNr 16S</i>	F 5'- CTGGAGAGACTAAGCCCTCC -3' R 5'- ATTAAGTACGCTGATTGTGC -3'	55	109	Ho <i>et al.</i> , 1991
<i>cagA</i>	F 5'- GAT AACAGGCAAGCTTTTGAGG -3' R 5'- CTGCAAAGATTGTTTGCCAG A -3'	55	349	Shimoyama <i>et al.</i> , 1998
<i>vacA s1a</i>	F 5'- GTCAGC AT CACACCGCAA -3' R 5'- CTGCTTGAATGCGCCAAAC -3'	55	190	Atherton <i>et al.</i> , 1995
<i>vacA s1b</i>	F 5'- AGCGCCATACCGCAA GAG -3' R 5'- CTGCTTGAATGCGCCAAAC -3'	55	187	Atherton <i>et al.</i> , 1995
<i>vacA s2</i>	F 5'- GCTAACACGCCAAATGATCC -3' R 5'- CTG CTTGAATGCGCCAAAC -3'	55	199	Atherton <i>et al.</i> , 1995
<i>vacA m1</i>	F 5'- GGTCAAATGCGGTCATGG -3' R 5'- CCATTGGTACCTGTAGAAAC -3'	50	290	Atherton <i>et al.</i> , 1995

Fuente: Elaboración propia.

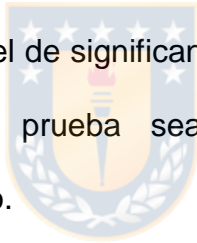
Continuación Tabla 2.1. Partidores utilizados para la detección de *H. pylori* y genes de virulencia mediante PCR.

Gen	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Amplicón (pb)	Referencia
<i>vacA</i>	F 5'- GGAGCCCCAGGAAACATTG -3'	55	352	Atherton <i>et al.</i> , 1995
<i>m2</i>	R 5'- CATAACTAGCGCCTTGCAC -3'			
<i>nudA</i>	F1 5'- ATCATGTCGCCAGACTACCC -3'	56,9	220	Diseñados para esta tesis
	R1 5'- GCTCCATATTGCTTGGGAAA -3'			
	F2 5'- AGATATTGAAGGGGCGTGGC -3'	56,9	159	
	R2 5'- TTGCTTGGGAAATCATAGGC -3'			
<i>htrA</i>	A 5'- ATGAAAAAACCCTTTTTATCTCT -3'	58,6	1428	Tegtmeyer <i>et al.</i> , 2016
	F 5'- TCATTTACCAAATGATCCTAT -3'			
	C 5'- TTTTCCAACAATTTTTGGGG -3'	57,4	573	
	D 5'- GGTTTTGATGAGTTGGGTTAC -3'			

Fuente: Elaboración propia.

2.6.- Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos de los análisis de las muestras fueron incorporados a una base Excel y procesados con el software SPSS 23.0. Las variables categóricas son expresadas por sus frecuencias y sus porcentajes. Para la edad se obtuvo el promedio, la desviación estándar y sus cuartiles. Para determinar la relación entre las variables categóricas, se utilizará el test chi-cuadrado y exacto de Fisher, según corresponda. Se realizó un análisis de conglomerados utilizando el índice de similitud de Jaccard para detectar cuáles genes presentaban características similares en cuanto a presencia-ausencia detectadas. Se utiliza un nivel de significancia del 0,05, esto es cada vez que el valor p asociado a una prueba sea menor que 0,05 se considera estadísticamente significativo.



2.7.- Análisis bioinformáticos

Con el fin de obtener información estructural de la proteína NudA, se analizó la secuencia nucleotídica del gen *nudA* y aminoacídica de la proteína NudA. Los análisis bioinformáticos se realizaron en el Laboratorio de Biofísica Molecular en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, con la colaboración del Dr. José Martínez.

2.7.1.- Determinación *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína NudA

A partir de la secuencia de nucleótidos del gen *nudA* de *H. pylori* J99 (número de acceso: JHP1149 en www.genome.jp), se determinó *in silico* la secuencia de aminoácidos a través del servidor Expasy-Translate tools (<https://web.expasy.org/translate/>); se obtuvieron los seis marcos de lectura y se seleccionó aquella secuencia de aminoácidos de mayor longitud que contuviera el codón de inicio (metionina) y el codón de parada.



2.7.2.- Análisis de secuencia aminoacídica

La secuencia de aminoácidos de NudA de *H. pylori* entregada por el servidor Expasy-Translate tools se ingresó a la plataforma online BLASTp del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) para realizar una búsqueda de secuencias de proteínas no redundantes y proteínas con estructura conocida de la base de datos de Protein Data Bank (PDB), además de información de secuencias de proteínas NudA de otras especies.

2.7.3.- Alineamientos de Secuencias

2.7.3.1.- Determinación de posición de la caja Nudix de la secuencia de NudA en relación con las subfamilias

A partir de los resultados anteriores encontrados en la plataforma de BLASTp y desde base de datos de Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) se descargaron las secuencias de proteínas de la familia Nudix de origen bacteriano pertenecientes a las subfamilias ADPRP, AP4A, GDPMH, mutT y RppH.

A partir de las secuencias de cada subfamilia se realizó un alineamiento múltiple junto con la secuencia de la proteína NudA de *H. pylori* a través del software MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) y con el programa de libre acceso Genedoc 2.7 (<https://genedoc.software.informer.com/2.7/>). Determinándose la posición de los residuos conservados de la caja Nudix entre las secuencias de proteínas para cada subfamilia.

2.7.3.2.- Determinación de identidad y similitud de la secuencia de NudA en relación con las subfamilias de NUDIX

A partir de las secuencias bacterianas de las subfamilias ADPRP, AP4A, GDPMH, mutT y RppH, se realizó un alineamiento utilizando el servidor LALIGN (https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html) con una matriz de puntuación de blosum62, con el fin de obtener los porcentajes de identidad y similitud en relación a la secuencia de NudA.

2.7.3.3.- Determinación residuos del sitio catalítico y de unión al sustrato

Se utilizó el software MUSCLE y con el programa de libre acceso Genedoc 2.7 para la detección de los residuos del sitio catalítico y los residuos del sitio de unión al sustrato. Se seleccionó la secuencia de proteína de base de datos de la familia AP4AP y RppH, que al ser alineada con NudA de *H. pylori* presentó el mayor porcentaje de identidad y similitud.

2.7.4.- Modelamiento de estructura de proteína con servidores

Existen tres enfoques computacionales para el modelado y predicción de estructuras de proteínas: Modelamiento comparativo, predicción de plegamiento (threading) y cálculo *ab initio*. Los dos primeros se basan en el conocimiento

estructural de la proteína obtenido desde base de datos, mientras que el tercero no requiere de ninguna información adicional.

Se realizó un Modelamiento Comparativo con los servidores online Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>) y Mod web (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/modweb/>), este modelamiento predice las estructuras de las proteínas mediante la comparación con estructuras de proteínas homólogas conocidas.

El método de modelamiento predicción de plegamiento (threading) realiza una predicción de plegamiento en base a la observación de que las proteínas usualmente adoptan plegamientos similares sin relación a su similitud de secuencia. El servidor utilizado para este método de plegamiento fue Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).

Finalmente, el método de modelamiento Cálculo *ab initio* o libre, no usa información existente para predecir la estructura de una proteína, sino que realiza un modelamiento que implique la mínima energía conformacional. Tal es el caso del servidor I-tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), que además de usar el método *ab initio*, adiciona el uso de los otros dos métodos mencionados anteriormente.

A partir de los resultados obtenidos por los diversos servidores se seleccionaron aquellos modelos cuyo templado corresponde a proteínas de la familia Nudix de origen bacteriano, que tengan un porcentaje de identidad mayor al 30%

respecto a sus templados, mayor cobertura de secuencia y mayor calidad del modelo de acuerdo con los parámetros establecidos por cada software.

Con el fin de determinar el mejor modelo entre los servidores, se calculó el número RMSD utilizando el programa PyMol 2.0 (Schrödinger).

2.7.5.- Determinación de la Calidad del Modelo

La determinación de calidad del modelo seleccionado se realizó utilizando los servidores: Procheck (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>) y ProSa (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>). Procheck se utilizó para realizar evaluaciones estructurales, verificando la cantidad de residuos fuera de las zonas permitidas del gráfico de Ramachandran. ProSa se usó para realizar análisis estereoquímicos, calculando la calidad global y local del modelo.

2.7.6.- Modelaje comparativo con Modeller

Modelos obtenidos por los servidores pueden presentar zonas al azar, inclusive en zonas donde los templados presentan elementos de estructura secundaria; por lo cual se realizó un modelamiento de la proteína con el software Modeller (<https://salilab.org/modeller/>) utilizando el templado de mayor calidad encontrado por los servidores en línea, antes mencionados.

A partir de este modelo se realizaron modificaciones utilizando el programa Modeller. Estas modificaciones consistieron en la introducción de estructuras extendidas o láminas beta y α -hélice, teniendo como referente el templado de *E. coli* (código PDB: 2KDV).

A través del script del programa modeller se introdujeron las modificaciones de optimización que consistieron en cuatro α -hélice y seis estructuras extendidas. Posteriormente a este modelo modificado se les determinó los mismos parámetros de calidad que en la sección 2.6.5 de metodología.

2.7.7.- Determinación de identidad y similitud de la secuencia de NudA en relación con secuencias de invasinas



A partir de secuencias de proteínas de naturaleza invasiva obtenidas desde base de datos de UniProt (<https://www.uniprot.org>). Se descargaron las secuencias para las invasinas descritas de *Yersinia enterocolitica* W22703 (código UniProt: Q56889), *Yersinia pseudotuberculosis* IP32953 (código UniProt: P11922) y *Salmonella typhimurium* ATCC 700720 (código UniProt: P0A113), se realizó un alineamiento utilizando el servidor LALIGN (https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html) con una matriz de puntuación de blosum62, con el fin de obtener los porcentajes de identidad y similitud en relación a la secuencia de NudA de *H. pylori*.

3.- RESULTADOS

3.1.- Estandarización de partidores

3.1.1.- Estandarización de partidores para gen *nudA*

3.1.1.1.- Gradiente de Temperatura de Alineamiento

Se realizó PCR con gradiente de temperatura de alineamiento con el fin de determinar la temperatura de alineamiento para los dos pares de partidores diseñados, para esto se probaron temperaturas entre los 50 a 62°C. En la figura 3.1, se muestran las amplificaciones para los partidores R1-F1, y en la figura 3.2 para los partidores R2-F2.

Como se puede ver en ambas imágenes, se obtuvo amplicones de acuerdo a los tamaños esperados, 220 pb para los partidores R1-F1 y 159 pb para los partidores F2-R2 en todas las temperaturas de alineamiento ensayadas.

Para los partidores F1-R1 y R2-F2 se seleccionaron las temperaturas de amplificación de 56,9 y 52,6°C, respectivamente.

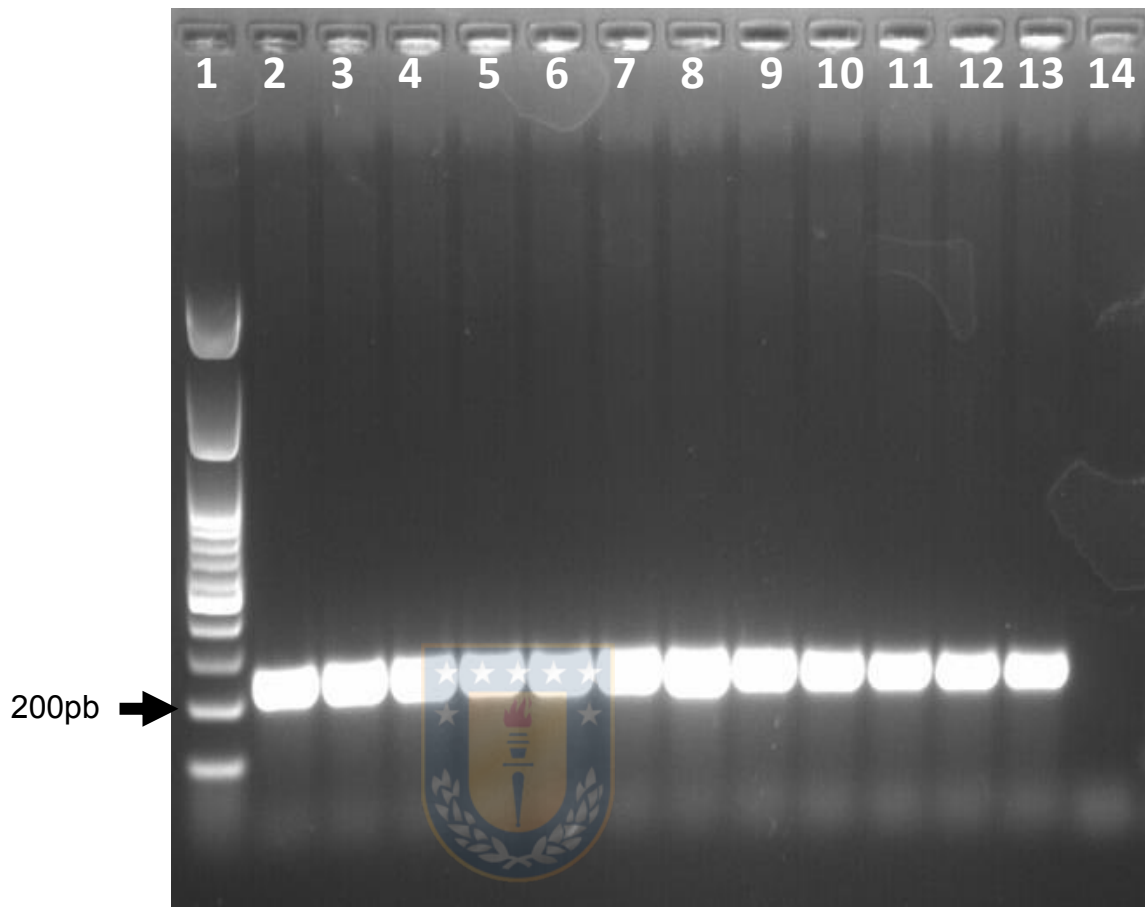


Figura 3.1. Amplificación en gradiente de temperatura de alineamiento del gen *nudA* utilizando partidores F1-R1. El ensayo de gradiente de temperatura se realizó como se describe en la sección 2.5.2.1 de la Metodología. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2-13: temperaturas de alineamiento de 50; 50,6; 51,4; 52,6; 54,2; 55,7; 56,9; 58,3; 59,8; 60,8; 61,5 y 62,0 °C; respectivamente. Carril 14: Control blanco (agua libre de nucleasa). Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa 1,2% teñidos con Redgel. Fuente: Elaboración propia.

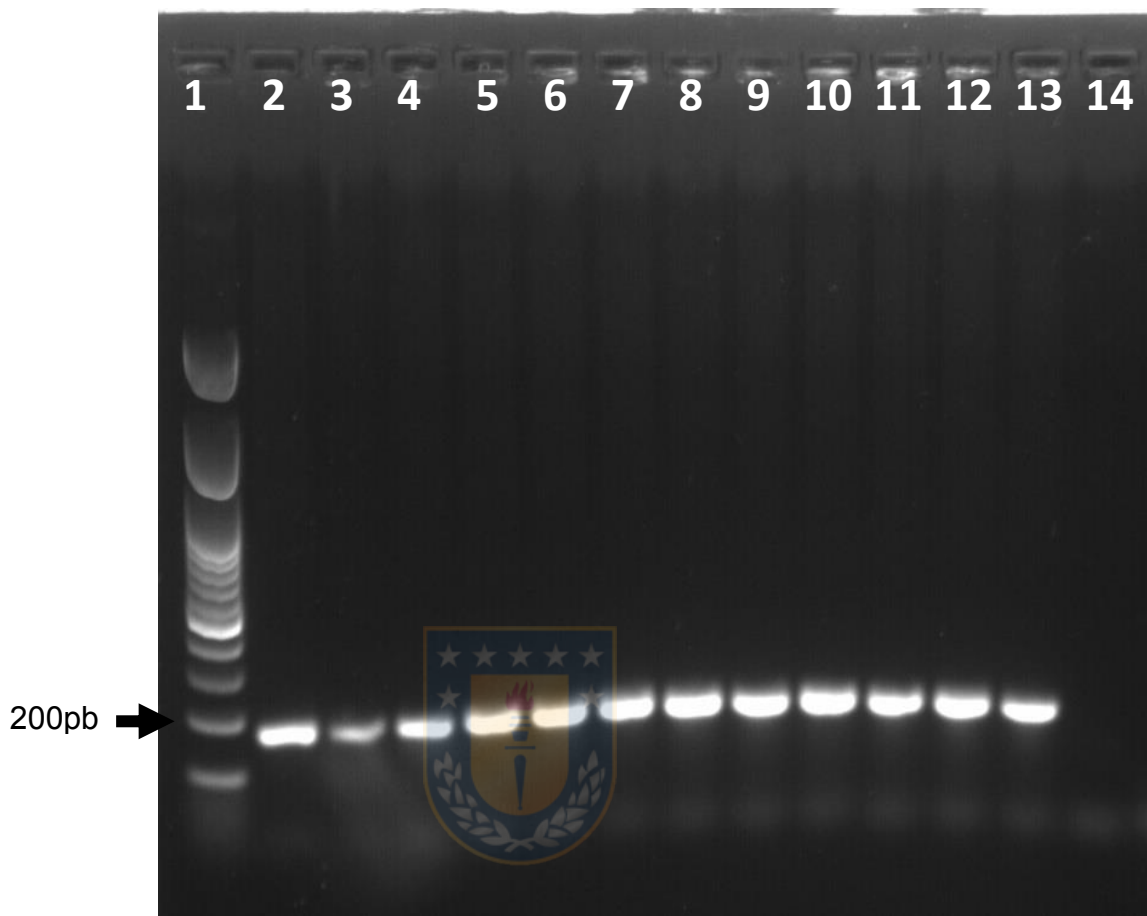


Figura 3.2. Amplificación en gradiente de temperatura de alineamiento del gen *nudA* utilizando partidores F2-R2. El ensayo de gradiente de temperatura se realizó como se describe en la sección 2.5.2.1 de la Metodología. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2-13: temperaturas de alineamiento de 50; 50,6; 51,4; 52,6; 54,2; 55,7; 56,9; 58,3; 59,8; 60,8; 61,5 y 62,0°C; respectivamente. Carril 14: Control blanco (agua libre de nucleasa). Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa 1,2% teñidos con Redgel. Fuente: Elaboración propia.

3.1.1.2.- Determinación de sensibilidad y especificidad

Se utilizaron los partidores F1-R1 y F2-R2 para realizar los siguientes ensayos de sensibilidad y especificidad. Se seleccionó la temperatura de alineamiento de 56,9°C y 52,6°C, correspondiente a un amplicón de 220 y 159 pb, respectivamente.

Para determinar la sensibilidad de los partidores se probaron diversas concentraciones de 750, 70, 50, 25, 10, 5, 0,5, 0,05 y 0,005 ng/μl de ADN de la cepa J99 de *H. pylori* (Figuras 3.3 y 3.4). Para el par de partidores F1-R1 se observó amplificación del tamaño esperado en todas las concentraciones de ADN ensayadas (carriles 2-10, figura 3.3), incluyendo aquellas de menor concentración, como 0,05 y 0,005 ng/μl.

Por otro lado, los partidores F2-R2 al igual que F1-R1, amplifican a todas las concentraciones ensayadas (carriles 2-10, figura 3.4); sin embargo, estas amplificaciones son menos intensas al observarlas en gel de agarosa en comparación con los partidores F1-R1 (Figura 3.3 y 3.4).

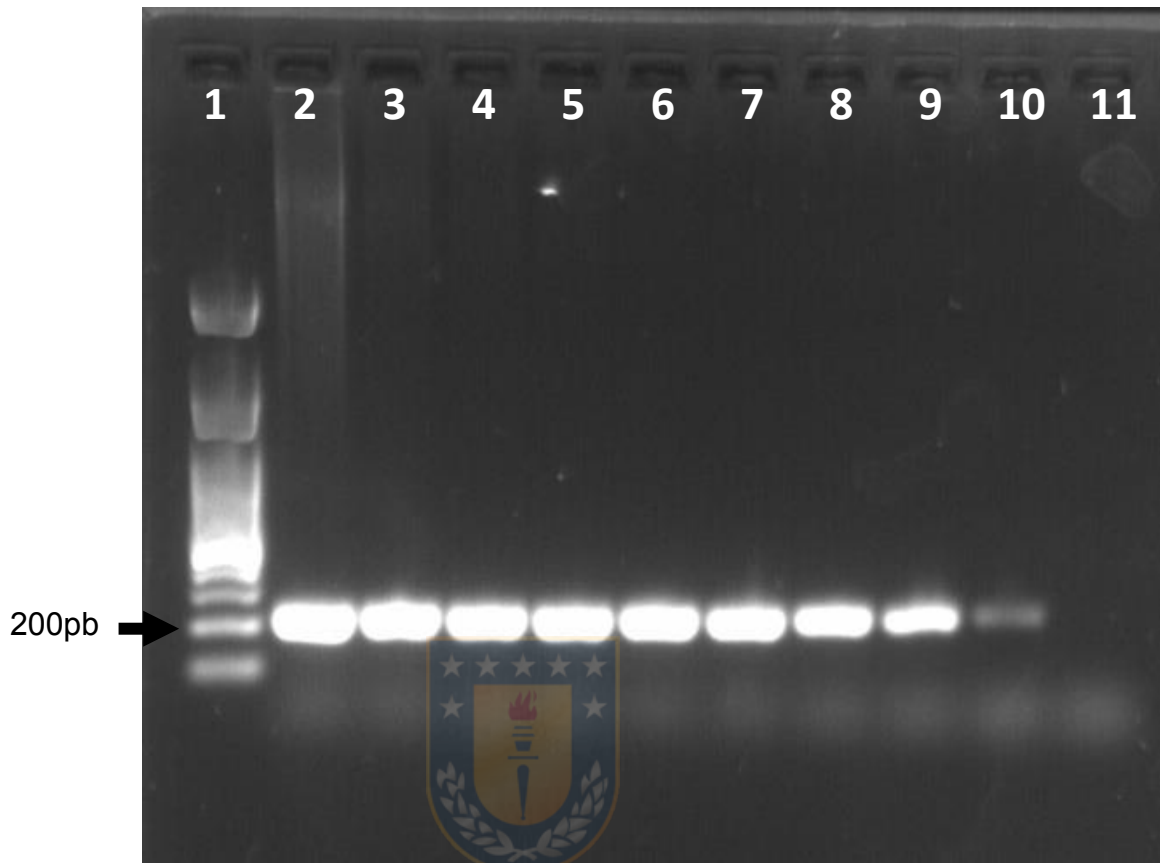


Figura 3.3. Sensibilidad de partidores F1-R1 para el gen *nudA*. El ensayo de sensibilidad se realizó como se describe en la sección 2.5.2.2 de la Metodología. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2-10: concentraciones de *H. pylori* J99 de 750, 70, 50, 25, 10, 5, 0,5, 0,05 y 0,005 ng/ μ l de ADN, respectivamente. Carril 11: Control blanco (agua libre de nucleasa). Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa 1,2% teñidos con Redgel. Fuente: Elaboración propia.

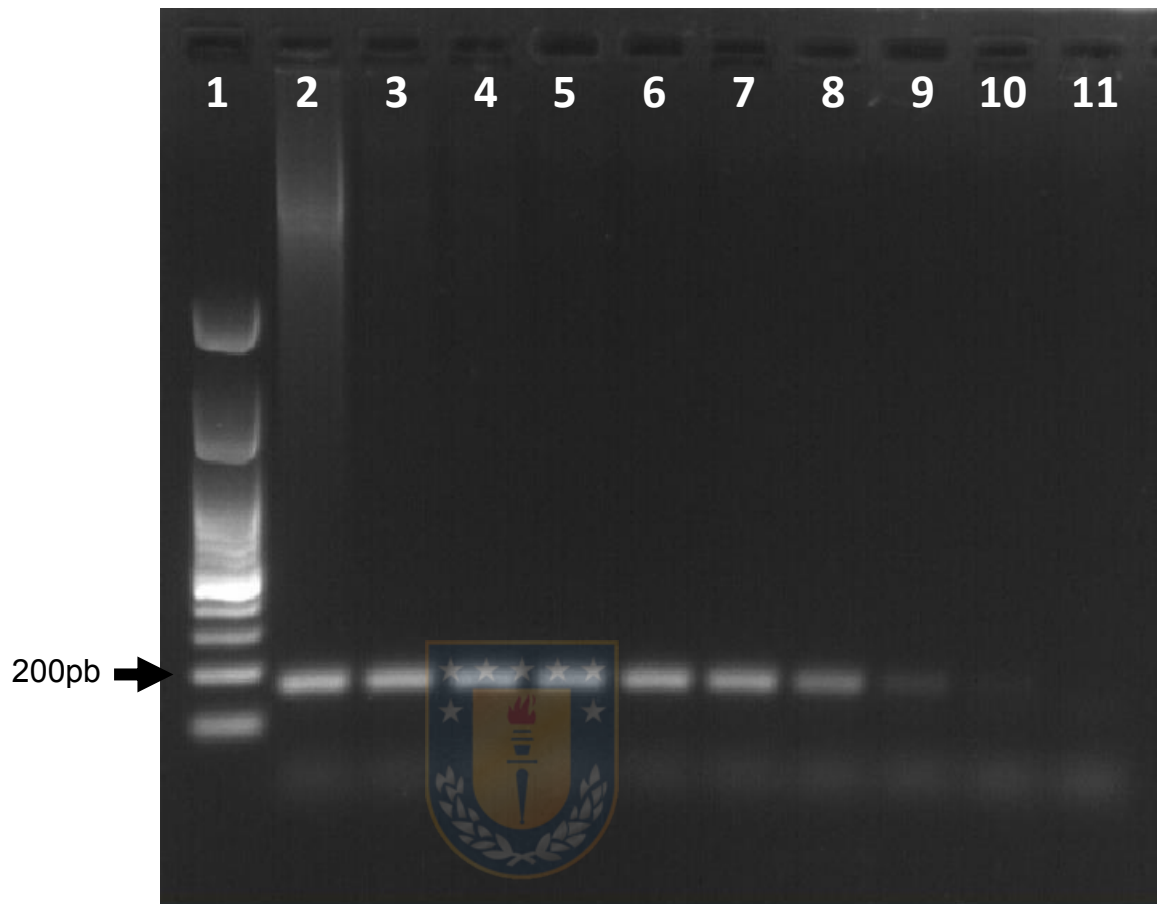
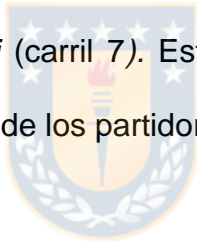


Figura 3.4. Sensibilidad de partidores F2-R2 para el gen *nudA*. El ensayo de sensibilidad se realizó como se describe en la sección 2.5.2.2 de la Metodología. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2-10: concentraciones de *H. pylori* J99 de 750, 70, 50, 25, 10, 5, 0,5, 0,05 y 0,005 ng/ μ l de ADN, respectivamente. Carril 11: Control blanco (agua libre de nucleasa). Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa 1,2% teñidos con Redgel. Fuente: Elaboración propia.

Para determinar la especificidad de los partidores R1-F1 y R2-F2, se realizó PCR con ADN de diversos orígenes (Figura 3.5 y 3.6).

La figura 3.5 muestra los resultados para los partidores R1-F1. No hubo amplificación en el tamaño aproximado de los 220 pb para las cepas *L. rhamnosus* LGG, *L. casei* Shirota, *E. coli* 25922, *S. aureus* 25923 y *C. albicans* 10231 (carriles 1-5), ni para la muestra de ADN de biopsia gástrica que dio negativa para *ARNr 16S H. pylori* (carril 6). Sin embargo, si se observa amplificación en las muestras de las cepas J99, SS1, G27, 43504 de *H. pylori* (carriles 8-11) y para la muestra de ADN de biopsia gástrica que fue positiva para *ARNr 16S de H. pylori* (carril 7). Este mismo patrón de amplificación se presenta para los resultados de los partidores R2-F2 (figura 3.6)



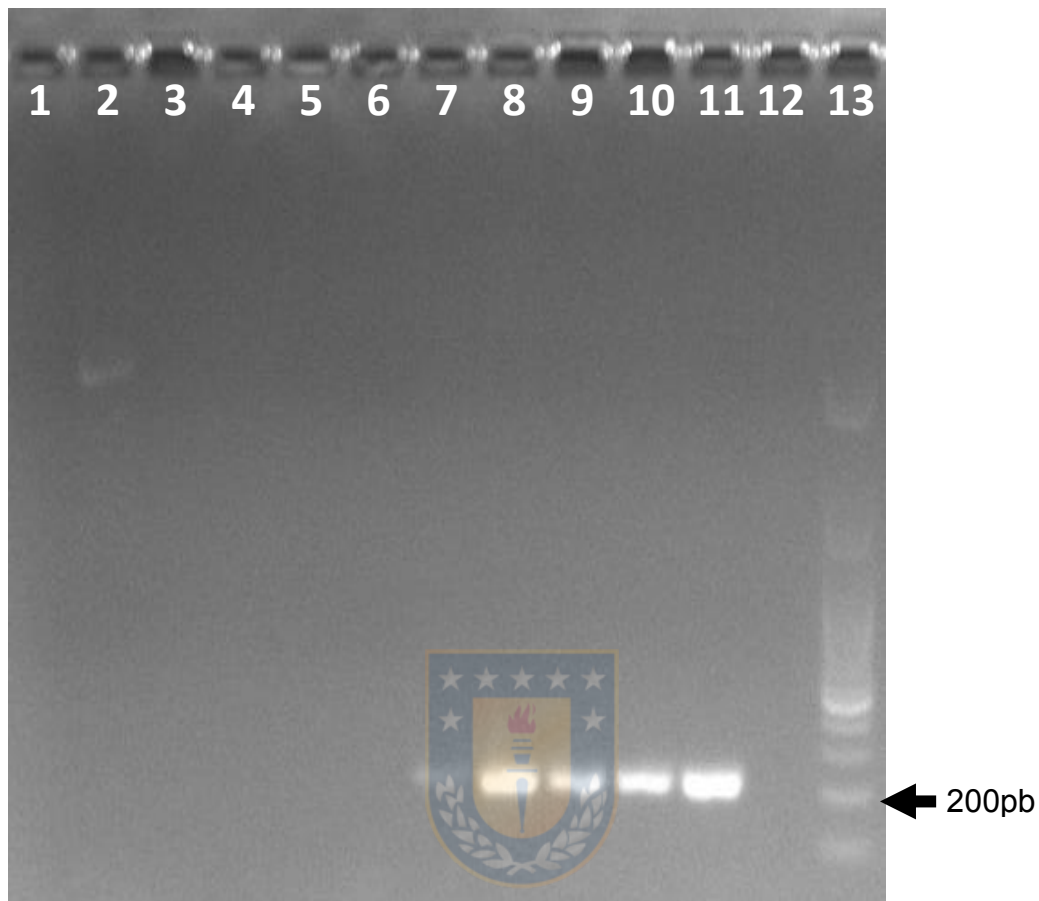


Figura 3.5. Especificidad de los partidores F1-R1 para el gen *nudA*. El ensayo de especificidad se realizó como se describe en la sección 2.5.2.2 de la Metodología. Carril 1-11: *L. rhamnosus* LGG, *L. casei* Shirota, *E. coli* 25922, *S. aureus* 25923, *C. albicans* 10231, muestra de biopsia gástrica negativa y otra positiva para *ARNr 16S H. pylori*, cepas J99, SS1, G27 y 43504 de *H. pylori*, respectivamente. Carril 12: Control blanco (agua libre de nucleasa). Carril 13: Marcador de peso molecular de 100 pb. Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa 1,2% teñidos con Redgel. Fuente: Elaboración propia.

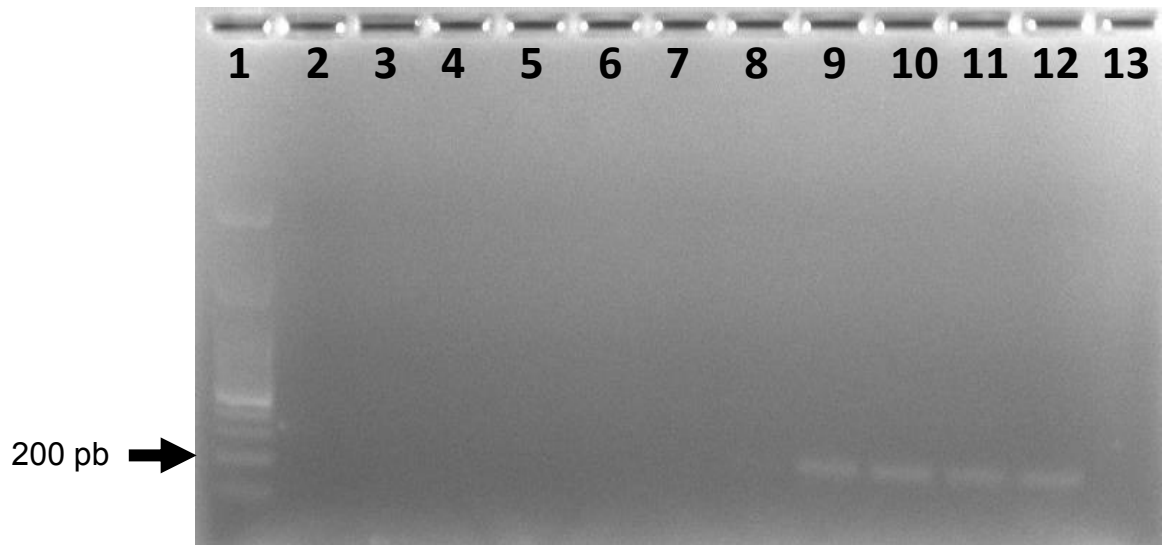


Figura 3.6. Especificidad de los partidores F2-R2 para el gen *nudA*. El ensayo de especificidad se realizó como se describe en la sección 2.5.2.2 de la Metodología. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2-13: *L. rhamnosus* LGG, *L. casei* Shirota, *E. coli* 25922, *S. aureus* 25923, *C. albicans* 10231, muestra de biopsia gástrica negativa y otra positiva para *ARNr 16S H. pylori*, cepas J99, SS1, G27 y 43504 de *H. pylori*, respectivamente. Carril 14: Control blanco (agua libre de nucleasa). Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa 1,2% teñidos con Redgel. Fuente: Elaboración propia.

3.1.2.- Estandarización de partidores para gen *htrA*

3.1.2.1.- Gradiente de Temperatura de Alineamiento

Se probaron distintas temperaturas de alineamiento para los partidores del gen *htrA*, A-F y C-D, obtenidos desde literatura (Tegtmeyer *et al.*, 2016). Para ambos pares de partidores se probaron las temperaturas de: 54; 54,5; 55,2; 56,2; 57,4; 58,6; 59,8; 60,9; 62,0; 63,0; 63,4 y 64,0 °C.

En la figura 3.7, se observa la amplificación del gen completo de *htrA*, con un tamaño aproximado de 1500 pb en todas las temperaturas ensayadas. Sin embargo, desde la temperatura 59,8°C (carril 8) ocurre una amplificación inespecífica de 750 pb aproximadamente (flecha blanca). Por lo cual, los siguientes experimentos para estos partidores se desarrollaron con una temperatura de alineamiento de 58,6 °C.

Por otro lado, la amplificación de 573 pb del dominio proteasa de *htrA* utilizando los partidores C-D, se muestran en la figura 3.8. Observándose una amplificación mayor de los 500 pb (570 pb aproximadamente) en todas las temperaturas de alineamiento ensayadas. Sin embargo, desde la temperatura de alineamiento 58,6 °C (carril 7) hasta los 60,9 °C (carril 9) es posible observar una ligera amplificación de menor tamaño de 500 pb (flecha blanca), por lo cual los siguientes ensayos con estos partidores se realizaron a una temperatura de alineamiento de 57,4 °C.

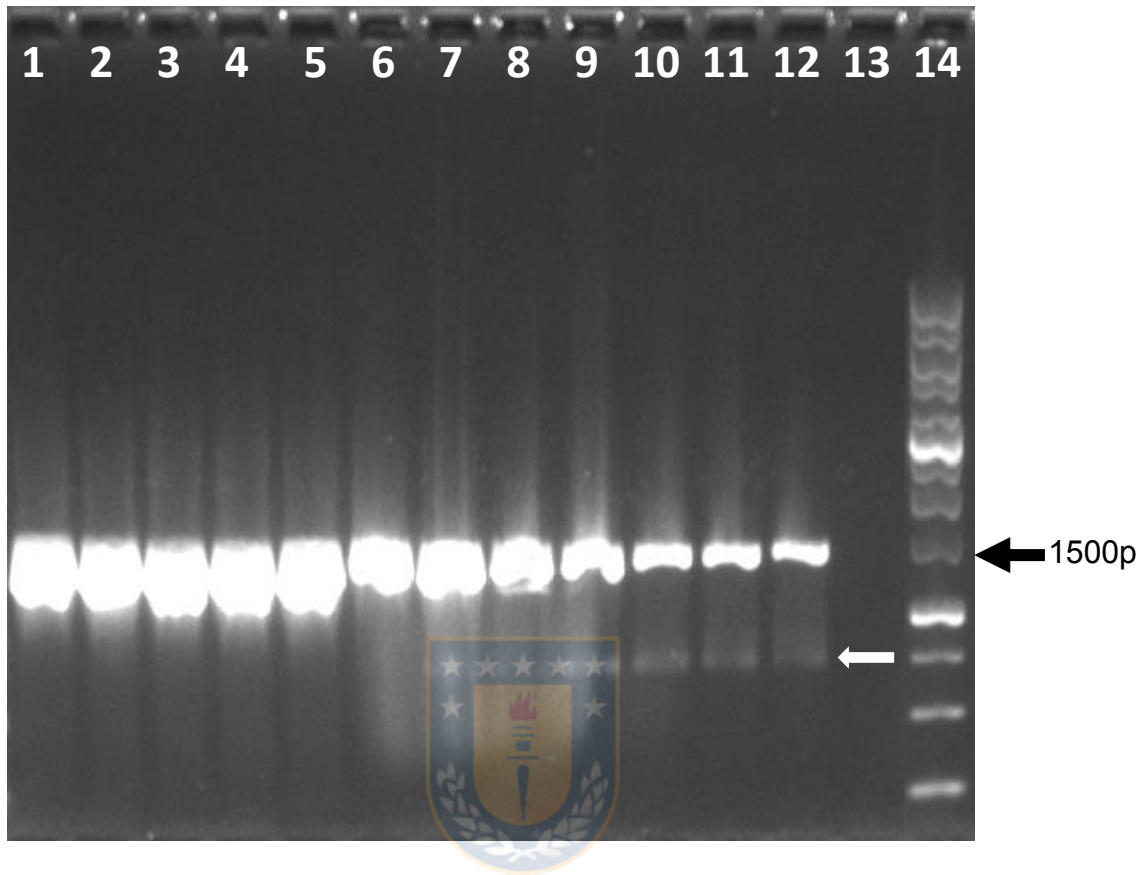


Figura 3.7. Amplificación en gradiente de temperatura de alineamiento del gen *htrA* utilizando partidores A-F. El ensayo de gradiente de temperatura se realizó como se describe en la sección 2.5.3.1 de la Metodología. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2-13: temperaturas de alineamiento de 54; 54,5; 55,2; 56,2; 57,4; 58,6; 59,8; 60,9; 62,0; 63,0; 63,4; 64,0 °C; respectivamente. Carril 14: Control blanco (agua libre de nucleasa). Flecha blanca: amplificaciones inespecíficas. Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa 1,2% teñidos con Redgel. Fuente: Elaboración propia.

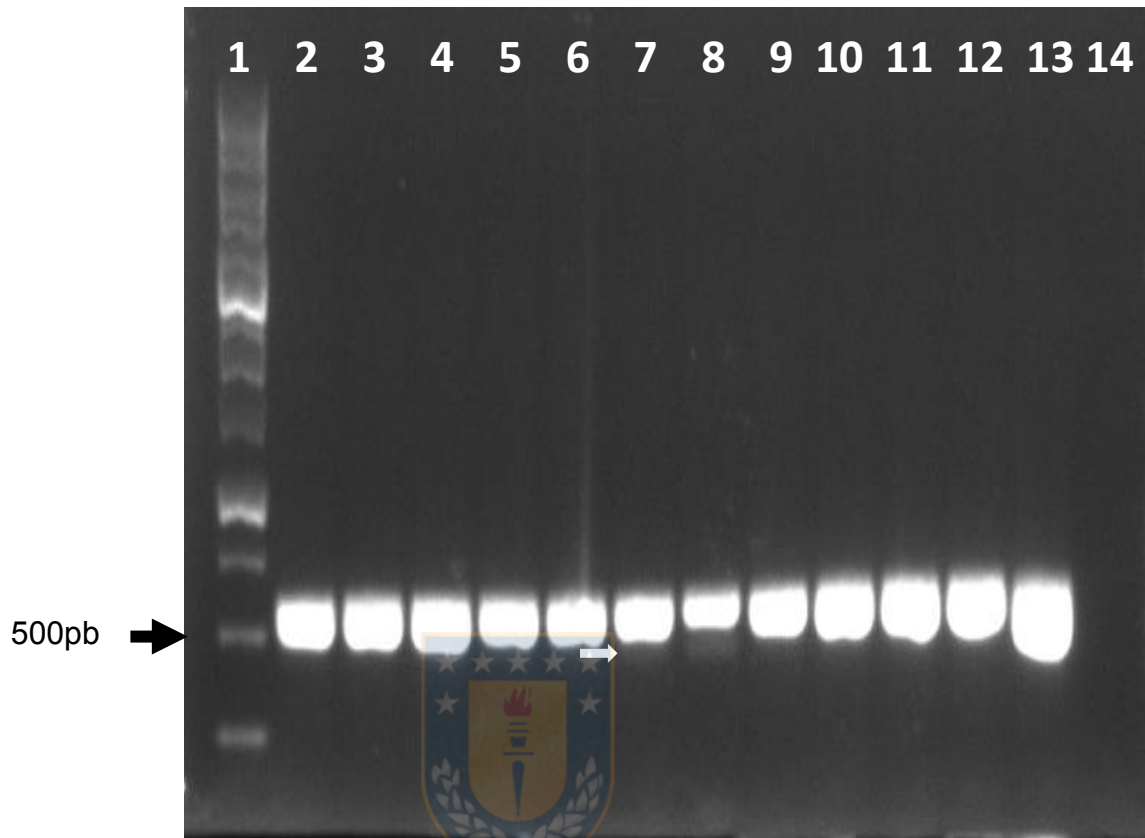


Figura 3.8. Amplificación en gradiente de temperatura de alineamiento del gen *htrA* utilizando partidores C-D. El ensayo de gradiente de temperatura se realizó como se describe en la sección 2.5.3.1 de la Metodología. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2-13: temperaturas de alineamiento de 54; 54,5; 55,2; 56,2; 57,4; 58,6; 59,8; 60,9; 62,0; 63,0; 63,4; 64,0 °C; respectivamente. Carril 14: Control blanco (agua libre de nucleasa). Flecha blanca: amplificaciones inespecíficas. Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa 1,2% teñidos con Redgel. Fuente: Elaboración propia.

3.1.2.2.- Determinación de sensibilidad y especificidad

Se determinó la sensibilidad a través de la realización de PCR con diversas concentraciones de la cepa *H. pylori* J99 para los partidores AF y C-D (Figura 3.9 y 3.10). Se ensayaron las concentraciones 750; 70; 50; 25; 10; 5; 0,5, 0,05 y 0,005 ng/μl de ADN para ambos pares de partidores. En la figura 3.9, es posible observar el efecto sobre la envergadura del fragmento amplificado con los partidores A-F, de acuerdo con la concentración utilizada. A menor concentración de ADN más definido es el fragmento, lográndose amplificación en todas las concentraciones ensayadas, inclusive la de 0,005 ng/μl (carriles 2-10). La figura 3.10 muestra los fragmentos de amplificación para los partidores C-D, se puede apreciar amplificación en todas las concentraciones ensayadas. Sin embargo, a partir de la concentración de 10 hasta 0,005 ng/μl es posible observar una tenue banda de amplificación a los 400 pb aproximadamente (flecha blanca, carriles 6-10).

La especificidad de los partidores AF y C-D se muestra en las figuras 3.11 y 3.12, respectivamente. Para ambos pares de partidores fue posible observar amplificación en los tamaños esperados (1428 pb para A-F y 573 pb para C-D) para la muestra de biopsia gástrica positiva para *ARNr 16S* de *H. pylori* (carril 8) y las cepas J99, SS1, G27 y 43504 de *H. pylori* (carriles 9-12).

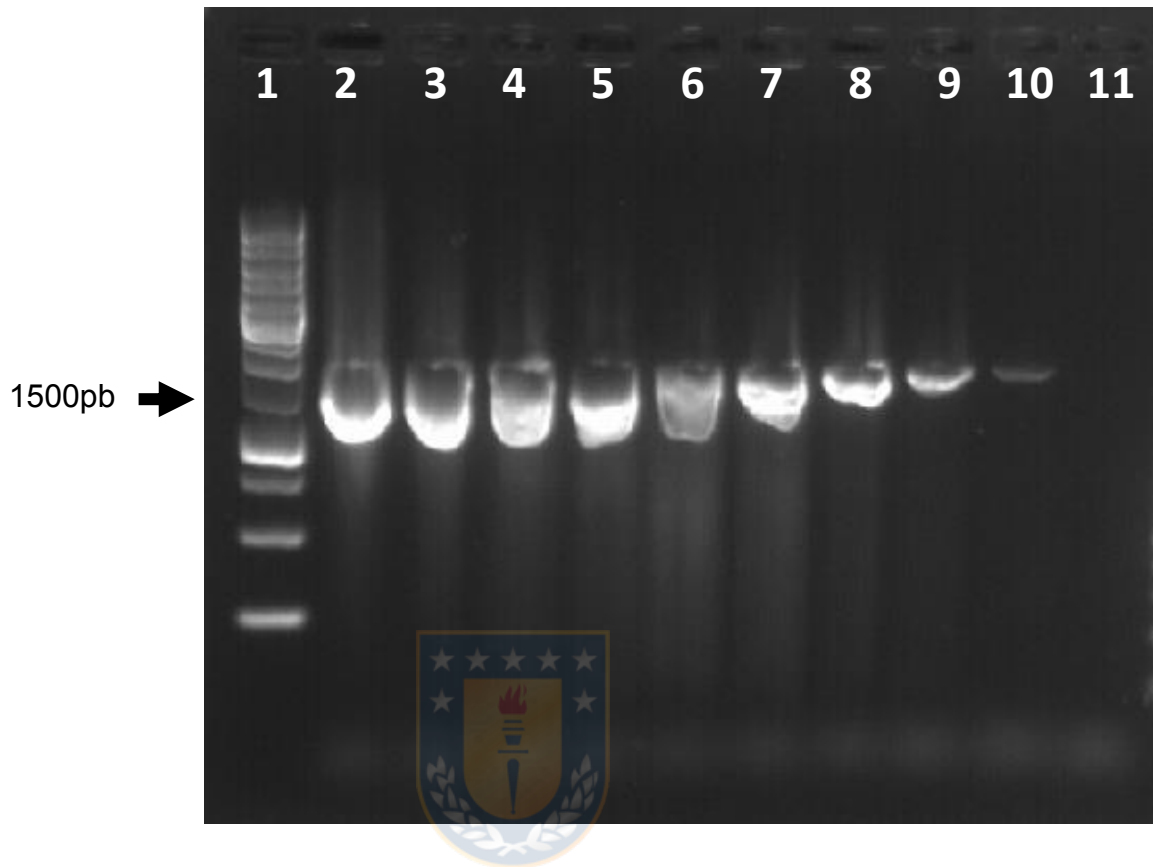


Figura 3.9. Sensibilidad de partidores A-F para el gen *htrA*. El ensayo de sensibilidad se realizó como se describe en la sección 2.5.3.2 de la Metodología. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2-10: concentraciones de *H. pylori* J99 de 750; 70; 50; 25; 10; 5; 0,5, 0,05 y 0,005 ng/ μ l de ADN, respectivamente. Carril 11: Control blanco (agua libre de nucleasa). Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa 1,2% teñidos con Redgel. Fuente: Elaboración propia.

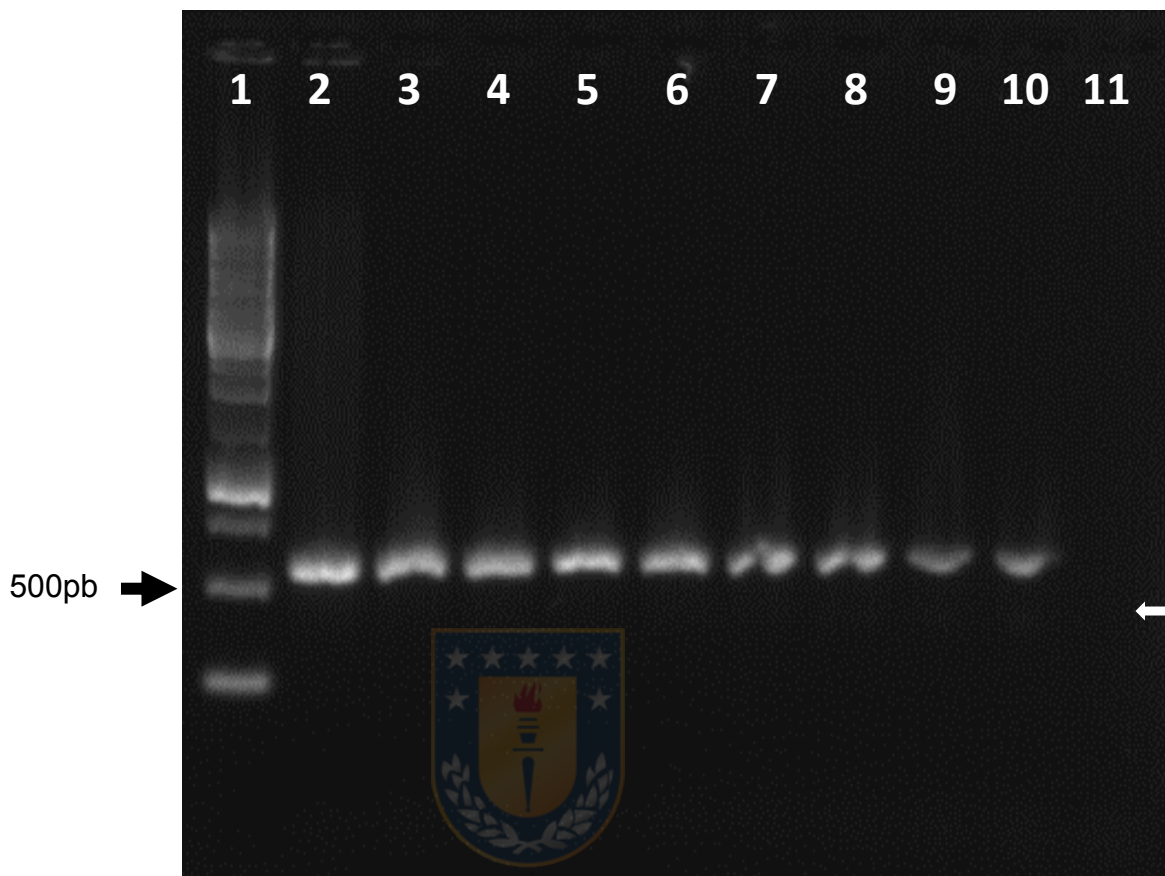


Figura 3.10. Sensibilidad de partidores C-D para el gen *htrA*. El ensayo de sensibilidad se realizó como se describe en la sección 2.5.3.2 de la Metodología. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2-10: concentraciones de *H. pylori* J99 de 750; 70; 50; 25; 10; 5; 0,5, 0,05 y 0,005 ng/ μ l de ADN, respectivamente. Carril 11: Control blanco (agua libre de nucleasa). Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa 1,2% teñidos con Redgel. Fuente: Elaboración propia.

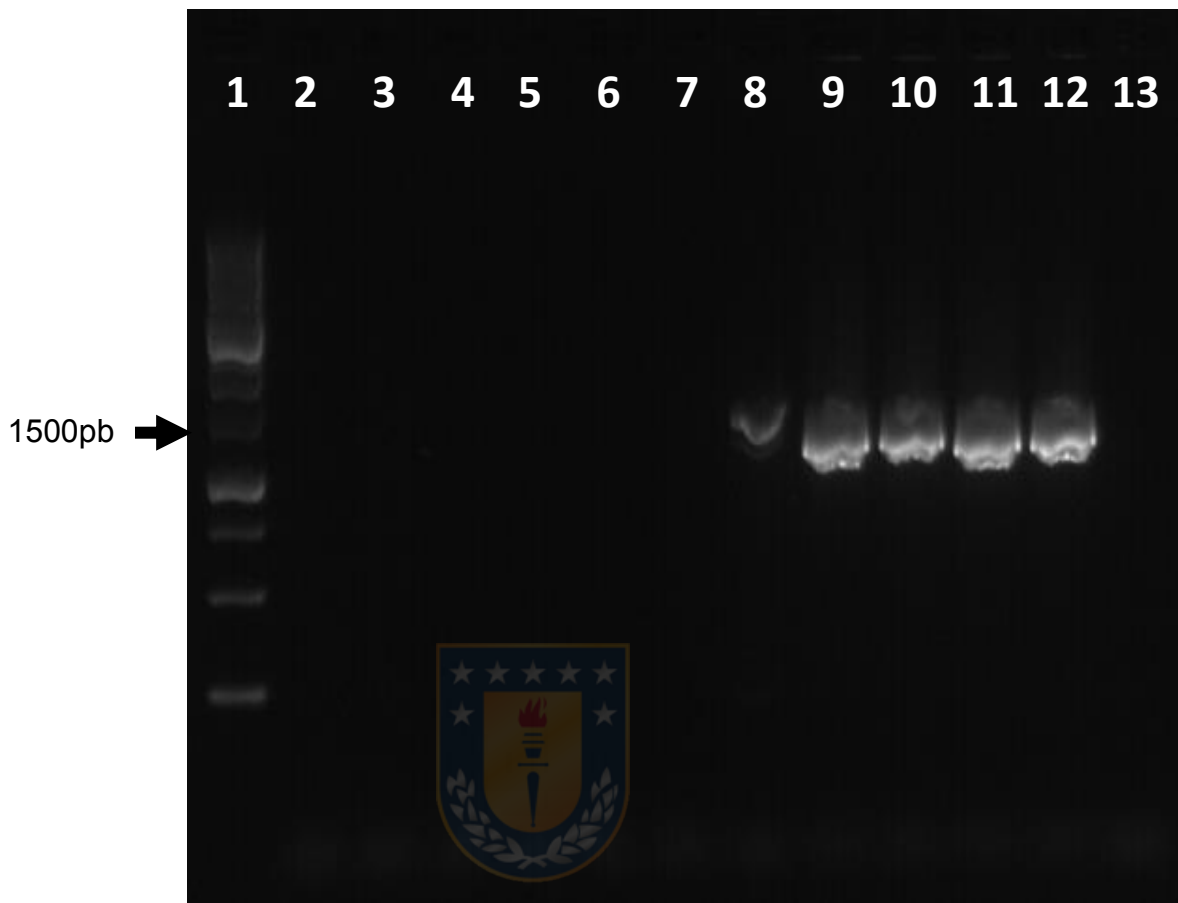


Figura 3.11. Especificidad de los partidores A-F para el gen *htrA*. El ensayo de especificidad se realizó como se describe en la sección 2.5.3.2 de la Metodología. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb. Carril 2-12: *L. rhamnosus* LGG, *L. casei* Shirota, *E. coli* 25922, *S. aureus* 25923, *C. albicans* 10231, muestra de biopsia gástrica negativa y otra positiva para *ARNr 16S H. pylori*, cepas J99, SS1, G27 y 43504 de *H. pylori*, respectivamente. Carril 13: Control blanco (agua libre de nucleasa). Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa 1,2% teñidos con Redgel. Fuente: Elaboración propia.

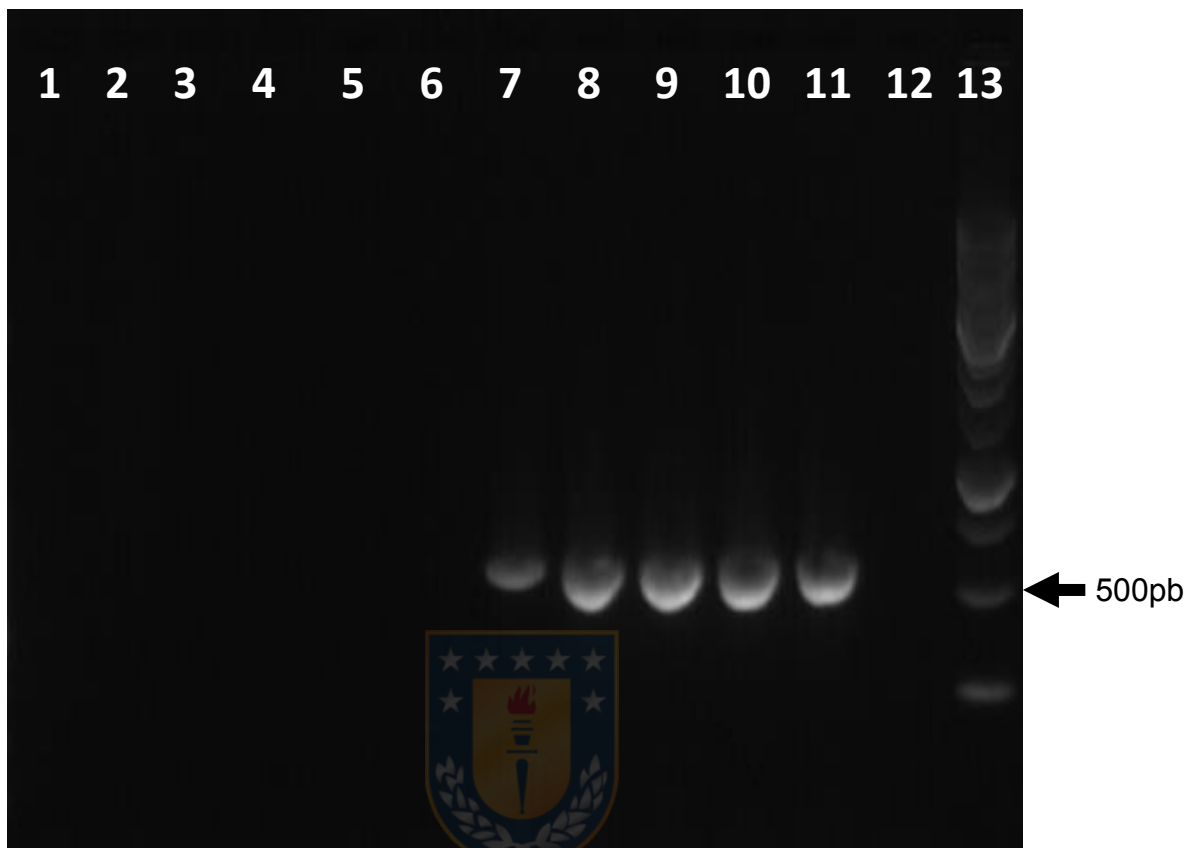


Figura 3.12. Especificidad de los partidores C-D para el gen *htrA*. El ensayo de especificidad se realizó como se describe en la sección 2.5.3.2 de la Metodología. Carril 1-12: *L. rhamnosus* LGG, *L. casei* Shirota, *E. coli* 25922, *S. aureus* 25923, *C. albicans* 10231, muestra de biopsia gástrica negativa y otra positiva para *ARNr 16S H. pylori*, cepas J99, SS1, G27 y 43504 de *H. pylori*, respectivamente. Carril 13: Control blanco (agua libre de nucleasa). Carril 14: Marcador de peso molecular de 1kb. Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa 1,2% teñidos con Redgel. Fuente: Elaboración propia.

3.2.- Perfil sociodemográfico de los pacientes positivos para *H. pylori*

Durante los meses de abril a diciembre del año 2016, se obtuvieron muestras gástricas desde pacientes adultos con indicación médica de endoscopia digestiva alta, en el centro de salud Inmunomédica ubicado en Concepción, Región del Biobío. Durante este periodo se recolectaron muestras gástricas desde 146 pacientes, de los cuales 64 (43,8%) fueron positivo para *H. pylori* a través de análisis de PCR para la detección del gen *ARNr 16S* en biopsia.

De estos 64 pacientes, 40 (62,5%) correspondían al sexo femenino y 24 (37,5%) al masculino. Veinte y siete de estos pacientes (42%) tenían una edad menor de 50 años y 37 (58%) eran mayores o igual a 50 años durante el momento del muestreo, con una mediana de 52 años entre los pacientes analizados.

De estos 64 pacientes positivos para *H. pylori*, el 9,4% fue diagnosticado con edema, 32,8% gastritis leve, 37,5% gastritis crónica (no atrófica 32,8%; atrófica 4,7%) y 20,3% metaplasia intestinal (incompleta 18,8%; completa 1,6%) (Figura 3.13).

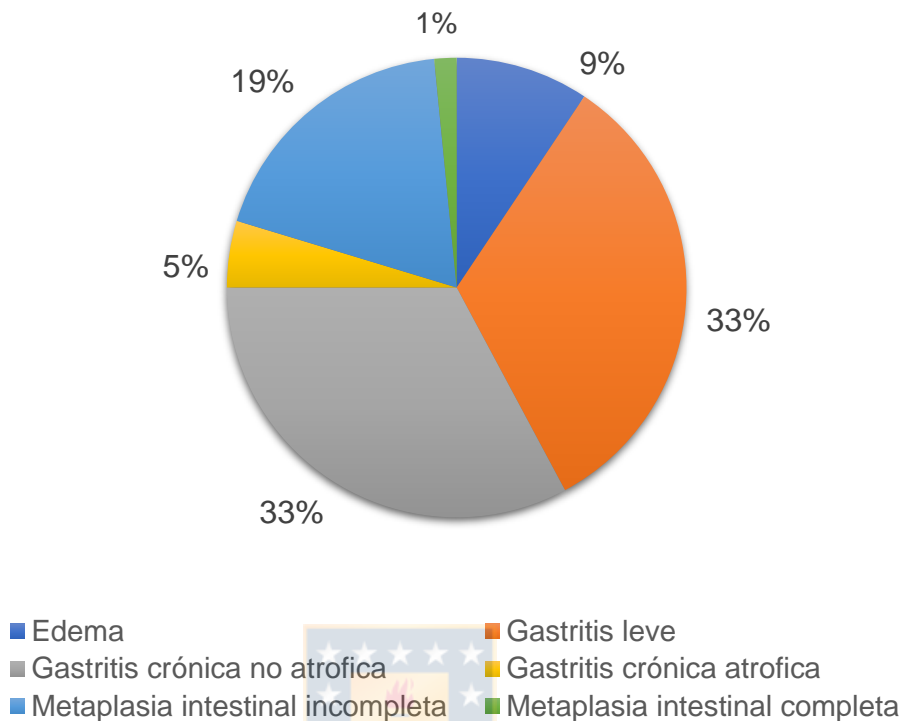


Figura 3.13. Frecuencia de diagnósticos histopatológicos para la población estudiada positiva para *H. pylori* ARNr 16S. Fuente: Elaboración propia.

3.3.- Detección molecular de *H. pylori* en biopsias gástricas

A los 146 pacientes de los cuales se obtuvo muestra gástrica, se les realizó detección molecular de *H. pylori* a través de la detección del gen *ARNr 16S* utilizando los partidores Hp1 y Hp2, de acuerdo estandarización realizados en el laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Universidad de Concepción.

De los 146 pacientes, 64 fueron positivos para la amplificación del gen *ARNr 16S* de *H. pylori*. A estas 64 muestras, se les realizó PCR para la detección de los genes *cagA*, *vacAs1a*, *vacAs1b*, *vacAs2*, *vacAm1*, *vacAm2*, *nudA* y *htrA*, de acuerdo con estandarizaciones previas realizadas en el mismo laboratorio. Los resultados de presencia de genes de virulencia para las 64 muestras positivas para *H. pylori*, se presentan en la tabla del anexo 2.

3.4.- Análisis de datos

Se determinó la presencia de los genes de virulencia para los 64 pacientes, independiente de la condición gástrica de los individuos. Del total de las muestras, 42,1% de los pacientes fue positivo para *cagA*, 12,5% para *vacAs1a*, 26,6% para *vacAs1b*, 57,8% para *vacAs2*, 37,5% para *vacAm1*, 68,8% para *vacAm2*, 90,6% para *nudA* y 81,2% para *htrA* (Figura 3.14).

Por otro lado, se determinó la presencia de los diversos perfiles de genes de virulencia encontrados en las 64 muestras. El perfil más predominante fue *vacAs2+vacAm2+nudA+htrA* encontrándose en 32,8 % de las biopsias gástricas analizadas (21 biopsias), seguido por los genotipos *cagA+vacAs1b+vacAm1+nudA+htrA* y *cagA+vacAm1+nudA+htrA*, ambos con una presencia del 9,4 %.

Dentro del mismo análisis, se determinó que el 20,3 % (13) de los individuos presentaban infecciones por cepas mixtas de *H. pylori* (es decir con dos o más cepas), encontrándose amplificaciones simultáneas de los genotipos *vacAs1a*, *vacAs1b*, *vacAs2*, *vacAm1* y *vacAm2*.

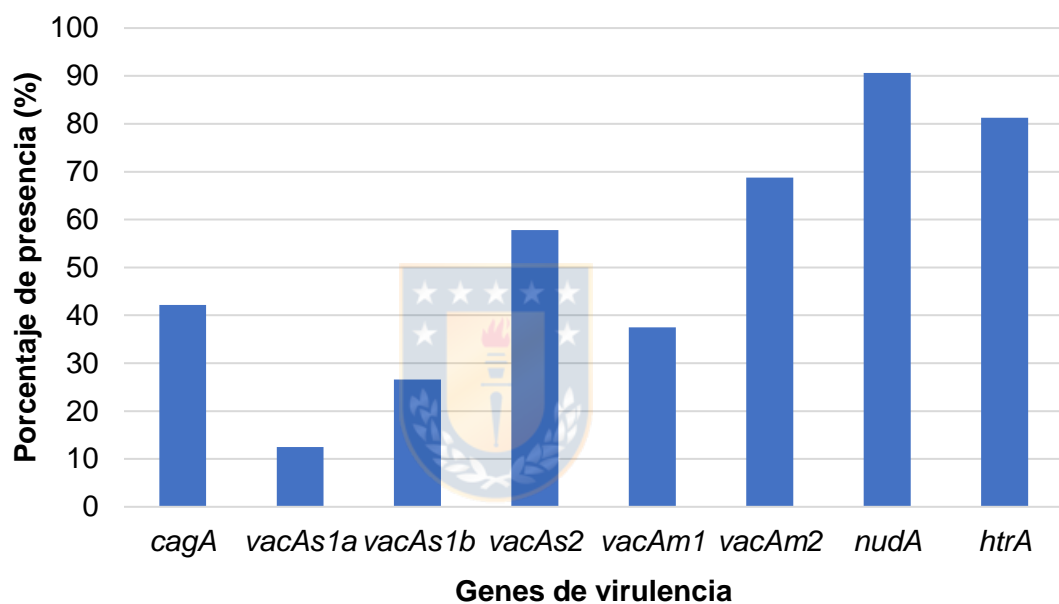


Figura 3.14. Presencia de genes de virulencia en pacientes positivos para *H. pylori* independiente de la condición gástrica. Fuente: Elaboración propia.

Con la asesoría de un patólogo clínico se realizaron tres clasificaciones de la severidad de la patología gástrica: cuatro categorías (edema, gastritis leve, gastritis crónica y metaplasia intestinal, tres categorías (edema, gastritis leve-gastritis crónica no atrófica y gastritis crónica atrófica-metaplasia intestinal) y dos categorías (patología no severa y severa), para mayor detalle revisar la sección 2.2 de metodología.

Para las clasificaciones de cuatro y dos categorías, se determinó que la edad de los pacientes, el sexo y la presencia de los genes de virulencia *cagA*, *vacAs1a*, *vacAs1b*, *vacAs2*, *vacAm1*, *vacAm2*, *nudA* y *htrA*, no están relacionados con la severidad ($p > 0,05$), no siendo factores de riesgo para el desarrollo de patologías gástricas severas.

La clasificación de tres categorías se realizó en base a la naturaleza de las lesiones. Gastritis crónica atrófica y metaplasia intestinal son lesiones precancerosas, gastritis leve y gastritis crónica no atrófica son lesiones con bajo daño gástrico, y edema corresponde a una mucosa gástrica normal. Para esta clasificación de tres categorías, los porcentajes de presencia de genes se presentan en la tabla 3.1. Los genes *cagA*, *vacAs1b*, *vacAm1*, *nudA* y *htrA* son más predominantes en las categorías de mayor daño gástrico (gastritis crónica atrófica y metaplasia intestinal), a diferencia de los genes *vacAs2* y *vacAm2* que presentan mayor porcentaje de presencia en categorías de menor daño gástrico (edema, gastritis leve y gastritis crónica no atrófica) (Tabla 3.1, Figura 3.16).

Tabla 3.1. Presencia de genes de virulencia para cada estado de severidad gástrica.

Genes	Edema	G. leve y G. crónica no atrófica	G. crónica atrófica- Metaplasia intestinal
<i>cagA</i>	0%	41%	63%
<i>vacAs1a</i>	17%	12%	13%
<i>vacAs1b</i>	17%	29%	25%
<i>vacAs2</i>	67%	60%	50%
<i>vacAm1</i>	17%	36%	50%
<i>vacAm2</i>	67%	71%	63%
<i>nudA</i>	67%	91%	100%
<i>htrA</i>	50%	86%	81%

Fuente: Elaboración propia.



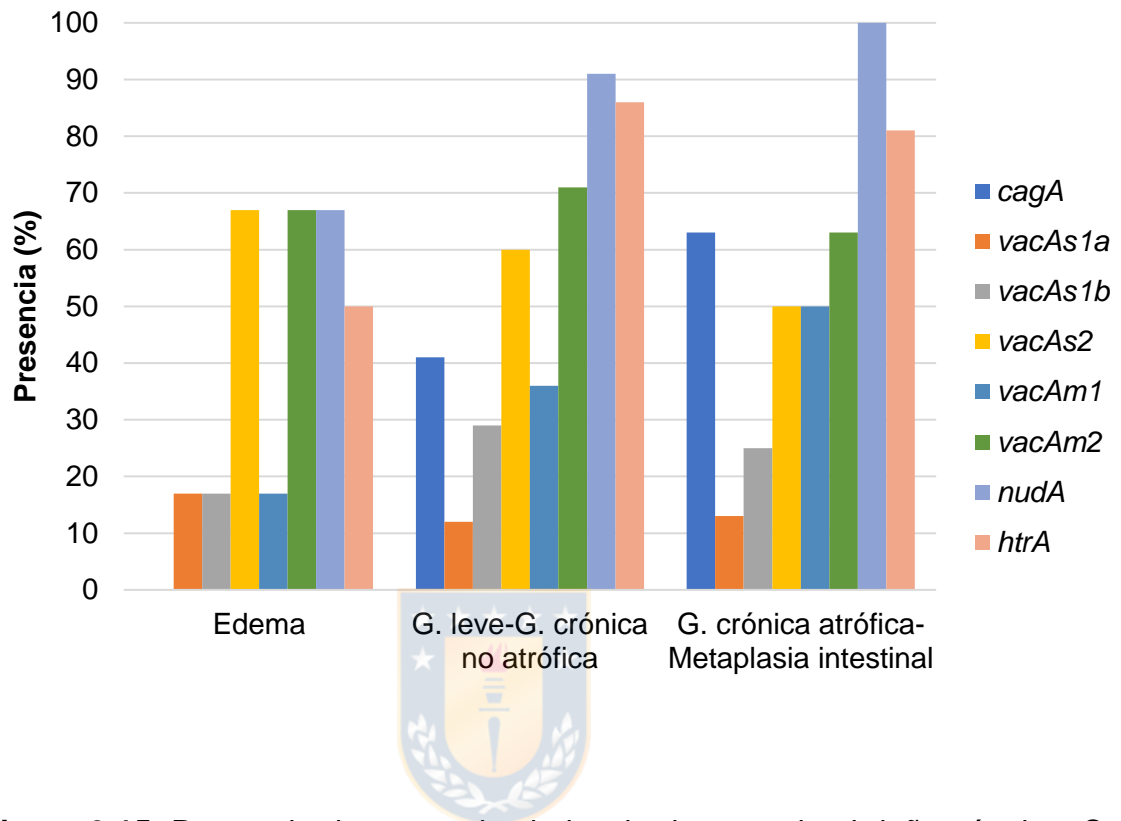


Figura 3.15. Presencia de genes de virulencia de acuerdo al daño gástrico. Se muestran los porcentajes de frecuencia para los genes *cagA*, *vacAs1a*, *vacAs1b*, *vacAs2*, *vacAm1*, *vacAm2*, *nudA*, *htrA* y *ARNr16S* en las muestras de biopsias gástricas positivas para *H. pylori* de los diagnósticos histopatológicos de edema, gastritis leve-gastritis crónica no atrófica y gastritis crónica atrófica-metaplasia intestinal. Fuente: Elaboración propia.

Para esta clasificación, los análisis estadísticos determinaron que la presencia del gen *cagA* está relacionada con los mayores grados de severidad: gastritis crónica atrófica y metaplasia intestinal; presentándose en un 37,0 % (Tabla 3.2). Por otro lado, se realizó un análisis para determinar si la combinación de genes está relacionada con la severidad. Determinándose que la combinación *nudA⁺/htrA⁺/cagA⁺* se encuentra más presente en los mayores grados de severidad (gastritis crónica atrófica-metaplasia intestinal) a diferencia de la combinación *nudA⁺/htrA⁺/cagA⁻*, habiendo diferencias significativas entre ambos ($p= 0,015$).

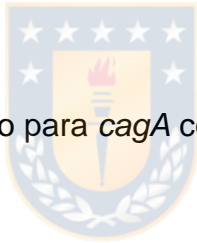


Tabla 3.2. Análisis estadístico para *cagA* con tres categorías.

	Ausencia		Presencia		Total	
	n	%	n	%	n	%
No severo	6	16,2	0	0,0	6	9,4
Grado 1	25	67,6	17	63,0	42	65,6
Grado 2 o más	6	16,2	10	37,0	16	25,0
Total	37	100,0	27	100,0	64	100,0

$p=0,023$. No severo: edema. Grado 1: gastritis leve-gastritis crónica no atrófica. Grado 2: gastritis crónica atrófica-metaplasia intestinal. Fuente: Elaboración propia.

Se realizaron análisis estadísticos para determinar la asociación entre los genes analizados independiente del grado de severidad. Para esto se realizó un análisis a todos los pares de combinaciones, presentándose solo aquellos con significancia estadística. A todos los análisis significativos, se les asocia un índice kappa de concordancia, cuyo valor positivo indica la asociación directa entre los genes, y valor negativo indica la relación indirecta entre la presencia- ausencia de los pares de genes.

En las tablas 3.3, 3.4 y 3.5 es posible observar la asociación entre los genes *cagA* y *vacAs2*, *vacAm1* y *vacAm2*, respectivamente. En donde la presencia de *cagA* con *vacAs2* y *vacAm2* están indirectamente relacionados; es decir, cuando uno de los genes está presente el otro gen está ausente (Tabla 3.3 y 3.5). A diferencia de *cagA* con *vacAm1*, donde la presencia o ausencia está relacionada directamente (Tabla 3.4). En las tablas 3.6 y 3.7, se observan la asociación inversa entre los genes *vacAs2* con *vacAm1* (Tabla 3.6) y directa entre *vacAs2* con *vacAm2* (Tabla 3.7). Por último, la tabla 3.8, muestra la asociación indirecta entre *vacAm1* y *vacAm2*.

También se realizó un análisis para determinar si la presencia de los genes de virulencia está asociado al sexo de los pacientes y se determinó que la presencia de *vacAs1b* está asociado con el sexo femenino ($p= 0,49$, Tabla 3.9).

Tabla 3.3. Asociación entre los genes *cagA* y *vacAs2*.

		<i>cagA</i>					
		Ausencia		Presencia		Total	
		N	%	N	%	N	%
<i>vacAs2</i>	Ausencia	6	22	21	78	27	100
	Presencia	31	84	6	16	37	100
Total		37	58	27	42	64	100

p= 0,000. kappa= -0,59. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.4. Asociación entre los genes *cagA* y *vacAm1*.

		<i>cagA</i>					
		Ausencia		Presencia		Total	
		N	%	N	%	N	%
<i>vacAm1</i>	Ausencia	33	83	7	18	40	100
	Presencia	4	17	20	83	24	100
Total		37	58	27	42	64	100

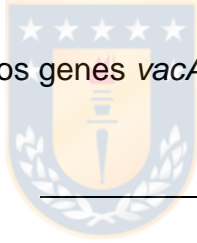
p= 0,000; kappa = 0,64. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.5. Asociación entre los genes *cagA* y *vacAm2*.

		<i>cagA</i>					
		Ausencia		Presencia		Total	
		N	%	N	%	n	%
<i>vacAm2</i>	Ausencia	4	20	16	80	20	100
	Presencia	33	75	11	25	44	100
Total		37	58	27	42	64	100

$p= 0,000$; $\kappa = -0,45$. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.6. Asociación entre los genes *vacAs2* y *vacAm1*.



		<i>vacAs2</i>					
		Ausencia		Presencia		Total	
		N	%	N	%	N	%
<i>vacAm1</i>	Ausencia	9	23	31	78	40	100
	Presencia	18	75	6	25	24	100
Total		27	42	37	58	64	100

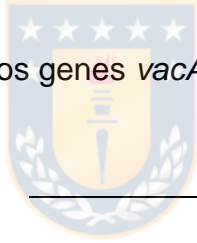
$p= 0,000$; $\kappa = -0,47$. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.7. Asociación entre los genes *vacAs2* y *vacAm2*.

		<i>vacAs2</i>					
		Ausencia		Presencia		Total	
		N	%	N	%	n	%
<i>vacAm2</i>	Ausencia	19	95	1	5	20	100
	Presencia	8	18	36	82	44	100
Total		27	42	37	58	64	100

$p= 0,000$; $kappa = 0,70$. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.8. Asociación entre los genes *vacAm1* y *vacAm2*.



		VacAm1					
		Ausencia		Presencia		Total	
		N	%	N	%	n	%
VacAm2	Ausencia	3	15	17	85	20	100
	Presencia	37	84	7	16	44	100
Total		40	63	24	38	64	100

$p= 0,000$; $kappa = -0,54$. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.9. Asociación entre el gen *vacAs1b* y el sexo de los pacientes.

		Sexo					
		F		M		Total	
		n	%	n	%	n	%
<i>vacAs1b</i>	Ausencia	26	65,0	21	87,5	47	73,4
	Presencia	14	35,0	3	12,5	17	26,6
Total		40	100,0	24	100,0	64	100,0

p= 0,049; F: Femenino; M: masculino. Fuente: Elaboración propia.

3.5.- Análisis bioinformáticos

3.5.1.- Determinación de la secuencia de aminoácidos para proteína NudA

La secuencia del gen *nudA* de *H. pylori* J99 (número de acceso: JHP1149 en www.genome.jp) se ingresó al servidor Expasy-Translate tools. Este servidor entregó seis marcos de lectura, siendo el 5´3´ Frame 3 el que posee una mayor longitud aminoacídica, con el aminoácido metionina como codón de inicio y el correspondiente codón de stop de la proteína (Figura 3.16).

La proteína *nudA* de *H. pylori* J99 posee 157 aminoácidos, con una secuencia conservada o caja nudix entre los residuos 42 a 64.

Translate Tool - Results of translation

Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames - in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

5'3' Frame 1

XXCYIKNIVL Met LRPLSCRQTTLTHAKFLSLSA Stop TLKGRGSSPKEAL Met RERPL Stop KHSIENY Stop KKLAR Met K Stop RFWRNTLDG
SP Met SQATWSINSIRLTGKSSVIF Stop CA Stop S Met LTTLI Stop TNTRQNLDPINSSSLRICKKSFPSNAKCTAKSSSLILEKRWIGV

5'3' Frame 2

XXAT Stop KISS Stop CCGHYHVARLP Stop H Met RSFYR Stop AHRH Stop RGVAVPPRRH Stop Stop GRDPFRSTL Stop RITRRNWEH Stop NRD
FGAIP Stop Met DRL Stop FPKQHGA Stop ILFV Stop RAKAALFFSAPKAC Stop QH Stop FEQTHARI Stop ILSIHPA Stop GFA Stop KNRSLQTPS
VPPSHRLF Stop KRGVFGL

5'3' Frame 3

X Met LHKKYRPNVAAIL Met SPDYPNTEVFIAERIDIEGAWQFPQGGIDEGETPLEALYRELEEIGTNEIEILAQYPRWIAYDFPSN Met
EHKFSYFDGQKQRYFLVRLKHVNNIDLNKHTPEFRSYQFIQLKDLLKIVPFKRQVYRQVIAYFRKEGYLGC Stop

3'5' Frame 1

LTPQIPLFSKISDDLAHLAFEGNDFFKQILKDELIGSKFWRVVFQINVVN Met L Stop AH Stop KITLLL PVKRIEF Met LHVAVEIIGDPSR
VLRQNLYFIRANFE Stop Stop FSIECF Stop RGLSLINASLGELPRPFNVYALSDKNFACVRRVWRHDNGRNIRTIFF Met Stop HXX

3'5' Frame 2

Stop HPKYPSFLK Stop A Met TWRYTWRLKGTIFLSKLSW Met N Stop Stop DLNSGVCLFKS Met LLTCFRRTKK Stop RCFPCSNE Stop NLCS
Met LLGKS Stop AIHLGYCAKISISFVPISSNSL Stop SASKGVSPSS Met PPWGNCHAPS Met S Met RSAIKTSHVLG Stop SGD Met I Met AATL
GRYFLCS Met XX

3'5' Frame 3

NTPNTPLF Stop NKR Stop LGGTLGV Stop RERFF Stop ANP Stop AG Stop IDRI Stop ILACVCSNQCC Stop HALGALKNNAAFARQTNRIYAPC
CLGNHRRSI Stop GIAPKSLFHSCQFLLVILYRLLKGSPLHQCLLGGTATPLQCLCAQR Stop KLR Met C Stop GSLAT Stop Stop WPQH Stop
DDIFYVACX

Figura 3.16. Secuencia de aminoácidos correspondiente a los seis marcos de lectura para el gen *nudA*. Fuente: Expasy-Translate tools (<https://web.expasy.org/translate/>).

3.5.2.- Análisis de secuencia aminoacídica

La secuencia de aminoácidos de la proteína NudA de *H. pylori*, fue ingresada a la plataforma online Blastp de NCBI con búsqueda de secuencias de proteínas no redundantes y proteínas con estructura conocida en la base de datos de Protein Data Bank (PDB).

Los resultados muestran que la principal proteína detectada corresponde a RppH (Figura 3.17), una subfamilia de las proteínas Nudix. Las enzimas RppH (RNA 5' pirofosfohidrolasa) remueve el pirofosfato del extremo 5' del ARN trifosforilado, dejando un ARN monofosfato 5'. Estas secuencias encontradas por blastp tienen un porcentaje de identidad de alrededor del 36%.



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Chain A, Solution Structure Of The Nudix Enzyme Diadenosine Tetraphosphate Hydrolase From Lupinus Angustifolius L	107	107	91%	5e-30	37%	1F3Y_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of E. Coli RppH Bound To Sulfate Ions	92.0	92.0	91%	6e-24	36%	4S2W_A
<input type="checkbox"/> Chain B, Crystal structure of E. coli RppH-DapF complex, monomer	92.0	92.0	91%	6e-24	36%	6D1Q_B
<input type="checkbox"/> Chain B, Crystal structure of E. coli RppH-DapF complex, monomer bound to RNA	92.0	92.0	91%	7e-24	36%	6D1V_B
<input type="checkbox"/> Chain A, E. Coli RppH Structure, Ki Soak	91.7	91.7	91%	7e-24	36%	4S2V_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Solution structure of RNA Pyrophosphohydrolase RppH from Escherichia coli	91.7	91.7	91%	9e-24	36%	2KDV_A
<input type="checkbox"/> Chain B, Crystal structure of E. coli RppH-DapF complex	91.7	91.7	91%	1e-23	36%	6D13_B
<input type="checkbox"/> Chain A, Solution structure of RppH mutant E53A from Escherichia coli	89.7	89.7	91%	5e-23	35%	2KDW_A
<input type="checkbox"/> Chain A, The Crystal Structure Of Nudix Hydrolase From Rhodospirillum Rubrum	44.3	44.3	35%	7e-06	41%	3R03_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Structure Of The Rna Pyrophosphohydrolase Bdrpph	42.7	42.7	22%	3e-05	57%	3EES_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal structure of mutator mutT from Bartonella henselae	40.0	40.0	23%	2e-04	46%	3HHJ_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of Ndx2 In Complex With Mg2+ From Thermus Thermophilus Hb8	37.0	37.0	59%	0.004	34%	2YVM_A
<input type="checkbox"/> Chain A, 2.60Å resolution structure of CT771 from Chlamydia trachomatis	35.4	35.4	44%	0.010	34%	4ILQ_A
<input type="checkbox"/> Chain A, Crystal Structure Of A MutNUDIX FAMILY PROTEIN FROM BACILLUS Thuringiensis	35.4	35.4	16%	0.011	56%	3SMD_A

Figura 3.17. Proteínas de base de datos similares NudA. Búsqueda de proteínas en Blastp con base de datos de Protein Data Bank (PDB). Fuente: Blastp, NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

3.5.3.- Alineamiento de secuencias

3.5.3.1.- Determinación de secuencia conservada para las subfamilias de NUDIX

Se realizó un alineamiento de la secuencia de NudA de *H. pylori* con las secuencias obtenidas desde PDB de las subfamilias de Nudix, utilizando el software MUSCLE y el programa Genedoc 2.7. Se determinó la posición de los residuos conservados de la caja Nudix, los residuos del sitio catalítico y los residuos del sitio de unión al sustrato, entre las secuencias de proteínas para cada subfamilia.



En las figuras 3.18, 3.19, 3.20, 3.21 y 3.22 se aprecia la caja Nudix en un cuadro rojo para las subfamilias ADPRP, GDPMH, MutT, AP4AP y RppH, respectivamente. Esta caja Nudix corresponde a una secuencia altamente conservada de 23 residuos, cuya secuencia está compuesta por GX₅EX₇REUXEEXGU, donde U es un residuo hidrofóbico voluminoso y X es cualquier residuo.

```

          *           260           *           280
1G0S:A|PDB : LEMVAGMIE-EGESVEDVARREAIIEEAG---LIVKRTKPV : 127
5C7Q:A|PDB : -EFFAGKRD-HNEETLLTAKRELLEETG-----YEAKD : 103
1MQW:A|PDB : -ELFAGLLDVAGEPPHLTAARELREEVG-----LQCAST : 104
2QJT:A|PDB : -ALPGGFLE-CDETIAQAIIRELFEEETN---INLTHEQLA : 270
NudA      : -QFPQGGID-EGETPLEALYRELLEEIGTNEIEIILAQYPR : 75
          p G           E           REl EE g

```

Figura 3.18. Alineamiento de secuencias pertenecientes a ADPRP. 1G0S: *Escherichia coli*, 5C7Q: *Bdellovibrio bacterioborus*, 1MQW: *Mycobacterium tuberculosis*, 2QJT: *Francisella tularensis*. Fuente: Elaboración propia.

```

          *           100           *           120
3069:A|PDB : LIESCAGLLDNDEPEVCIRKAAIEETGYE-VGEVRKLFEL : 118
1RYA:A|PDB : WFVPGGRVQKDETLEAAFERLTMAELGLRLPITAGQFYGV : 85
2GT2:A|PDB : WFVPGGRVQKDETLEAAFERLTMAELGLRLPITAGQFYGV : 85
NudA      : WQFPQGGIDEGETPLEALYRELLEEIGTNEIEIILAQYPR : 75
          w p g 6           et e a 4 6 E G           i           5

```

Figura 3.19. Alineamiento de secuencias pertenecientes a GDPMH. 3069: *Escherichia coli*, 1RYA: *Escherichia coli*, 2DT2: *Escherichia coli*. Fuente: Elaboración propia.

```

          *           80           *
2B06:A|PDB : GHVENDEAFAEVIREIYEETGLT-IQN----- : 69
3A6S:A|PDB : GKIEMGETPEQAVVRELQEEVGIT-PQHFSLF : 68
3HHJ:A|PDB : GKVEQGETPEASLIRELEEEELGVH-VQADNLF : 93
NudA      : GGIDEGETPLEALYRELLEEIGTNEIEIILAQY : 73
          G 6e gEtp           6 RE6 EE G           2

```

Figura 3.20. Alineamiento de secuencias pertenecientes a MutT. 2B06: *Streptococcus pneumoniae*, 3A6S: *Escherichia coli*, 3HHJ: *Bartonella henselae*. Fuente: Elaboración propia.

```

          *           100           *           120
3I7U:A|PDB : -FP--KGNIEPGEKPEETAVRE---VWEETGVKGEILDYI : 62
2DFJ:A|PDB : LLA-VFAGISRNKPKDRLTP-----LLEAPDAD-ELLNWL : 102
3QFM:A|PDB : LWHGVRKELDSTRPSQRYLLRQCQYVLEEISLE-E-IEVL : 116
NudA      : -FP--QGGIDEGETPLEALYRE---LLEEIGTN-E-IEIL : 70
          6           r           61Ee           E 6 6

```

Figura 3.21. Alineamiento de secuencias pertenecientes a AP4AP. 3I7U: *Aquifex aeolicus*, 2DFJ: *Shigella flexneri*, 3QFM: *Streptococcus pneumoniae*.

Fuente: Elaboración propia.

```

          *           60           *           80
3EES:A|PDB : VGQRPENNSIAGQWEFFGGKIENGETPEEAIARELNEELGI : 77
2KDV:A|PDB : WARRFG----QHSWQFFGGINPGESAEQAMYRELFEEVGL : 60
NudA      : IAERID---IEGAWQFFGGIDEGETPLEALYRELLEEIG- : 63
          a R           g W2FPgGgI   GE3pe2A6yREL EE6G

```

Figura 3.22. Alineamiento de secuencias pertenecientes a RppH. 3EES: *Bdellovibrio bacteriovorus*, 2KDV: *Escherichia coli*. Fuente: Elaboración propia.

3.5.3.2.- Determinación de identidad y similitud de la secuencia de NudA en relación con las subfamilias de NUDIX

A partir de los resultados obtenidos en Blastp y Protein Data Bank (PDB), se descargaron las secuencias de proteínas de las subfamilias: ADPRP, AP₄A, GDPMH, MutT y RppH de origen bacteriano. Estas se ingresaron al servidor LALIGN con la secuencia de NudA de *H. pylori* para determinar la identidad y similitud de la secuencia de esta proteína en relación con las secuencias

correspondientes a las subfamilias. Se seleccionó la mejor representante de cada subfamilia que presentaba el mayor porcentaje de identidad y similitud. El resultado se presenta en la tabla 3.10.

El mayor porcentaje de identidad (31,9 %) y de similitud (59,9 %) se obtienen en la subfamilia RppH correspondiente a la especie *E. coli* (código PDB: 2kdv) con un número de aminoácidos alineados de 153, el 93% de la proteína NudA.

De acuerdo a lo establecido por estudios anteriores (Lundin *et al.*, 2003), la proteína NudA corresponde a una proteína AP4AP. Por lo cual, los análisis de determinación de residuos del sitio catalítico y sitio de unión al sustrato se realizaron con las subfamilias AP4AP y RppH.

Tabla 3.10. Identidad y similitud de NudA con subfamilias de proteínas Nudix.

Familia	Especie	Código	Identidad (%)	Similitud (%)	Nº aminoácidos alineados
ADPRP	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	5c7q	12,5	21,1	60
GDPMH	<i>Escherichia coli</i>	3o69	5,9	18,8	57
MutT	<i>Escherichia coli</i>	3a6s	10,4	15,9	40
AP4AP	<i>Aquifex aeolicus</i>	3i7u	8,2	13,5	30
RppH	<i>Escherichia coli</i>	2kdv	31,9	59,9	153

Fuente: Elaboración propia.

3.5.3.3.- Determinación residuos del sitio catalítico y de unión al sustrato

Para determinar los residuos de aminoácidos del sitio catalítico y los residuos del sitio de unión al sustrato de las subfamilias AP4AP y RppH, se realizó una búsqueda bibliográfica de los mismo, estos se presentan en las tablas 13 y 14, respectivamente.

El alineamiento se realizó con la secuencia de NudA y *A. aeolicus* (código PDB: 3I7U) para la subfamilia AP4AP (Figura 3.23) y *E. coli* (código PDB: 2KDV) para la subfamilia RppH (Figura 3.24).

Los residuos correspondientes al sitio catalítico y sitio de unión al sustrato de la subfamilia RppH que se describen en la literatura para *E. coli* (Tabla 3.11 y 3.12), corresponden en su totalidad a residuos que se encuentran tanto en la secuencia RppH de *E. coli* (código PDB 2KDV), así como a la secuencia de NudA de *H. pylori*. Contando la secuencia de NudA con todos los aminoácidos pertenecientes a los sitios catalíticos y de unión (Figura 3.24).

Por otro lado, la secuencia de *A. aeolicus* (código PDB: 3I7U) presenta los residuos de sitio catalítico y de unión mencionados en las tablas 13 y 14. Sin embargo, la secuencia de NudA presenta 3 de 4 residuos del sitio catalítico y sólo 4 de 11 residuos de aminoácidos pertenecientes al sitio de unión al sustrato (Figura 3.23).

Tabla 3.11. Aminoácidos correspondientes al sitio catalítico de las subfamilias AP4AP y RppH.

Sub familia	Residuo aminoácido	Referencia
AP4AP	Glu47, Glu51, Lys31, Glu50	McLennan, 2006/Jeyakanthan <i>et al.</i> , 2009
RppH	Glu-53, Glu-56, Glu-57, Glu-120	Foley <i>et al.</i> , 2015

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.12. Aminoácidos correspondientes al sitio de unión al sustrato de las subfamilias AP4AP y RppH.

Sub familia	Residuo aminoácido	Referencia
AP4AP	Lys-3, Phe-5, Asn-25, Ile-34, Pro-40, Tyr-67, Trp-68, Tyr-69, Lys-78, Tyr-115, Gly-117	Jeyakanthan <i>et al.</i> , 2009
RppH	Arg-8, Arg-27, Gln-37, Gly-39, Tyr-77, Gln-95, Phe-139, Lys-140	Foley <i>et al.</i> , 2015

Fuente: Elaboración propia.

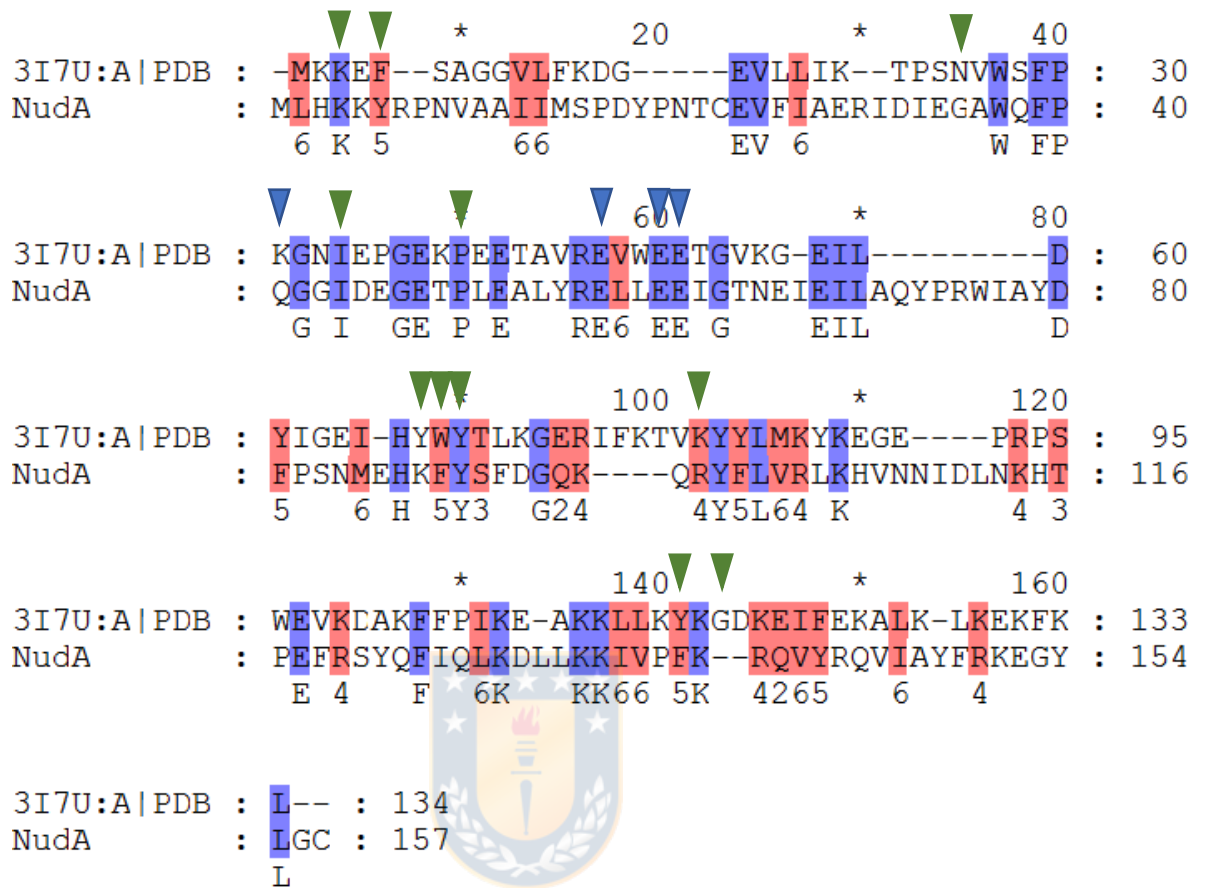


Figura 3.23. Alineamiento de NudA y AP4AP de *A. aeolicus* (código PDB:3I7U).

Los residuos que participan del sitio catalítico están determinados con un triángulo invertido azul. Los residuos que participan del sitio de unión al sustrato se muestran con un triángulo invertido verde. Fuente: Elaboración propia.

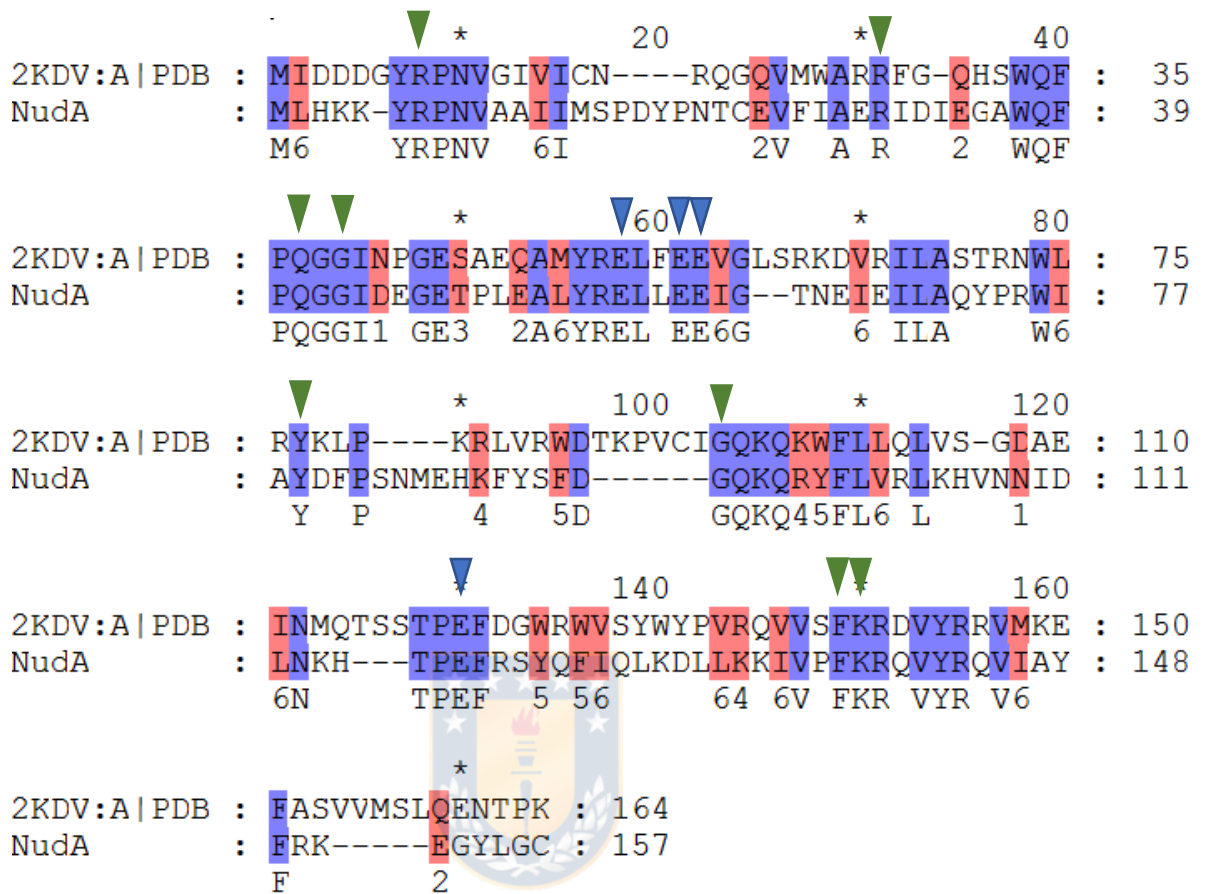


Figura 3.24. Alineamiento de NudA y RppH de *E. coli* (código PDB:2KDV). Los residuos que participan del sitio catalítico están determinados con un triángulo invertido azul. Los residuos que participan del sitio de unión al sustrato se muestran con un triángulo invertido verde. Fuente: Elaboración propia.

3.5.4.- Modelamiento de estructura de proteína con servidores

Se utilizaron distintos servidores de libre disponibilidad para la obtención de un modelo de la proteína NudA de acuerdo con los plantados utilizados por cada servidor.

La selección de los modelos se estableció de acuerdo de las características especificadas en la sección 2.6.4 de metodología. Es decir, modelos cuyo plantado corresponden a proteínas de la familia Nudix de origen bacteriano, que posean un porcentaje de identidad mayor al 30% respecto a sus plantados, una mayor cobertura de secuencia y mejor calidad del modelo de acuerdo con los parámetros establecidos por cada software.

Las tablas 3.13, 3.14, 3.15 y 3.16 muestran los plantados utilizados (código PDB y nombre), el porcentaje de identidad entre el plantado y el modelo generado, el porcentaje de cobertura de la secuencia y los indicadores de calidad del modelo establecido por cada servidor, para los servidores Swissmodel, Modbase, Phyre e I-tasser, respectivamente.

De los modelos entregados por Swissmodel (Tabla 3.13) se seleccionó el modelo cuyo plantado era *E. coli* (código 2KDV), ya que poseía el mayor porcentaje de identidad (sobre el 30 %), la mayor cobertura y los mejores índices de calidad del modelo (mayor QMEAN y GMQE).

Todos los modelos entregados por Modbase (Tabla 3.14) presentaban una identidad de secuencia menor al 30 %. Sin embargo, se seleccionó aquel que

presentó mejor identidad (25 %) y con el índice de calidad (Z-DOPE) de menor valor, este modelo corresponde al obtenido con el templado *Aquifex aeolicus* 3i7U.

El mejor modelo entregado por el servidor Phyre (Tabla 3.15), correspondió a aquel cuyo templado fue *Escherichia coli* código 2KDV, con un 37% de identidad, la mayor cobertura y el mayor índice de calidad del modelo (confianza) establecido por el servidor.

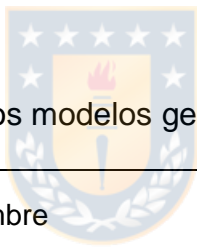
I-tasser generó un solo modelo utilizando dos templados, los cuales fueron *Escherichia coli* (código 2KDV) y *Lupinus angustifolius* (código 1F3Y), con porcentaje de identidad respecto al modelo generado de 36,0 y 39,0%, respectivamente (Tabla 3.16).

El templado de origen bacteriano que presentó mayor frecuencia en los diversos softwares utilizados y con los mejores parámetros de calidad, correspondió a *E. coli* código 2KDV. A partir de este templado se evaluó el número RMSD utilizando el programa PyMol 2.0 (Schrödinger). El número RMSD se obtiene al alinear este templado con el mejor modelo generado por cada servidor, siendo un valor más bajo un índice de menor desviación del modelo a partir de la estructura nativa (*E.coli*, código PDB: 2KDV). En la tabla 3.17 se muestra los valores RMSD para cada modelo seleccionado, en el cual es mejor índice es del modelo generado por Phyre con un menor RMSD.

Tabla 3.13. Información de los modelos generados a través de Swissmodel.

Código templado	Nombre templado	Identidad (%)	Cobertura (%)	GMQE	QMEAN
2KDV	RNA 5' pirofosfohidrolasa (RppH) de <i>Escherichia coli</i>	37,7	96,2	0,67	-3,15
3i7Ua	Hidrolasa ap4a de <i>Aquifex aeolicus</i>	19,7	93,6	0,51	-3,99
1JRK	Proteína Nudix (MutT) de <i>Pyrobaculum aerophilum</i>	18,2	94,3	0,5	-3,52

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 3.14.** Información de los modelos generados a través de Modbase.

Código templado	Nombre	Identidad (%)	Cobertura (%)	Z-DOPE
3i7U	Hidrolasa ap4a de <i>Aquifex aeolicus</i>	25,0	93,6	-0.79
3CNG	Nudix hidrolasa (MutT) de <i>Nitrosomonas europaea</i>	21,0	96,8	-0.28

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.15. Información de los modelos generados a través de Phyre.

Código templado	Nombre	Identidad (%)	Cobertura (%)	Confianza
2KDV	RNA 5' pirofosfohidrolasa (RppH) de <i>Escherichia coli</i>	37,0	94,3	99,95
4DYW	Nudix hidrolasa MutT de <i>Burkholderia pseudomallei</i>	20,0	90,4	99,86

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.16. Información de los modelos generados a través de I-tasser.

Código templado	Nombre	Identidad (%)	Score
2KDV	RNA 5' pirofosfohidrolasa (RppH) de <i>Escherichia coli</i>	36,0	0,072
1F3Y	Nudix diadenosina tetrafosfato hidrolasa de <i>Lupinus angustifolius</i>	39,0	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.17. Valores RMSD de la estructura nativa con los modelos seleccionados para cada servidor.

Servidor	N° RMSD	Rango cobertura
Swissmodel	0,11	1-151
Modbase	2,851	5-151
Phyre	0,048	4-151
I-tasser	1,063	1-157

Fuente: Elaboración propia.

3.5.5.- Determinación calidad del modelo

Se determinó que el mejor modelo de los cuatro servidores utilizados fue el obtenido con Phyre. Este modelo fue analizado para determinar su calidad a través de los servidores: Procheck y ProSa. Procheck se utilizó para verificar el número de residuos fuera de las zonas permitidas del gráfico de Ramachandran y ProSa se utilizó para calcular la calidad global y local del modelo.

En la figura 3.25 es posible observar el gráfico de Ramachandran que muestra las zonas más favorables (sección roja) donde no hay impedimentos estéricos, las zonas adicionales permitidas (sección amarilla), zonas generosamente permitidas (sección beige) y zonas prohibidas (sección blanca). Dentro de la zona adicionalmente permitida se encuentran 5 residuos que no corresponden a glicina o prolina. En las zonas generosamente permitidas se encuentra un residuo que no es glicina o prolina, corresponde a Lisina (Lys-5); y en la zona

no permitida se encuentra un residuo de valina (Val-107). La zona no permitida son zonas estéricamente no permitidas para todos los aminoácidos, excepto para Glicina que es el único aminoácido que no presenta cadena lateral.

Z-score entregado por ProSa (Figura 3.26) indica la calidad general del modelo. Su valor de -1,82 se muestra en el gráfico que contiene los z-score de todas las estructuras de proteínas determinadas experimentalmente, rayos X (celeste) y RMN (azul), que se encuentran en la actual base de datos de Protein Data Bank.

Este gráfico se utiliza para verificar que el z-score de la estructura del modelo de la proteína NudA, se encuentra dentro del rango de puntajes típicamente encontrados para proteínas nativas de tamaño similar.

Debido los resultados anteriormente presentados, específicamente por el gráfico de Ramachandran, surge la necesidad de mejorar el modelo a través del programa Modeller.

PROCHECK

Ramachandran Plot

4660170

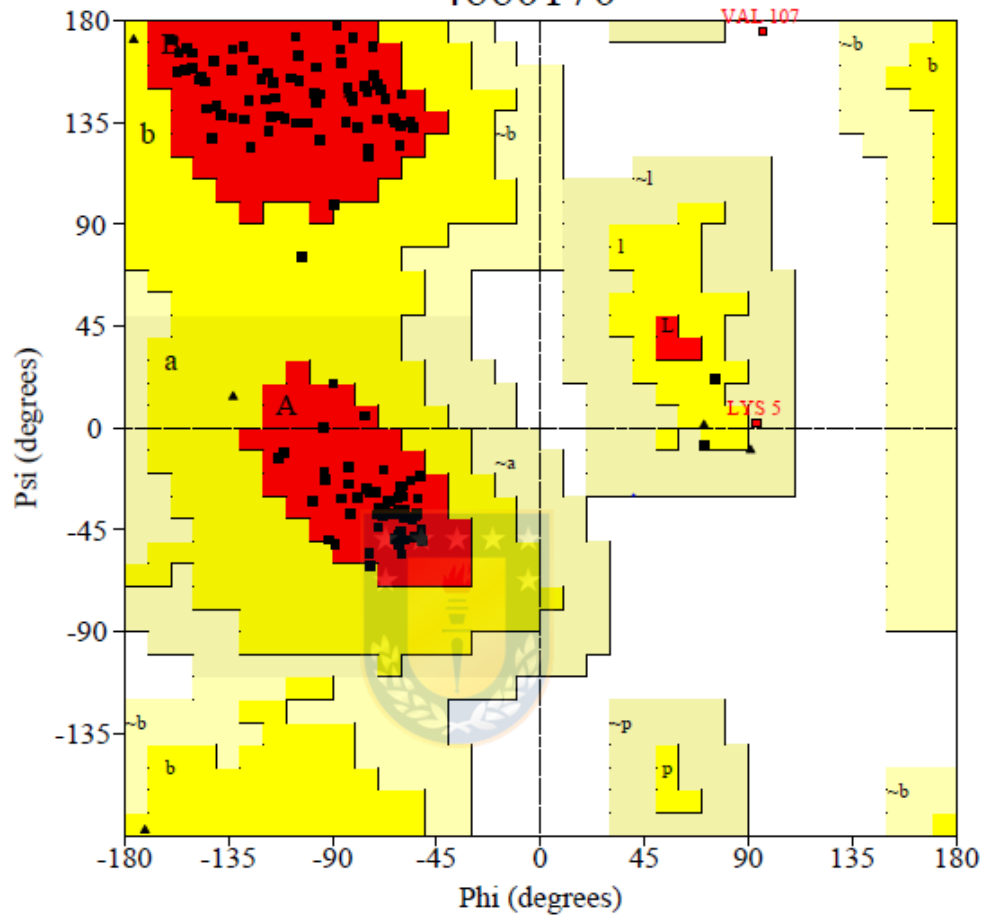


Figura 3.25. Gráfico de Ramachandran para modelo de NudA generado por Phyre. Distribución de los residuos en las distintas zonas permitidas para la conformación de la proteína: los residuos en las zonas más favorables (rojo), zonas adicionales permitidas (amarillo), generosamente permitidas (beige) y zonas prohibidas (blanco). Residuos de glicina representadas por triángulos. Fuente: Servidor Procheck (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>).

Overall model quality

Z-Score: **-1.82**

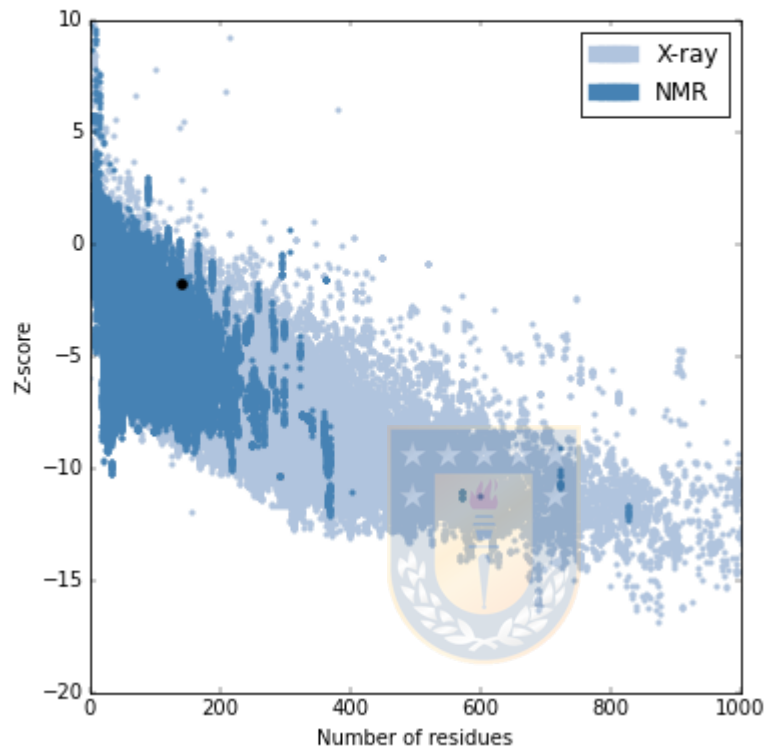


Figura 3.26. Z-score para modelo de NudA generado por Phyre. Calidad del modelo entregado por Z-score a través del servidor ProSa para la estructura de la proteína NudA obtenido. Fuente: Servidor ProSa (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>).

3.5.6.- Modelaje comparativo con Modeller

A partir del modelo obtenido con Phyre se realizaron modificaciones utilizando el programa Modeller. Estas modificaciones consistieron en la introducción de estructuras extendidas o láminas beta y α -hélice, teniendo como referente el templado de *E. coli* (código PDB: 2KDV).

En la figura 3.27 se muestra el grafico de Ramachandran para el modelo modificado, en esta oportunidad es posible apreciar que el modelo no cuenta con residuos de aminoácidos en las zonas prohibidas. En la zona generosamente permitida se encuentran dos residuos correspondientes a glicina y en la zona adicionalmente permitida se encuentran 7 residuos.

Por otro lado, los resultados obtenidos con ProSa muestran un valor Z-score de -5,2 (Figura 3.28) lo cual indica que el modelo ha mejorado en relación con el anterior modelo presentado, encontrándose dentro del rango de puntajes obtenidos para proteínas de tamaño similar.

Frente a todos los análisis presentados, es que se seleccionó el modelo presentado en la figura 3.29 como el modelo final para la proteína NudA de *H. pylori* J99. Este modelo cuenta con siete estructuras extendidas (amarillo) y seis α -hélice (rojo).

PROCHECK

Ramachandran Plot

8687553

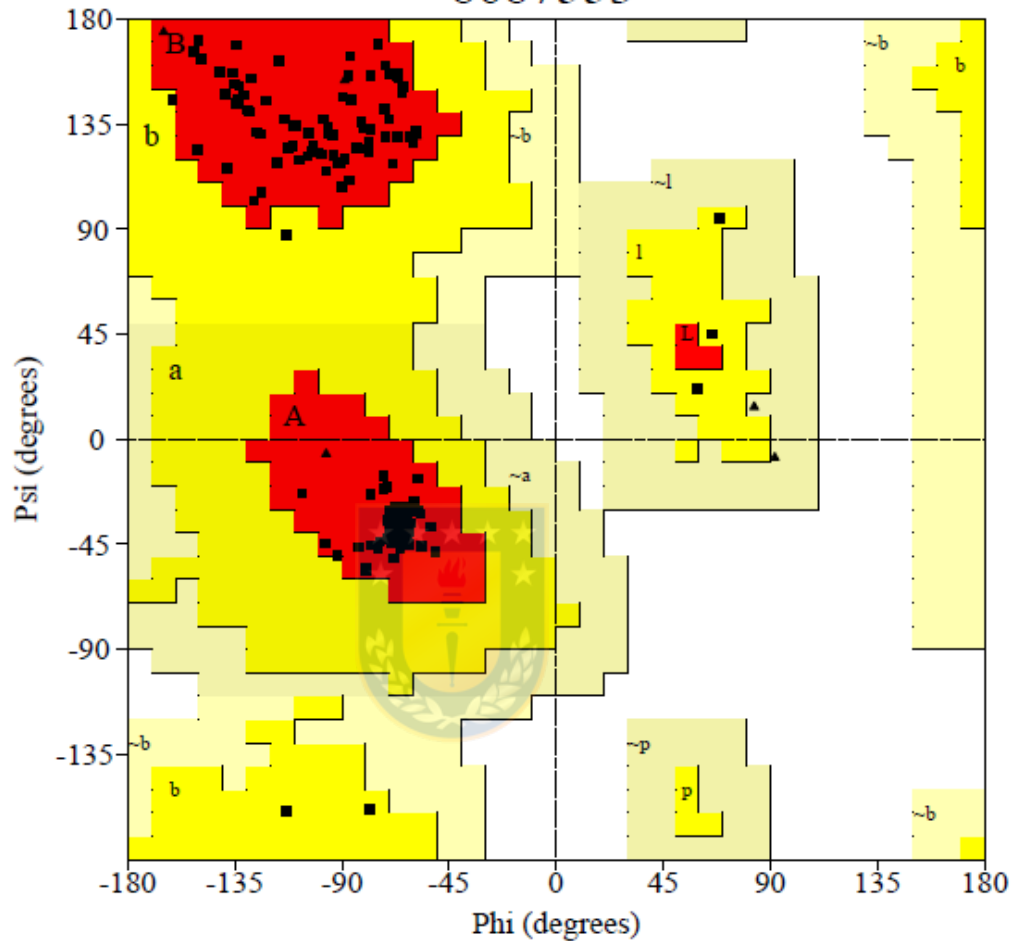


Figura 3.27. Gráfico de Ramachandran para modelo de NudA mejorado a través de Modeller. Distribución de los residuos en las distintas zonas permitidas para la conformación de la proteína: los residuos en las zonas más favorables (rojo), zonas adicionales permitidas (amarillo), generosamente permitidas (beige) y zonas prohibidas (blanco). Residuos de glicina representadas por triángulos. Fuente: Servidor Procheck (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>).

Overall model quality

Z-Score: **-5.28**

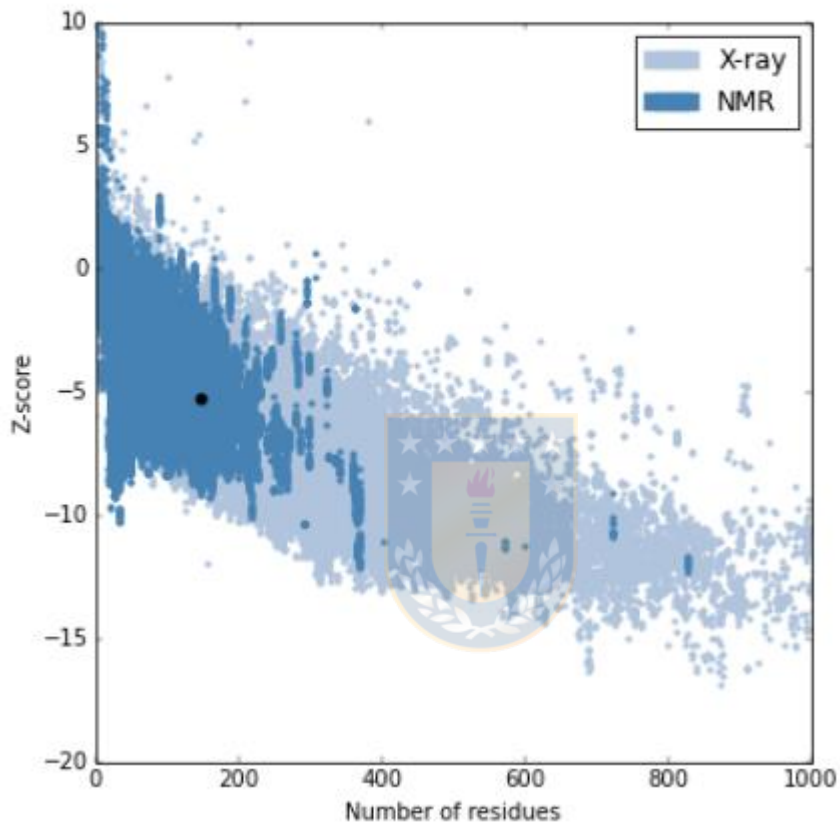


Figura 3.28. Z-score para modelo de NudA mejorado a través de Modeller. Calidad del modelo entregado por Z-score a través del servidor ProSa para la estructura de la proteína NudA obtenido. Fuente: Servidor ProSa (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>).

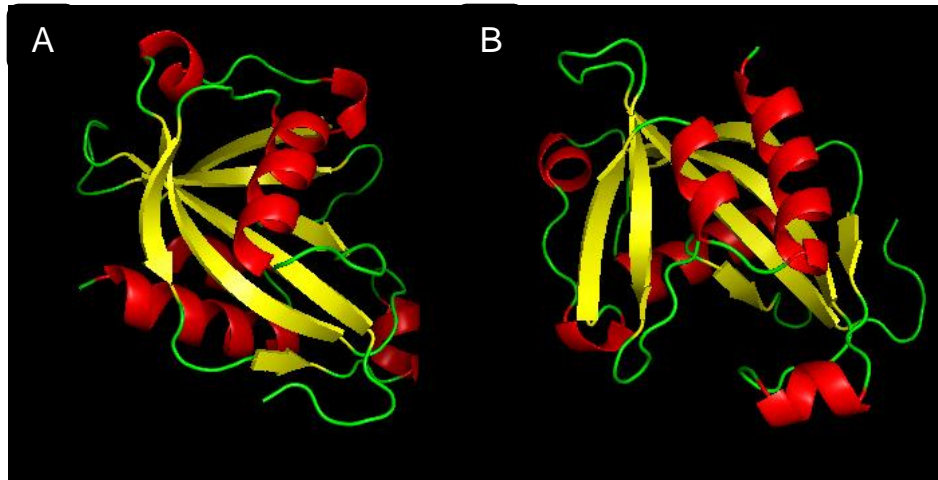


Figura 3.29. Modelo de la proteína NudA. Estructuras extendidas presentadas en amarillo, α -hélice presentadas en rojo y loops presentados en verde. A) Presentación de las estructuras extendidas 1-5 y estructuras α -hélice 1-5. B) Presentación de las estructuras extendidas 6-7 y estructuras α -hélice 6. Fuente: Elaboración propia a través del programa Modeller.

3.5.7.- Determinación de identidad y similitud de la secuencia de NudA en relación con secuencias de invasinas

A partir de base de datos de UniProt, se descargaron las secuencias de proteínas invasinas de las especies *Y. enterocolitica* W22703, *Y. pseudotuberculosis* IP32953, y *S. typhimurium* ATCC 700720. Estas se ingresaron al servidor LALIGN con la secuencia de NudA de *H. pylori* para determinar la identidad y similitud.

Los análisis de alineamiento con las tres secuencias de invasinas presentaron bajos porcentajes de identidad y similitud (Tabla 3.18), siendo mayor en *S. typhimurium* ATCC 700720 con un porcentaje de identidad y de similitud de 7,9 % y 16,5 %, respectivamente.

Tabla 3.18. Identidad y similitud de la proteína NudA respecto a invasinas de especies bacterianas.

Especie	Identidad (%)	Similitud (%)	Nº Aminoácidos
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4,5	11,5	32
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	6,8	15,2	43
<i>Salmonella typhimurium</i>	7,9	16,5	51

Fuente: Elaboración propia.

4.- DISCUSIÓN

Desde el descubrimiento de *H. pylori* por Warren y Marshall en 1983 (Warren & Marshall, 1983), se ha determinado la prevalencia actual de esta bacteria a nivel mundial es del 50%, variando entre países desarrollados como Estados Unidos, Canadá (ambos con un 30% de prevalencia), Europa Occidental (40%) y Australia (15%) en comparación con países en vías de desarrollo como Brasil (82%) (Lee & Derakhshan, 2013).

Se ha descrito que para nuestro país la prevalencia de esta bacteria es desde un 70% (Ferrecio *et al.*, 2007; Ferrer *et al.*, 2014; Merino *et al.*, 2018) hasta un 90% de la población (Figueroa *et al.*, 1997). En el presente estudio se obtuvo una presencia de *H. pylori* del 43,8%, es decir en 64 pacientes de un total de 146 individuos que acudieron al centro médico con indicación de endoscopia digestiva alta. Diversos estudios realizados también en Chile han obtenido porcentajes de presencia de *H. pylori* similares para individuos sintomáticos a los detectados en el presente trabajo. Tal es el caso de pacientes sintomáticos reclutados durante los años 2005 y 2007, donde el 42,6% de los pacientes (182 de 427) fue positivo para la infección por *H. pylori* a través de cultivo microbiológico, confirmado por técnicas moleculares (García *et al.*, 2012). Por otro lado, un estudio nacional realizado a través de análisis moleculares a partir de biopsias gástricas recolectadas entre 2003 y 2007, determinó que la detección de *H. pylori* en pacientes adultos fue de 48,7%, lo que equivale a 768 individuos. (García *et al.*, 2009a). De igual manera, durante el año 2009 se

reportaron porcentajes de presencia de *H. pylori* similares a los detectados en el presente estudio, siendo de 42,6% (84 pacientes) de un total de 197 individuos (García *et al.*, 2009b) a través de técnicas de microbiología tradicional. Un estudio realizado el 2011 en pacientes de la ciudad de Valdivia (Chile), mostró resultados similares a los anteriores, donde el 41,3% de los pacientes (99) estudiados de un total de 240, presentaron test positivo para *H. pylori* (Otth *et al.*, 2011) por medio de técnicas moleculares. Resultado similar al encontrado en un estudio realizado en Santiago, donde detectaron *H. pylori* en un 44,9% (124) de los pacientes (Toledo *et al.*, 2007). La discrepancia entre los porcentajes de detección de *H. pylori* entre los estudios mencionados y lo establecido para nuestro país, radica en que estos estudios se realizaron con pacientes sintomáticos a la infección de esta bacteria que acuden a los centros médico por necesidad de endoscopía digestiva alta; a diferencia de estudios donde obtienen porcentajes cercanos al 70% donde se considera a individuos sintomáticos y asintomáticos. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede determinar que la prevalencia de *H. pylori* en la población adulta sintomática se mantiene relativamente constante respecto a una década atrás.

Se ha establecido que una vez producida la infección en la mucosa gástrica, esta bacteria puede llevar a generar gastritis aguda, gastritis atrófica y metaplasia intestinal, la cual puede progresar a una displasia y posteriormente a cáncer gástrico (Sachs & Scott, 2012). El desarrollo de una u otra patología está

asociada a una compleja interacción de diversos factores. Existiendo una relación entre factores de la respuesta de sistema inmune del huésped, del medioambiente, alimentarios, nivel socioeconómico y factores genéticos del huésped y los correspondientes asociados a la bacteria (Figueiredo *et al.*, 2002). Esta compleja red de factores contribuiría al desarrollo de las patologías gástricas posterior al momento de la infección. Un componente de gran importancia es la producción de factores de virulencia de parte de *H. pylori*, tal como *cagA* y *vacA*. CagA es capaz de desencadenar alteraciones en las uniones de adherencia celular y la integridad celular, afectar procesos como respuestas inflamatorias, proliferación y polaridad celular (Amieva *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2009) Por otro lado, VacA induce a vacuolización celular y una serie de señalización en cascada que desencadena en apoptosis de las células epiteliales (Kathoon *et al.*, 2016).

Anteriormente (García *et al.*, 2009b), mediante análisis moleculares de biopsias gástricas reclutadas entre los años 2003 y 2007, determinaron que los porcentajes de detección para los genes *cagA* fue de 29.4%, *vacAs1a* en 46.5%, *vacAs1b* en 28.3%, *vacAs2* en 41.7%, *vacAm1* en 52.7% y *vacAm2* en 61.8%. Estos valores difieren de los encontrados en el presente estudio, en donde el 42,1% de los pacientes fue positivo para *cagA*, 12,5% para *vacAs1a*, 26,6% para *vacAs1b*, 57,8% para *vacAs2*, 37,5% para *vacAm1*, 68,8% para *vacAm2*. Los resultados actuales muestran un aumento de prevalencia de los genes *cagA*, *vacAs2* y *vacAm2*; en cambio una disminución de los genes

vacAs1a y *vacAm1*. Por otro lado, la prevalencia de gen *vacAs1b* se mantiene constante. Esto indica un cambio de los genotipos circulantes de *H. pylori* en la población local de la comuna de Concepción. La disminución de prevalencia de los genes *vacAs1a* y *vacAm1* y aumento de los genes *vacAs2* y *vacAm2* es beneficioso desde el punto de vista epidemiológico, ya que *vacAs2* y *vacAm2* se asocian con una baja citotoxicidad a diferencia de cepas positivas para *vacAs1a* y *vacAm1* que se asocian con una alta vacuolización celular, mayor nivel de citotoxicidad y mayor riesgo de progresión a lesiones premalignas y cáncer gástrico (Kathoon *et al.*, 2016). Por otro lado, la prevalencia de gen *vacAs1b* se mantiene constante y la presencia de *cagA* ha aumentado. La presencia del genotipo *cagAvacAs1* en conjunto con *vacAm1* se ha asociado a daños gástricos severos como úlceras gástricas y metaplasia (Melo-Narváez *et al.*, 2018). Por lo tanto, no se debe descuidar la vigilancia tanto local como nacional de prevalencia de genes de virulencia en cepas circulantes de *H. pylori* debido a las asociaciones con diversas patologías gástricas y evitar precozmente el desarrollo de lesiones premalignas.

Dentro de Latinoamérica el porcentaje de los genes de virulencia varía considerablemente de acuerdo con la zona geográfica. En Argentina se ha reportado prevalencias del 68,2% (Jiménez *et al.*, 2013) y 80% (Medina *et al.*, 2017) para el gen *cagA*. En Cuba este porcentaje es de 56% en pacientes con enfermedades del aparato digestivo superior (Feliciano *et al.*, 2015). Por otro lado, para Colombia se ha reportado valores menores: 48,1% para este gen

(Melo-Narváez *et al.*, 2018). Los datos nacionales proporcionados por la actual investigación (42,1%) son similares a los detectados en Colombia, y de acuerdo con el panorama latinoamericano seríamos el país donde *cagA* tiene la menor prevalencia en la población sintomática.

La presencia de los alelos del gen *vacA* también varía de acuerdo con la localización geográfica. En Colombia la presencia de los alelos *vacAs1*, *vacAs2*, *vacAm1* y *vacAm2* es de 46,3%; 53,7%; 38,0% y 62,0%, respectivamente (Melo-Narváez *et al.*, 2018). En Venezuela (Villalobos *et al.*, 2015) la frecuencia de los alelos *vacAs1*, *vacAs2*, *vacAm1* y *vacAm2* fue 80,95%; 28,57%; 95,23% y 33,33%. La perspectiva nacional es similar a la detectada en Colombia, teniendo frecuencia de los genes *vacAs2* (57,8%), para *vacAm1* (37,5%) y *vacAm2* (68,8%) bastante similares respecto a los detectados por Melo-Narváez *et al.* (2018) y en ambos casos con una mayor prevalencia de los genes *vacAs2* y *vacAm2* sobre *vacAs1* y *vacAm1*. Se ha encontrado que la distribución de los alelos de las regiones s y m en América del Sur y Central son similares a las encontradas en España y Portugal, y perfiles de los alelos de *vacA* de Europa del norte son similar al perfil encontrado en países de América del norte (Van Doorn *et al.*, 1999). La distribución de los genotipos de *vacA* puede reflejar una relación social-cultural entre ambos continentes a través de la colonización de ciclos pasados de estas áreas geográficas.

En el presente estudio se determinó relaciones entre los genes de virulencia, encontrando relaciones directas entre *cagA* con *vacAm1* y *vacAs2* con *vacAm2*;

e indirectas entre *cagA* con *vacAs2*, *cagA* con *vacAm2*, *vacAs2* con *vacAm1*, *vacAm1* con *vacAm2*. En estudios anteriores se ha determinado una asociación significativa entre la presencia de *cagA* con el genotipo *vacA s1/m1*, y la ausencia de *cagA* con el genotipo *vacA s2/m2* (Melo-Narváez *et al.*, 2018). Asociándose *cagA* con los alelos de *vacA* más citotóxicos, reforzando los resultados obtenidos en el presente estudio para las relaciones del gen *cagA*. Respecto a la relación entre *vacAs2* con *vacAm2*, se ha encontrado que el alelo *vacAs2* suele estar asociado a m2 y es menos frecuente a nivel latinoamericano que el genotipo *vacAs1m1* (Van Doorn *et al.*, 1999; Villalobos *et al.*, 2015), poseyendo un efecto vacuolizante leve a nulo con un ligero daño a la mucosa (Khatoon *et al.*, 2016). Por otro lado, el hecho que se haya encontrado una relación indirecta entre *vacAs2* con *vacAm1*, tiene sentido desde el punto de vista genotípico de *H. pylori*, ya que el genotipo *vacAs2m1* es raramente encontrado y se ha asociado con la incapacidad de producir vacuolas (Khatoon *et al.*, 2016).

Diversos estudios han mostrado una relación entre la presencia de genes de virulencia de *H. pylori*, con el desarrollo de patologías gástrica de diversas índoles (Melo-Narváez *et al.*, 2001; García *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2009; Alaoui *et al.*, 2013; Salimzadeh *et al.*, 2015). Habiendo una diferencia entre el daño gástrico en el individuo y el genotipo presentado. Tal es el caso de *cagA* que induce elongación celular a través de la activación de un oncogén que desencadena alteraciones en las uniones de adherencia celular y altera la

integridad de la célula (Amieva *et al.*, 2003; Kathoon *et al.*, 2016). Por otro lado, el gen *vacA* posee variaciones alélicas en las regiones media (alelos m1 y m2) y de señal (alelos 21 y s2 y subtipos); teniendo una mayor actividad citotóxica las cepas *vacAs1m1* a diferencia de cepas *vacAs1m2* y *vacAs2m2* (Kathoon *et al.*, 2016).

Ciertas asociaciones entre genes generan un mayor daño gástrico, tal es el caso del genotipo *cagAvacAs1babA2* asociada al desarrollo de cáncer gástrico (Wroblewski *et al.*, 2010). También se ha visto el caso de la presencia conjunta de *cagAvacA s1/m1* presente mayormente en pacientes con gastritis crónica y metaplasia (Melo-Narváz *et al.*, 2018). En el presente estudio, solo *cagA* muestra significancia estadística al relacionarse con el daño gástrico; y cuando se realizó el análisis de relación entre los diversos genes estudiados, se observó que la presencia de *cagA* en conjunto con los genes *nudA/htrA* estaba relacionada con la patología gástrica ($p= 0,015$) a diferencia cuando se encontraba ausente (*nudA+/htrA+/cagA-*; $p>0,05$). Por otro lado, no se encontró significancia entre el daño gástrico y el genotipo *vacAs1m1/cagA+* respecto al *vacAs1m1/cagA-* ($p>0,05$).

Uno de los motivos por el cual se detecta esta diferencia significativa, es porque la presencia de estos tres genes tiende a aumentar a medida que aumenta la gravedad de la patología gástrica. Hasta el momento no se ha asociado la presencia de los genes *nudA* y *htrA* con las patologías gástricas. Por lo cual este estudio nos permitiría evaluar a los genes *nudA* y *htrA* como potenciales

marcadores de patogenicidad de *H. pylori*. Sin embargo, es necesario ser cuidadosos respecto a esta determinación, ya que se ha establecido que *nudA* y *htrA* están ampliamente presente en diversas muestras de *H. pylori* (Lundin *et al.*, 2003; Tegtmeyer *et al.*, 2016). Es necesario realizar otros estudios para determinar de manera inequívoca la relación de estos genes con la gravedad de la patología gástrica.

La presencia de ciertos genes de virulencia no sólo está involucrada en el desarrollo de patologías gástricas, también se han determinado en la persistencia de la infección por *H. pylori* en infantes. El 84% de los niños con una infección persistente de *H. pylori* presentan el gen *cagA*, habiendo diferencia significativa respecto a aquellos individuos con una infección transitoria (O’Ryan *et al.*, 2015). Lo mismo ocurre con *vacAs1*, en donde se detectó en un 66% de los individuos; siendo el genotipo más prevalente en una infección persistente la presencia de *cagAvacAs1m1* (O’Ryan *et al.*, 2015). Sería interesante evaluar en futuros estudios si la presencia de los genes *nudA* y *htrA* están involucrados con la persistencia o transitoriedad de la infección por *H. pylori*.

La diversidad genética entre diversos aislados de *H. pylori* inclusive dentro de un mismo individuo, se puede entender en base a la diversidad genética humana y las condiciones del nicho biológico en el cual debe permanecer. Además, una colonización con múltiples cepas de *H. pylori* permite la transferencia horizontal de genes, favoreciendo la adaptación y colonización,

potenciando infecciones más virulentas con el fin de persistir durante años o inclusive décadas. Se ha documentado la presencia de más de una cepa en un mismo paciente ya desde los años 1995, 1996 y 1997 (Patra *et al.*, 2010). Siendo un evento relativamente común; sin embargo, no se ha podido determinar si la co-infección ocurre al mismo tiempo o una cepa después de la otra. En el presente trabajo se determinó que el 20,3% del total de los individuos presentaban infecciones por cepas mixtas de *H. pylori*, encontrándose amplificaciones simultáneas de los genotipos *vacAs1a*, *vacAs1b*, *vacAs2*, *vacAm1* y *vacAm2*. Este porcentaje es similar al encontrado en años anteriores en una población nacional adulta, siendo de 23.7% y aumentando a 36% en infantiles (García *et al.*, 2009). En otros países como Portugal, el porcentaje de infección por múltiples cepas en la población adulta alcanza el 37,3 % de un total de 319 individuos analizados, observándose que son más frecuentes en pacientes con úlceras duodenales (Figueiredo *et al.*, 2002). Por otro lado, en un estudio realizado en India observaron una multi-infección en el 100% de los individuos analizados (n = 30), siendo úlcera duodenal donde existía un mayor número de muestras que presentaban 3 o más cepas en un mismo individuo (Patra *et al.*, 2010). Un estudio realizado durante el año 2016, parece indicar que el estado de desarrollo de un país influenciaría la prevalencia de co-infección. En este caso, Ben Mansour *et al.* (2016) determinaron que un país en vías de desarrollo como Túnez, poseía un mayor porcentaje de prevalencia de multi-infecciones por *H. pylori* (48%) a

diferencia de un país desarrollado como Francia (5%). Nuestro país se encuentra en vías de desarrollo, pero cuenta con altos estándares en calidad alimenticia y agua potable, esto influye en el porcentaje de prevalencia de co-infección no sea tan alto como el descrito en Túnez.

Para conocer y comprender la naturaleza del gen y de la proteína NudA, y determinar si corresponde a una invasina es que en el presente estudio se realizó un estudio bioinformático de la misma.

Lundin *et al.* (2003) clasificaron a esta proteína como una hidrolasa AP4A, que hidroliza el dinucleótido diadenosina tetrafosfato dando como resultado moléculas de ATP y AMP. Sin embargo, de acuerdo con los análisis bioinformáticos realizados, el porcentaje de identidad y similitud de la proteína NudA de *H. pylori* con la hidrolasa AP4A fueron unos de los más bajos detectados entre las subfamilias, de 8,2 y 13,5% respectivamente. Por otro lado, los mayores porcentajes de identidad y similitud se obtienen para la subfamilia RppH, siendo de 31,9% y 59,9%, respectivamente. Estas diferencias de identidades entre NudA y las subfamilias también se observaron en los alineamientos de la caja Nudix (GX₅EX₇REUXEEXGU).

Cada subfamilia de las proteínas Nudix posee residuos del sitio catalítico y de unión al sustrato característicos entre ellos (Maksel *et al.*, 2001; Kang 2003; Gabelli *et al.*, 2004; McLennan 2006; Jeyakanthan *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2010; Foley *et al.*, 2015). En los análisis realizados se determinó que la proteína

NudA de *H. pylori* y la proteína representante de la subfamilia AP4A tenían en común 3 de 4 residuos (75%) del sitio catalítico y 4 de 11 residuos (36,4%) del sitio de unión al sustrato (McLennan, 2006; Jeyakanthan *et al.*, 2009). Dentro de los 7 residuos restantes, sólo 4 de la secuencia de NudA poseían similitud respecto a la secuencia de AP4A: Y-6, F-89, F-137 (apolares) y R-98 (polar). A diferencia del análisis realizado para el representante de la subfamilia RppH, en que el 100% de los residuos de la secuencia de NudA correspondían a los residuos del sitio catalítico y de unión al sustrato de la secuencia de RppH (Foley *et al.*, 2015). El modelamiento de la proteína NudA de *H. pylori* también da indicios de la naturaleza de NudA. La mayoría de los servidores utilizados utilizaban como molde la proteína RppH de *E. coli*. RppH o RNA 5' Pirofosfohidrolasa es una enzima que remueve el pirofosfato desde el extremo 5' del ARN trifosforilado y difosfato a ARN 5' monofosfato, esencial para la célula y ampliamente distribuido en bacterias, arqueas y eucariontes (Mildvan *et al.*, 2005).

En un estudio publicado en el año 2017, evaluaron la cepa *H. pylori* 26695 para determinar la presencia de proteínas Nudix, encontraron a dos potenciales secuencias de aminoácidos como potenciales proteína Nudix: HP1228 y HP0507. Sin embargo, la secuencia de HP0507 no posee aminoácidos conservados de la caja Nudix, a diferencia de HP122. La proteína codificada en HP1228 en *H. pylori* 26695 es homóloga a la proteína NudA de *H. pylori* J99 (JHP1149), teniendo un porcentaje de identidad del 94,8% y un 100% de

similitud (datos no mostrados). Este mismo equipo de investigación determinó a través de análisis enzimáticos que HP1228 corresponde a una RppH, capaz de hidrolizar trifosfatos 5' terminales a monofosfatos.

Se ha visto que mutantes de la proteína NudA en *H. pylori* disminuyen la resistencia a la exposición de peróxido de hidrógeno (Lundin *et al.*, 2003) y disminuyen su capacidad de invadir líneas celulares de adenocarcinoma gástrico (Liu *et al.*, 2012), proponiendo que esta proteína estaría involucrada en la invasión de células eucariontes. Por otro lado, se ha reportado que el gen *ialA* (locus asociado a invasión) de *B. bacilliformis* corresponde a una proteína nudix, que hidroliza dinucleósidos polifosfatos con una alta actividad sobre AP4A (Conyers & Bessman, 1999). No estando claro aún el rol que juega esta proteína nudix sobre la invasión.

Los antecedentes reunidos a través de los análisis bioinformáticos realizados en el presente trabajo dan indicio de que la proteína NudA es una RNA 5' pirofosfohidrolasa capaz de catalizar la hidrólisis de trifosfatos y difosfato a monofosfato. Probablemente la incapacidad de *H. pylori* (Δ nudA) de ingresar a células, sea debido a una incapacidad de la bacteria de acceder a un mecanismo postranscripcional que controlan la expresión génica, más aún considerando que hasta el momento es la única enzima Nudix descrita en *H. pylori* que puede degradar nucleósidos y nucleótidos.

Es la primera vez que se detecta el gen *nudA* y *htrA* en biopsias gástricas chilenas. El gen *htrA* tuvo un alto porcentaje de detección, esto sugiere la capacidad de gran parte de las cepas presentes en la población de ingresar a las membranas basolaterales de células epiteliales gástricas. Esta característica, sumada a la capacidad de ingresar a células epiteliales, dificultaría el éxito del tratamiento de erradicación de *H. pylori*, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas investigaciones que profundicen la naturaleza invasiva de esta bacteria y se continúe investigando la importancia de los genes *nudA* y *htrA* en lesiones gástricas precancerosas.



5. CONCLUSIONES

- La prevalencia de *H. pylori* en pacientes sintomáticos con indicación médica de endoscopía digestiva alta es similar a las registrada en años anteriores, inclusive aquellos registrados hace más de una década.
- Respecto a años anteriores ha variado la prevalencia de genes de virulencia de *H. pylori* circulantes en la población local. Disminuyendo la presencia de *vacAs1a* y *vacAm1* genes asociados con alta vacuolización celular; pero aumentando la presencia de *cagA*, un gen que altera la integridad celular, y de *vacAs2* y *vacAm2* genes asociados con baja citotoxicidad.
- Los genes *nudA* y *htrA* a pesar de no estar estadísticamente relacionados con el daño gástrico, si muestran una clara tendencia a estar más presente en patologías más graves como lesiones precancerosas. Además la presencia de ambos junto con *cagA*, potenciarían el desarrollo de patologías gástricas más severas.
- Los análisis bioinformáticos realizados sugieren que NudA corresponde a una pirofosfohidrolasa, enzima que remueve el pirofosfato del extremo 5' de ARN trifosforilado, esencial para *H. pylori*.
 - La proteína NudA carece de dominios propios de una proteína invasiva.

6.- PROYECCIONES

- Es necesario continuar manteniendo la vigilancia de prevalencia de *H. pylori* y sus genes de virulencia circulantes en pacientes sintomáticos regionales y nacionales, debido a las asociaciones entre el genotipo de esta bacteria y patologías gástricas.
- Se debe seguir investigando la asociación de los genes *nudA* y *htrA* con el desarrollo de daño gástrico, para establecer si efectivamente tienen implicancias en ello; especialmente *htrA* que permite a *H. pylori* ingresar a los sitios basolaterales de células epiteliales gástricas.
- Es necesario realizar análisis experimentales para dilucidar si *nudA* esta implicada en la capacidad invasiva de *H. pylori*, a través de determinaciones de su tipo de sustrato y mutación del gen.
- Es necesario continuar con la búsqueda de factores genéticos que permiten la entrada de *H. pylori* a células eucariontes, de este modo tomar medidas para disminuir la potencial diseminación a través de vectores como *Candida* y disminuir la persistencia de *H. pylori* en células epiteliales gástricas al ingresar por este mecanismo.

7.- REFERENCIAS

- Ahmad, T., Sohail, K., Rizwan, M., Mukhtar, M., Bilal, R., Khanum, A. 2009. Prevalence of *Helicobacter pylori* pathogenicity-associated *cagA* and *vacA* genotypes among Pakistani dyspeptic patients. *FEMS Immunology and medical microbiology*. 55(1), 34-8.
- Alaoui Boukhris S, Amarti A, El Rhazi K, El Khadir M, Benajah D-A, Ibrahimi SA. *Helicobacter pylori* genotypes associated with gastric histo-pathological damages in a Moroccan population. *PloS One*. 2013; 8(12):e82646.
- Alm, R., Bina, J., Andrews, B., Doig, P., Hancock, R. 2000. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: Analysis of the outer membrane protein families. *Infection and immunity*. 68, 4155–4168.
- Alm, R., Ling, L., Moir, D., King, B., Brown, E. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 397(6715), 176-80.
- American Cancer Society. 2015. *Global Cancer Facts & Figures*. 3rd Edition. Atlanta: American cancer society.
- Amieva, M., Salama, N., Tompkins, L., Falkow, S. 2002. *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cellular microbiology*. 4(10), 677–690.
- Amieva, M., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L., Nelson, W. 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*. 300(5624),1430–1434.
- Andersson, AF., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P. 2008. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE*, 30;3(7):e2836.
- Ansari, S., Yamaoka, Y. 2017. Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory. *Helicobacter*. 22,e12386.
- Backert, S., Bernegger, S., Skórko-Glonek., J., Wessler S. 2018. Extracellular HtrA serine proteases: An emerging new strategy in bacterial pathogenesis. *Cellular Microbiology*. 20, e12845.

- Backert, S., Boehm, M., Wessler, S., Tegtmeyer, N. 2013, Transmigration route of *Campylobacter jejuni* across polarized intestinal epithelial cells: paracellular, transcellular or both?. *Journal of cell communication and signaling*. 11, 72.
- Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A. 2000. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiology*. 2(2), 155–164.
- Baek, K., Vegge, C., Brøndsted, L. 2011. HtrA chaperone activity contributes to host cell binding in *Campylobacter jejuni*. *Gut Pathogens*.3,13.
- Bagheri, B., Azadegan-Dehkordi, F., Rafieian-Kopaei, M., Rahimian, G., Asadi-Samani, M., Shirzad, H. 2016. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* virulence factors in Iranian patients with gastrointestinal diseases. *Microbial pathogenesis*. 100:154-162.
- Ben Mansour, K., Fendri, C., Battikh, H., Garnier, M., Zribi, M., Jlizi, A., Burucoa, C. 2016. Multiple and mixed *Helicobacter pylori* infections: Comparison of two epidemiological situations in Tunisia and France. *Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 37, 43-48.
- Bertuccio, P., Chatenoud, L., Levi, F., Praud, D., Ferlay, J., Negri, E., Malvezzi, M., La Vecchia, C. 2009. Recent patterns in gastric cancer: A global overview. *International journal of cancer*. 125, 666–673.
- Boehm, M., Hoy, B., Rohde, M., Tegtmeyer, N., Bæk, K. T., Oyarzabal, O. A., Brøndsted, L., Wessler, S., Backert, S. 2012. Rapid paracellular transmigration of *Campylobacter jejuni* across polarized epithelial cells without affecting TER: role of proteolytic-active HtrA cleaving E-cadherin but not fibronectin. *Gut pathogens*. 4(3), 1-12.
- Boehm, M., Lind, J., Backert, S., Tegtmeyer, N. 2015. *Campylobacter jejuni* serine protease HtrA plays an important role in heat tolerance, oxygen resistance, host cell adhesion, invasion, and transmigration. *European journal of microbiology and immunology*. 5(1), 68–80.
- Boquet, P., Ricci, V. 2012. Intoxication strategy of *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Trends Microbiology*. 20(4), 165-74.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., Jemal, A. 2018. Global cancer statistics. *GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A cancer journal for clinicians. 0 (0),1–31.

Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., Mahaffy, JM., Nulton J. 2003. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *Journal of bacteriology*. 185(20), 6220-6223.

Brown, L.M. 2000. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic Reviews*. 22(2), 283–297.

Buck, G., Gourley, W., Lee, W., Subramanyam, K., Latimer, J. 1986. Relation of *Campylobacter pyloridis* to gastritis and peptic ulcer. *The Journal of Infectious Diseases*. 153(4), 664–669.

Chan, A., 2006. E-cadherin in gastric cancer. *World journal of gastroenterology*, 12(2), 199-203.

Chen, X., Correa, P., Offerhaus, J., Rodriguez, E., Janney, F. 1986. Ultrastructure of the gastric mucosa harboring *Campylobacter*-like organisms. *American Journal of Clinical Pathology*. 86(5), 575–582.

Chu, Y., Wang, Y., Wu, J., Lei, H. 2010. Invasion and multiplication of *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells and implications for antibiotic resistance. *Infection and Immunity*. 78(10), 4157 – 4165.

Cirak, M., Akyön, Y., Mégraud, F. 2007. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 12, 4–9.

Conyers, B., Bessman, M. 199. The gene, *ialA*, associated with the invasion of human erythrocytes by *Bartonella bacilliformis*, designates a Nudix hydrolase active on dinucleoside 5'-polyphosphates. *The journal of biological chemistry* 274(3), 1203–1206.

Correa, P., Houghton, J., 2012. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 33(2), 659-72.

Correa, P., Piazzuelo, MB. 2011. *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. *US gastroenterology and hepatology review*. 7(1), 59-64

Csendes, A., Figueroa, M. 2017. Situación del cáncer gástrico en el mundo y en Chile. *Revista Chilena de cirugía*. 69(6),502-507.

Didelot, X., Nell, S., Yang, I., Woltemate, S., van der Merwe, S. 2013. Genomic evolution and transmission of *Helicobacter pylori* in two South African families.

Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America. 110(34), 13880–13885.

Dossumbekova, A., Prinz, C., Mages, J., Lang, R., Kusters, J. 2006. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: Genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms. The Journal of Infectious Diseases. 194(10), 1346–1355.

Edwards, B., Noone, A., Mariotto, A., Simard, E., Boscoe, F., Henley, S., Jemal, A., Cho, H., Anderson, R., Kohler, B., Ehemann, C., Ward, E. 2014. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast or prostate cancer. Cancer. 120(9), 1290–1314.

El-Shoura, S. 1995. *Helicobacter pylori*: I. Ultrastructural sequences of adherence, attachment, and penetration in to the gastric mucosa. Ultrastructural pathology. 19(4):323–333.

Eusebi, LH., Zagari, RM., Bazzoli, F. 2014. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter. 19(1), 1–5.

Ferreccio, C., Rollán, A., Harris, P., Serrano, C., Gederlini, A., Margozzini, P. 2007. Gastric cancer is related to early *Helicobacter pylori* infection in a high-prevalence country. Cancer epidemiology, biomarkers and prevention. 16(4), 662-7.

Figueiredo, C., Van Doorn, L., Nogueira, C., Soares, J., Pinho, C., Figueira, P., Quint, W., Carneiro, F. 2002. *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. Scandinavian journal of gastroenterology. 36, 128-135.

Figuroa, G., Acuña, R., Troncoso, M., Portell, D., Toledo, M., Valenzuela, J. 1997. *Helicobacter pylori* infection in Chile. Clinical infectious diseases. 25:983-9.

Flint, HJ., Scott, KP., Louis, P., Duncan, S. 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. Nature reviews gastroenterology & hepatology. 9, 577–589.

Foley, P., Hsieh, P., Belasco, J. 2015. Specificity and evolutionary conservation of the *Escherichia coli* RNA Pyrophosphohydrolase RppH. The journal of biological chemistry 290(15), 9478–9486.

Fujimoto, S., Olaniyi, O., Arnqvist, A., Wu, J., Odenbreit, S. 2007. *Helicobacter pylori* BabA expression, gastric mucosal injury, and clinical outcome. 5(1), 49-58.

Van Nhieu, G., Jiménez-Soto, L., Kutter, S., Sewald, X., Ertl, C., Weiss, E., Kapp, U., Rohde, M., Pirch, T., Jung, K., Retta, S., Terradot, L., Fischer, W., Haas, R. 2009. *Helicobacter pylori* type iv secretion apparatus exploits b1 integrin in a novel RGD-independent manner, PLoS Pathogens. 5: e1000684.

Gabelli, S., Bianchet, M., Azurmendi, H., Xia, Z., Mildvan A., Amzel L. 2004. Structure and mechanism of GDP-mannose glycosyl hydrolase, a Nudix enzyme that cleaves at carbon instead of phosphorus. Structure. 12(6), 927-35.

Galmiche, A., Rasso, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J. 2000. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. The EMBO Journal. 19(23), 6361-6370.

García, A., Barra, R., Delgado, C., Kawaguchi, F., Trabal, N., Montenegro, S., González, C. 2006. Genotipificación de aislados clínicos de *Helicobacter pylori* en base a genes asociados a virulencia *cagA*, *vacA* y *babA2*. Primer aislamiento de una cepa *babA2* positiva en pacientes chilenos. Revista médica de Chile. 134(8), 981-988.

García, A., Henríquez, P., Retamal, C., Pineda, S., Delgado, C., González, C. 2009a. Propiedades probióticas de *Lactobacillus* spp. aislados de biopsias gástricas de pacientes con y sin infección por *Helicobacter pylori*. Revista médica de Chile. 137(3), 369-376.

García, A., Fernández, N., Contreras, S., Correa, C., Padilla, F. 2009b. Prevalencia de *Helicobacter pylori* y de genes asociados a virulencia en biopsias gástricas. Salud (i) Ciencia. 17(2), 133-138.

García, A., Sáez, K., Delgado, C., González, C. 2012. Low co-existence rates of *Lactobacillus* spp. and *Helicobacter pylori* detected in gastric biopsies from patients with gastrointestinal symptoms. Revista española de enfermedades digestivas. 104(9), 473-478.

IARC. 1994. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Biological agents. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 61,121-162.

Isberg, R., Hamburger, Z., Dersch, P. 2000. Signaling and invasion-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes and infection*. 2:793–801.

Israel, D., Peek, R. Mechanisms of *Helicobacter pylori*-induced gastric Inflammation. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Cap. 63 pp, 1517-1545

Jeyakanthan, J., Kanaujia, S., Nishida, Y., Nakagawa, N., Praveen, S., Sekar K. 2010. Free and ATP-bound structures of Ap4A hydrolase from *Aquifex aeolicus* V5. *Acta Crystallographica Section*, 66(2), 116-124.

Kalali, B., Mejías-Luque, R., Javaheri, A., Gerhard, M. 2014. *H. pylori* virulence factors: influence on immune system and pathology. *Mediators of inflammation*. (6642),e426309.

Kang, L., Gabelli, S., Cunningham, J., O'Handley, S., Amzel, L. 2003. Structure and mechanism of MT-ADPRase, a nudix hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Structure*. 11(8), 1015-1023.

Keilberg, D., Ottemann, K. 2016. How *Helicobacter pylori* senses, targets, and interacts with the gastric epithelium. *Environmental microbiology*, 18(3), 791–806.

Khaton, J., Rai, R., Prasad, K. (2016). Role of *Helicobacter pylori* in gastric cancer: Updates. *World journal of gastrointestinal oncology*, 8(2), 147-58.

Lee, C., Rickman, B., Rogers, A., Ge, Z., Wang, T. 2008. *Helicobacter pylori* Eradication prevents progression of gastric cancer in hypergastrinemic INS-GAS Mice. *Cancer research*. 68(9), 3540–3548.

Lee, Y., Derakhshan, M. 2013. Environmental and lifestyle risk factors of gastric cancer. *Archives of academic emergency medicine*.16(6), 358 – 365.

Liu, H., Semino-Mora, C., Dubois, A. 2012. Mechanism of *H. pylori* intracellular entry: an in vitro study. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2, 13.

Lundin, A., Nilsson, C., Gerhard, M., Andersson, D.I., Krabbe, M. 2003. The NudA protein in the gastric pathogen *Helicobacter pylori* is an ubiquitous and constitutively expressed dinucleoside polyphosphate hydrolase. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(14), 12574–12578.

Maksel, D., Gooley, P., Swarbrick, J., Guranowski A., Gance, C., Gayler K. 2001. Characterization of active-site residues in diadenosine tetraphosphate hydrolase from *Lupinus angustifolius*. *Biochemical Journal*. 357(2), 399-405.

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Gisbert, J., Kuipers, E., Axon, A., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., Sugano, K., El-Omar, E. 2017. On behalf of the European *Helicobacter* and Microbiota study group and Consensus panel. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*. 66, 6–30.

McLennan, A. 2006. The Nudix hydrolase superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63, 123–143.

Melo-Narváez, C., Rojas-Rengifo, D., Jiménez-Soto, L., Delgado, M., Mendoza, B., Vera-Chamorro, J., Jaramillo, C. 2018. Genotipificación de *cagA* y de la región intermedia de *vacA* en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes adultos colombianos y su asociación con enfermedades gástricas. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 33(2), 103-110.

Merino, J., Araneda, L., Lincoñir-Campos, P., Parra, C., Sáez, K., García, A. 2018. Dynamics of *Helicobacter pylori* infection in infants during the first six months of life. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 32(2), 109-111.

Merrell, D., Goodrich, M., Otto, G., Tompkins, L., Falkow, S. 2003. pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*. 71(6), 3529–3539.

Miehlke, S., Kirsch, C., Agha-Amiri, K., Günther, T., Lehn, N. 2000. The *Helicobacter pylori vacA* s1, m1 genotype and *cagA* is associated with gastric carcinoma in Germany. *International Journal of Cancer*. 87(3), 322–327.

Mildvana, A., Xiaa Z., Azurmendia H., Saraswata V., Legler P. 2005. Structures and mechanisms of Nudix hydrolases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433(1), 129–143

Müller, A. 2012. Multistep activation of the *Helicobacter pylori* effector CagA. *The Journal of clinical Investigation*. 122(4), 1192-1195.

Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y. 2007. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the betacatenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene*. 26(32), 4617–4626.

Nakamura, T., Meshitsuka, S., Kitagawa, S., Abe, N., Yamada, J. 2010. Structural and dynamic features of the MutT protein in the Recognition of

Nucleotides with the Mutagenic 8-Oxoguanine Base. *The journal of biology chemistry*. 285(1), 444–452.

Necchi, V., Candusso, M., Tava, F., Luinetti, O., Ventura, U. 2007. Intracellular, intercellular and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *H. pylori*. *Gastroenterology*. 132(3), 1009–1023.

Noach, L., Rolf, T., Tytgat, G. 1994. Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *Journal of clinical pathology*. 47(8), 699–704.

Noto, J., Peek R. 2012. *Helicobacter pylori*: an overview. *Methods in molecular biology*. 921, 7-10.

O’Ryan, ML., Lucero, Y., Rabello, M., Mamani, N., Salinas, AM., Peña, A., Torres-Torreti, JP., Mejías, A., Ramilo, O., Suarez, N., Reynolds, HE., Orellana, A., Lagomarcino, AJ. 2015. Persistent and transient *Helicobacter pylori* Infections in Early Childhood. *Clinical infectious diseases*. 61(2), 211-218.

Oh, JD., Kling-Bäckhed, H., Giannakis, M., Xu, J., Fulton, R. 2006. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 103(26), 9999–10004.

Oleastro, M., Cordeiro, R., Ferrand, J., Nunes, B., Lehours, P. 2008. Evaluation of the clinical significance of *homb*, a novel candidate marker of *Helicobacter pylori* strains associated with peptic ulcer disease. *The Journal of infectious diseases* 198, 1379–1387.

Osaki, T., Okuda, M., Ueda, J., Konno, M., Yonezawa, H. 2013. Multilocus sequence typing of DNA from faecal specimens for the analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori*. *Journal of medical microbiology*. 62, 761–765.

Oth, L., Wilson, M., Fernández, H., Oth, C., Toledo, C., Cárcamo, V. 2011. Isolation of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa and susceptibility to five antimicrobial drugs in southern Chile. *Brazilian journal of microbiology*. 42(2), 442-447.

Page, M., Di Cera, E. 2008. Evolution of peptidase diversity. *The journal of biological chemistry*. 283(44), 30010-30014.

Palframan, S., Kwok, T., Gabriel, K. 2012. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Frontiers cell infection microbiology*. 2,92.

Papadogiannakis, N., Willén, R., Carlén, B., Sjöstedt, S., Wadström, T. 2000. Modes of adherence of *Helicobacter pylori* to gastric surface epithelium in gastroduodenal disease: a possible sequence of events leading to internalisation. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 108(6), 439–447.

Paredes-Osses, E., Sáez, k., Sanhueza, E., Hebel, S., González, C., Briceño, C., García, G. 2017. Association between *cagA*, *vacAi*, and *dupA* genes of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal pathologies in Chilean patients. *Folia Microbiologica*. 62(5), 437–444.

Parkin, D., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. 2002. *Global Cancer Statistics, 2002*. CA: A Cancer journal for clinicians. 55(2), 74-108.

Patra, R., Chattopadhyay, S., De, R., Datta, S., Chowdhury, A., Ramamurthy, T., Nair, G., Berg, D., Mukhopadhyay, A. K. 2010. Intact *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* without disease association in Kolkata, India. *International journal of medical microbiology*, 301(4), 293-302.

Peek, R., Crabtree J. 2006. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *Journal of Pathology*, 208(2), 233–248.

Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L. 2009. The NIH human microbiome project. *Genome Research*. 19, 2317-2323.

Pinto-Ribeiro, I., Ferreira, M., Batalha, S., Hlaing, T., Wong, S., Carneiro, F., Figueiredo, C. 2016. *Helicobacter pylori vacA* genotypes in chronic gastritis and gastric carcinoma patients from Macau, China. *Toxins (Basel)*. 8(5), 142.

Poveda, G., Carrillo, K., Monje, M., Cruz, C., Cancino, A. 2014. *Helicobacter pylori* infection and gastrointestinal symptoms on Chilean pregnant women. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 60(4), 306-310.

Raivio, T. 2005. Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Molecular Microbiology*. 56(5), 1119–1128.

Rajilic-Stojanovic, M., Smidt, H., de Vos, WM. 2007. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental Microbiology*. 9(9), 2125-2136.

Raju, D., Hussey, S., Ang, M., Terebiznik, M., Sibony, M., Galindo–Mata, E., Gupta, V., Blanke, S., Delgado, A., Romero–Gallo, J., Ramjeet, M., Mascarenhas, H., Peek, R., Correa, P., Streutker, C., Hold, G., Kunstmann, E., Yoshimori, T., Silverberg, M., Girardin, S., Philpott, D., El Omar, E., Jones, N. 2012. Vacuolating cytotoxin and variants in Atg16L1 that disrupt autophagy promote *Helicobacter pylori* infection in humans. *Gastroenterology*. 142(5), 1160–1171.

Rassow, J., Meinecke, M. 2012. *Helicobacter pylori* VacA: a new perspective on an invasive chloride channel. *Microbes and infection*. 14(12), 1026–1033.

Resto-Ruiz, SI., Sweger, D., Widen, RH., Valkov, N., Anderson, BE. 2000. Transcriptional activation of the *htrA* (High-temperature requirement A) gene from *Bartonella henselae*. *Infection and immunity*. 68(10), 5970-5978.

Rhead, J., Letley, D., Mohammadi, M., Hussein, N., Mohagheghi, M. 2007. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*. 133(3), 926–936.

Roesler, B., Rabelo-Gonçalves, E., José MR., Zeitune, J. 2014. Virulence factors of *Helicobacter pylori*:—A review. *clinical medicine insights*. *Gastroenterology*. 27(7), 9–17.

Rollán, A., Ferreccio, C., Gederlini, A., Serrano, C., Torres, J, Harris, P. 2006. Non-invasive diagnosis of gastric mucosal atrophy in an asymptomatic population with high prevalence of gastric cancer. *World journal of gastroenterology*. 44(12), 7172-7178.

Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N. 2007. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*. 447(7142), 330–333.

Sachs, G., Scott, D. 2012. *Helicobacter pylori*: eradication or preservation. *Medicine reports* 4(7):1-5

Salimzadeh, L., Bagheri, N., Zamanzad, B., Azadegan-Dehkordi, F., Rahimian, G., Hashemzadeh-Chaleshtori, M., Rafieian-Kopaei, M., Sanei, M., Shirzad, H. 2015. Frequency of virulence factors in *Helicobacter pylori*-infected patients with gastritis. *Microbial pathogenesis*. 80:67-72.

Salmanian, A., Siavoshi, F., Akbari, F., Afshari, A., Malekzadeh, R. 2008. Yeast of the oral cavity is the reservoir of *Helicobacter pylori*. *Journal of oral pathology and medicine* 37(6), 324–328.

Sampieri, CL. 2013. *Helicobacter pylori* and gastritis: The role of extracellular matrix metalloproteases, their inhibitors, and the disintegrins and metalloproteases. A systematic literature review. Digestive diseases and sciences. 58(10), 2777–2783.

Saniee, P., Siavoshi, F. 2015. Endocytotic uptake of FITC-labeled anti-*H. pylori* egg yolk immunoglobulin Y in *Candida* yeast for detection of intracellular *H. pylori*. Frontiers in microbiology. 16, 6:113.

Saniee, P., Siavoshi, F., Nikbakht, B., Khormali, M., Sarrafnejad, A. 2013a. Immunodetection of *Helicobacter pylori* – specific proteins in oral and gastric *Candida* yeasts. Archive of iranian medicine. 16(11), 624 – 630.

Saniee, P., Siavoshi, F., Nikbakht, B., Khormali, M., Sarrafnejad, A. 2013b. Localization of *H. pylori* within the vacuole of *Candida* yeast by direct immunofluorescence technique. Archive of iranian medicine. 16(12), 705–710.

Sawa, J., Malet, H., Krojer, T., Canellas, F., Ehrmann, M., Clausen, T. 2011. Molecular adaptation of the DegQ protease to exert protein quality control in the bacterial cell envelope. The journal of biological chemistry. 286(35), 30680–30690.

Schmidt, T., Perna, A., Fugmann, T., Böhm, M., Hiss, J., Haller, S., Götz, C., Tegtmeyer, N., Hoy, B., Rau, T., Neri, D., Backert, S., Schneider, G., Wessler, S. 2016. Identification of E-cadherin signature motifs functioning as cleavage sites for *Helicobacter pylori* HtrA. Scientific reports. 6,23264.

Sekirov, I., Russell SL., Antunes, LC., Finlay, BB. 2010. Gut microbiota in health and disease. Physiological reviews. 90, 859–904.

Semino-Mora, C., Doi, S., Marty, A., Simko, V., Carlstedt, I. 2003. Intracellular and interstitial expression of *H. pylori* virulence genes in gastric precancerous intestinal metaplasia and adenocarcinoma. The Journal of Infectious Diseases. 187(8), 1165–1177.

Sheu, B., Odenbreit, S., Hung, K., Liu, C., Sheu, S. 2006. Interaction between host gastric Sialyl-Lewis X and *H. pylori* SabA enhances *H. pylori* density in patients lacking gastric Lewis B antigen. The american journal of gastroenterology. 101(1), 36–44.

Shousha, S., Bull, T., Parkins, R. 1984. Gastric spiral bacteria. The Lancet. 2:101.

Siavoshi, F., Nourali, A., Zeinali, S., Hashemi, D., Malekzadeh, R. 1998. Yeasts protects *Helicobacter pylori* against the environmental stress. *Archive of Iranian medicine*. 1:2–8.

Siavoshi, F., Sahraee, M., Ebrahimi, H., Sarrafnejad, A., Saniee, P. 2018. Natural fruits, flowers, honey, and honeybees harbor *Helicobacter pylori*-positive yeasts. *Helicobacter*. 23(2),e12471.

Siavoshi, F., Salmanian, A., Akbari, F., Malekzadeh, R., Massarrat, S. 2005. Detection of *Helicobacter pylori*-specific genes in the oral yeast. *Helicobacter*. 10(4), 318–322.

Siavoshi, F., Saniee, P. 2014. Vacuoles of *Candida* yeast as a specialized niche for *Helicobacter pylori*. *World journal of gastroenterology*. 20(18), 5263–5273.

Siavoshi, F., Taghikhani, A., Malekzadeh, R., Sarrafnejad, A., Kashanian, M. 2013. The role of mother's oral and vaginal yeasts in transmission of *Helicobacter pylori* to neonates. *Archives of Iranian Medicine*. 16(5), 288–294.

Soussi, T., Legros, Y., Lubin, R., Ory, K., Schlichtholz, B. 1994. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *International journal of cancer*. 57(1),1-9.

Suerbaum, S., Michetti, P. 2002. *Helicobacter pylori*. *The New England journal of medicine*. 347(15), 1175-1186.

Suzuki, M., Mimuro, H., Kiga, K., Fukumatsu, M., Ishijima, N. 2009. *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host Microbe*. 5(1), 23–34.

Tegtmeyer, N., Moodley, Y., Yamaoka, Y., Pernitzsch, S., Schmidt, V., Traverso, F., Schmidt, T., Rad, R., Yeoh, K., Bow, H., Torres, J., Gerhard, M., Schneider, G., Wessler, S., Backert, S. 2016. Characterization of worldwide *Helicobacter pylori* strains reveals genetic conservation and essentiality of serine protease HtrA. *Molecular microbiology*. 99(5), 925–944.

Tegtmeyer, N., Wessler, S., Necchi, V., Rohde, M., Harrer, A., Rau, T., Asche, C., Boehm, M., Loessner, H., Figueiredo, C., Naumann, M., Palmisano, R., Solcia, E., Ricci, V., Backert, S. 2017. *Helicobacter pylori* employs a unique basolateral type IV secretion mechanism for CagA delivery. *Cell Host & Microbe*. 22, 552–560.

Toledo, H., Defilippi, C., Madrid, A., Defilippi, C., Vallejos, C., Cáceres, D., Venegas M. 2007. *Helicobacter pylori* según ensayo de la ureasa en pacientes

derivados a la Unidad de Endoscopía del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Revista del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. 18; 189-93

Tomb, J., White, O., Kerlavage, A., Clayton, R., Sutton, G. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature. 388:539–547.

Torre, L., Bray, F., Siegel, R., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A. 2015. Global cancer statistics, 2012. CA: A Cancer journal for clinicians. 65 (2), 87–108.

Tricottet, V., Bruneval, P., Vire, O., Camilleri, J., Bloch, F. 1986. *Campylobacter*-like organisms and surface epithelium abnormalities in active, chronic gastritis in humans: an ultrastructural study. Ultrastructural Pathology. 10(2), 113–122.

Unemo, M., Aspholm-Hurtig, M., Ilver, D., Bergström, J., Borén, T. 2005. The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. The Journal of biological chemistry. 280 (15), 15390–15397.

Urita, Y., Watanabe, T., Kawagoe, N., Takemoto, I., Tanaka, H. 2013. Role of infected grandmothers in transmission of *Helicobacter pylori* to children in a Japanese rural town. Journal of paediatrics and child health. 49(5), 394–398.

Van Doorn, L.J., Figueiredo, C., Mégraud, F., Pena, S., Midolo, P., Queiroz, D., Carneiro, F., Vanderborght, B. 1999. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 116(4), 823-830.

Villalobos, L., Cavazza, M., Ortiz-Princz, D. 2015. Detection of *cagA* gene and typing *vacA* gene of *Helicobacter pylori* in biopsies of patients with gastric symptoms in Cumana, Sucre state, Venezuela. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente. 27(3), 430-440

Wang, Y., Wu, J., Lei, H. 2009. The autophagic induction in *Helicobacter pylori*-infected macrophage. Experimental biology and medicine. 234(2), 171–180.

Wang, Y., Lv, Z., Zhong, Y., Liu, D., Chen, S. 2017. The internalization of *Helicobacter pylori* plays a role in the failure of *H. pylori* eradication. Helicobacter. 22(1), e12324.

Warren, R., Marshall, B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. The Lancet. 1(8336), 1273-5.

Willhite, D, Cover, T, Blanke, R. 2003. Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome C release are independent outcomes of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation. *Journal of biological chemistry*. 278(48), 48204–48209.

Wroblewski, L., Peek, R., Wilson, K. 2010. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clinical microbiology reviews*. 23(4), 713–739.

Wyle, F., Tarnawski, A., Schulman, D., Dabros, W. 1990. Evidence for gastric mucosal cell invasion by *C. pylori*: an ultrastructural study. *Journal of clinical gastroenterology*. 12, S92–S98.

Yamaoka, Y. 2008. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. *World journal of gastroenterology*. 14(27), 4265-4272.

Yamaoka, Y., Kita, M., Kodama, T., Imamura, S., Ohno, T., Sawai, N. 2002. *Helicobacter pylori* infection in mice: Role of outer membrane proteins in colonization and inflammation. *Gastroenterology*, 123(6), 1992–2004.

Yamaoka, Y., Ojo, O., Fujimoto, S., Odenbreit, S., Haas, R., Gutierrez, O. 2006. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut*, 55(6), 775–781.

Zilberstein, B., Quintanilha, A., Santos, M., Pajecki, D., Moura, E., Alves, P. 2007. Digestive tract microbiota in healthy volunteers. *Clinics (São Paulo, Brazil)*. 62(1), 47–54.

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado firmado por el participante, aprobado por el Comité de Ética.

Documento de consentimiento para el participante

Estimado

Sr./Sra.

Mediante este documento, lo invitamos a participar en una investigación llamada "**Proyecto Genoma *Helicobacter pylori* (HpGP)**", conducido por la Dra. Apolinaria García Cancino del Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción y los Drs. Charles S. Rabkin y M. Constanza Camargo del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos.

Queremos proporcionarle la información necesaria para que pueda decidir participar o no en este estudio de investigación. De igual forma deseamos contarle que su participación es completamente voluntaria. El personal local que trabaja en HpGP estará disponible a responder cualquier consulta o preocupación que usted tenga. Incluso después de tomar la decisión de participar, usted puede decidir retirarse en cualquier momento. El cuidado que usted reciba en este centro de salud no cambiará de ninguna manera si usted elige no participar. Por favor, lea cuidadosamente este documento y no dude en preguntar al personal del estudio si tiene cualquier duda.

Información general acerca de HpGP

¿Por qué realizamos este estudio? Como usted debe saber, *H. pylori* es una bacteria que provoca problemas estomacales comunes. Para algunas personas, la infección con *H. pylori* puede conducir a cáncer de estómago. Este estudio nos dirá más respecto a los factores de virulencia de *H. pylori* que pueden estar asociados con enfermedades severas. El resultado de esta investigación podrá ayudar a reducir el número de pacientes con cáncer de estómago.

¿Quiénes participarán en esta investigación? Estamos invitando a personas entre 35 a 70 años de edad, quienes tengan la necesidad clínica de realizarse una endoscopia gastrointestinal superior o bien aquellos que han sido recientemente diagnosticados con cáncer de estómago para ser tratado mediante cirugía o endoscopia.

¿Qué involucra mi participación? Si usted es elegible debido a su necesidad clínica de realizarse una endoscopia, su participación consistirá en donar 4 biopsias gástricas (muestras de tejido de aproximadamente el tamaño de un grano de arroz) y se le proporcionará acceso al reporte de su diagnóstico bacteriológico de *H. pylori* y su respectivo antibiograma de manera gratuita. Cualquier información que usted proporcione será tratada con la mayor seguridad y confidencialidad, utilizándose un número de estudio para identificar sus muestras y archivarlas.

¿Qué harán ustedes con mis biopsias gástricas? Las biopsias gástricas serán utilizadas para el diagnóstico y aislamiento de *H. pylori* en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología en la Universidad de Concepción. La cepa de *H. pylori* aislada desde su biopsia será utilizada solo para propósitos de investigación y será enviada al Laboratorio de Gastroenterología de la Universidad de Vanderbilt en Estados Unidos para ser almacenada en el banco biológico HpGP. El traslado de su cepa de *H. pylori* o de su biopsia seguirá las regulaciones locales actuales, bajo la responsabilidad de uno de los investigadores locales, la Dra. Apolinaria García Cancino. Es importante destacar que este estudio no extraerá ningún material genético humano del estómago, por lo que no serán evaluados sus genes.

¿Hay algún riesgo o inconveniente para aquellos que participen en este estudio? Si usted es elegible porque tiene una necesidad clínica de realizarse una endoscopia, el único riesgo o inconveniente está relacionado a la extracción de 4 biopsias adicionales a las que ya están indicadas, que podrían causar un sangrado mínimo el cual se espera que se detenga sin la necesidad de ningún tratamiento. Si usted es elegible porque está comenzando un tratamiento para cáncer de estómago, no hay riesgo adicional, ya que se tomarán muestras para este estudio luego que su tumor sea removido.

¿Qué beneficios puedo obtener? Usted obtendrá el diagnóstico de *H. pylori* y su respectivo antibiograma de manera gratuita, lo que tiene un costo de \$35.000.

¿A quién debería dirigirme en caso de alguna duda? Si tiene preguntas adicionales o desea retirar su participación en el futuro, por favor póngase en contacto con uno de los investigadores locales, Dra. Apolinaria García Cancino al teléfono: +56 41 2204144 ó al mail: apgarcia@udec.cl

Declaración de consentimiento: Yo entiendo que mi firma verifica que he leído esta información y estoy de acuerdo en participar en el estudio. Reconozco el recibo de una copia firmada de este documento.

Firma del participante: _____

Nombre _____ (huella): _____

Fecha: _____

Firma representante HpGP: _____

Nombre _____ (huella): _____

Fecha: _____

Anexo 2.

Tabla anexo 2. Genes de virulencia para las 64 muestras positivas para *H. pylori* junto con el diagnóstico histopatológico. Casillas celestes indican presencia del gen. G: gastritis, M: metaplasia

N°	Diagnóstico	<i>cagA</i>	<i>vacAs1a</i>	<i>vacAs1b</i>	<i>vacAs2</i>	<i>vacAm1</i>	<i>vacAm2</i>	<i>nudA</i>	<i>htrA</i>
6	G. crónica atrófica	+	-	-	-	+	-	+	+
11	G. leve	-	-	-	+	-	+	+	+
15	G. crónica no atrófica	-	-	-	+	-	+	+	+
17	M. intestinal incompleta	-	-	-	+	-	+	+	+
22	M. intestinal incompleta	+	-	+	-	+	-	+	+
23	G. crónica no atrófica	-	-	-	-	+	-	+	+
24	G. leve	-	-	-	+	-	+	+	+
25	G. leve	-	-	-	+	-	+	+	+
28	M. intestinal incompleta	+	-	-	-	+	-	+	+
32	M. intestinal incompleta	+	-	-	-	+	-	+	+
37	G. crónica no atrófica	+	-	-	+	+	+	+	+
38	M. intestinal incompleta	+	-	-	-	-	+	+	+
39	G. crónica no atrófica	+	+	-	-	+	-	+	+
42	G. leve	-	-	-	+	+	+	+	+
43	G. crónica no atrófica	-	-	-	+	-	+	+	+
44	G. leve	-	-	-	+	-	+	-	+
46	G. leve	+	-	-	-	-	+	+	+
47	G. leve	+	-	-	-	-	-	-	-
55	M. intestinal incompleta	+	+	+	-	+	-	+	+
60	G. crónica no atrófica	-	+	+	+	-	+	+	+
62	G. crónica no atrófica	-	-	-	+	-	+	+	+

Fuente: Elaboración propia.

Continuación tabla anexo 2. Genes de virulencia para las 64 muestras positivas para *H. pylori* junto con el diagnóstico histopatológico. Casillas celestes indican presencia del gen. G: gastritis, M: metaplasia.

N°	Diagnóstico	<i>cagA</i>	<i>vacAs1a</i>	<i>vacAs1b</i>	<i>vacAs2</i>	<i>vacAm1</i>	<i>vacAm2</i>	<i>nudA</i>	<i>htrA</i>
63	G. crónica no atrófica	-	-	+	+	-	+	+	+
64	M. intestinal incompleta	+	-	-	+	+	+	+	+
65	M. intestinal incompleta	-	-	-	+	-	+	+	+
68	G. crónica no atrófica	+	-	+	-	+	-	+	+
69	G. leve	-	+	+	-	+	-	+	-
72	M. intestinal incompleta	-	-	-	+	-	+	+	+
73	M. intestinal incompleta	+	-	-	+	+	+	+	+
74	G. leve	+	-	-	-	+	-	+	+
76	G. crónica no atrófica	-	-	-	+	-	+	+	+
77	G. leve	+	-	+	+	+	+	+	+
80	Edema	-	-	-	+	-	+	+	+
83	M. intestinal incompleta	+	-	+	-	-	+	+	+
84	G. leve	+	-	-	+	-	+	-	-
88	G. leve	-	-	-	+	-	+	+	+
89	G. leve	-	-	-	+	-	+	+	+
90	G. crónica no atrófica	-	-	-	+	-	+	+	-
91	Edema	-	-	-	+	-	-	-	-
93	Edema	-	-	-	+	-	+	+	+
123	G. crónica no atrófica	+	-	+	-	+	-	+	-
124	G. crónica no atrófica	-	-	-	+	-	+	+	+
127	G. crónica no atrófica	+	-	+	-	-	+	+	+
129	G. leve	-	-	-	+	-	+	+	+
132	G. crónica atrófica	-	-	-	+	-	+	+	-
133	G. crónica no atrófica	+	-	-	-	+	-	+	+
134	G. leve	-	-	-	+	-	+	+	+
139	G. crónica no atrófica	-	-	-	+	-	+	+	+

Fuente: Elaboración propia.

Continuación tabla anexo 2. Genes de virulencia para las 64 muestras positivas para *H. pylori* junto con el diagnóstico histopatológico. Casillas celestes indican presencia del gen. G: gastritis, M: metaplasia.

N°	Diagnóstico	<i>cagA</i>	<i>vacAs1a</i>	<i>vacAs1b</i>	<i>vacAs2</i>	<i>vacAm1</i>	<i>vacAm2</i>	<i>nudA</i>	<i>htrA</i>
140	G. leve	-	-	-	+	-	+	+	+
141	M. intestinal completa	+	-	+	-	+	-	+	+
144	M. intestinal incompleta	-	-	-	+	-	+	+	-
145	G. crónica atrófica	-	+	-	+	-	+	+	-
146	G. crónica no atrófica	+	-	+	-	+	-	+	+
150	G. crónica no atrófica	+	-	-	-	+	+	+	+
151	G. leve	-	-	+	-	-	+	+	-
161	G. leve	-	+	-	+	-	+	+	+
163	G. leve	-	-	-	+	-	+	+	+
164	Edema	-	-	+	-	+	-	+	-
165	Edema	-	+	-	-	-	+	-	-
167	G. leve	+	+	+	+	-	+	+	+
168	Edema	-	-	-	+	-	+	+	+
170	G. crónica no atrófica	+	-	+	-	-	-	+	+
176	G. crónica no atrófica	+	-	-	-	+	-	-	+
177	G. leve	+	-	-	-	+	-	+	+
185	G. crónica no atrófica	-	-	+	-	-	+	+	+

Fuente: Elaboración propia.