

**DETERMINACIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN *pbp1A* DE *Helicobacter pylori*
QUE POTENCIAN LA RESISTENCIA A AMOXICILINA EN PACIENTES CON
LESIONES GÁSTRICAS**

Miguel Ángel Rojas Tarapues

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2019**

**DETERMINACIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN *pbp1A* DE *Helicobacter pylori*
QUE POTENCIAN LA RESISTENCIA A AMOXICILINA EN PACIENTES CON
LESIONES GÁSTRICAS**

**Trabajo parcial como requisito para optar
por el título de biólogo**

Miguel Ángel Rojas Tarapues

Directora:

Claudia Patricia Acosta

Ph.D. en biología

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2019**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1. del acuerdo No. 324 del 11 de octubre de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Todos los derechos reservados.

© 2019

Fecha de sustentación: 30 de agosto de 2019

Nota de Aceptación

Claudia Patricia Acosta

Directora

Álvaro Pazos Moncayo

Jurado

San Juan de Pasto 30 de agosto de 2019

Agradecimientos

Le agradezco a la doctora Claudia Patricia Acosta por su acompañamiento y dirección que permitieron culminar este trabajo. A todos los integrantes del grupo del Grupo de Investigación en Genética Humana Aplicada de la Universidad del Cauca por permitirme el tiempo y el espacio para realizar esta investigación, finalmente al programa de Biología de la Universidad de Nariño, a mis compañeros y profesores por todo el tiempo, conocimientos y experiencia que gane durante el desarrollo de mis estudios.

Dedicatoria

Expreso mi eterno agradecimiento a mi familia me apoyo en todo instante, dedico este trabajo a mi madre Fátima Tarapues quien me dio su amor hasta el último de sus días, a mi padre Omar Rojas, a mis tíos Rosalba Tarapues y Jorge Humberto Tarapues, a mi esposa Yulieth Ximena Fernández y en especial a mi hijo Angel Gabriel por ser la luz que me ha permitido seguir adelante.

RESUMEN

Introducción: *Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa que coloniza la mucosa gástrica de los seres humanos e infecta a más de la mitad de la población mundial, esta infección es la principal causa de gastritis crónica, úlceras pépticas gastroduodenales y adenocarcinoma gástrico. Siendo el antibiótico amoxicilina parte de la gran mayoría de esquemas de tratamiento y se han propuesto como principal mecanismo resistencia en *H. pylori* las alteraciones estructurales en las proteínas de unión a penicilina. **Objetivo:** Establecer la frecuencia de las mutaciones en el gen *pbp1A* asociadas a resistencia de *Helicobacter pylori* a amoxicilina en una población de pacientes con lesiones gástricas en el departamento del Cauca. **Materiales y métodos:** La extracción de ADN se realizó a partir de 229 muestras biopsia gástrica obtenida de pacientes con lesiones gástricas. Se amplificaron las regiones s y m del gen *vacA* y una región del gen *pbp1A* (135 pb) bacteriano, mediante PCR. La presencia de mutaciones fue identificada por secuenciación directa. **Resultados:** La frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia encontrada en la población de estudio fue del 85,59% (196/229). La mutación más frecuente fue S417T, encontrada en 174 pacientes (75,98%), seguida por las mutaciones A406G y E406V en 116 (50.65%) y 47 (20.52%) pacientes respectivamente. **Conclusiones:** Este estudio encontró una alta frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia a amoxicilina según literatura, siendo las más frecuentes S417T seguido por A406G. Es necesario realizar estudios adicionales como pruebas de sensibilidad in vitro para corroborar los resultados del presente estudio y establecer esquemas de tratamiento acordes a los niveles de resistencia encontrados.

Palabras clave: Amoxicilina, *pbp1a*, mutación, *Helicobacter pylori*, Cauca.

ABSTRACT

Introduction: *Helicobacter pylori* is a Gram negative bacterium that colonizes the gastric mucosa of humans and infects more than half of the world population, this infection is the main cause of chronic gastritis, gastroduodenal peptic ulcers and gastric adenocarcinoma. Since the antibiotic amoxicillin is part of the great majority of treatment schemes, structural alterations in penicillin binding proteins have been proposed as the main mechanism in *H. pylori* resistance.

Objective: To establish the frequency of mutations in the *pbp1A* gene associated with resistance of *Helicobacter pylori* to amoxicillin in a population of patients with gastric lesions in the department of Cauca. **Materials and methods:** DNA from 229 gastric biopsy samples obtained from patients with gastric lesions. The s and m regions of the *vacA* gene and a region of the bacterial *pbp1A* (79 bp) gene were amplified by PCR. The presence of mutations was identified by direct sequencing. **Results:** The frequency of mutations associated with resistance found in the study population was 85.59% (196/229). The most frequent mutation was S417T, found in 174 patients (75.98%), followed by mutations A406G and E406V in 116 (50.65%) and 47 (20.52%) patients respectively. **Conclusions:** This study found a high frequency of mutations associated with resistance to amoxicillin according to literature, the most frequent being S417T followed by A406G. It is necessary to carry out additional studies such as in vitro sensitivity tests to corroborate the results of this study and establish treatment schemes according to the levels of resistance found.

Key words: Amoxicillin, *pbp1a*, mutation, *Helicobacter pylori*, Cauca.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	14
2. GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA HUMANA APLICADA	16
3. MARCO TEÓRICO	17
3.1. ASPECTOS GENERALES DE <i>H. PYLORI</i>	17
3.2. TRATAMIENTO DE ERRADICACIÓN DE <i>H. PYLORI</i>	17
3.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA DE <i>H. PYLORI</i>	18
3.4. RESISTENCIA DE <i>H. PYLORI</i> A LA AMOXICILINA	19
4. OBJETIVOS.....	21
4.1. OBJETIVO GENERAL	21
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
5. METODOLOGÍA	22
5.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ADN.....	22
5.2. PROTOCOLOS DE PCR Y SECUENCIACIÓN.....	22
5.3. CRITERIOS INCLUSIÓN	23
5.4. CRITERIOS EXCLUSIÓN	23
5.5. CREACIÓN DE LA BASE DE DATOS BIOINFORMÁTICA DEL GEN <i>PBP1A</i>	23
5.6. DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN <i>PBP1A</i>	24
5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
6. ASPECTOS ÉTICO - LEGALES	26
7. RESULTADOS	27
7.1. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS GENERAL DE LA POBLACIÓN DE PACIENTES INCLUIDA	27

7.2.	BASE DE DATOS BIO-INFORMÁTICA DEL GEN <i>PBP1A</i>	27
7.3.	FRECUENCIA DE MUTACIONES ASOCIADAS CON RESISTENCIA DE <i>H. PYLORI</i> A AMOXICILINA	30
7.4.	ASOCIACIÓN DE LOS RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS CON LA PRESENCIA DE MUTACIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA.....	32
7.5.	ASOCIACIÓN DE LAS VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS CON LA PRESENCIA DE MUTACIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA.....	33
8.	DISCUSIÓN	35
9.	CONCLUSIÓN	37
11.	LITERATURA CITADA	39

LISTA DE FIGURAS

Figura A. Errores de secuenciación encontrados en los electroferogramas	28
Figura B. Alineamiento mediante Blastx del fragmento secuenciado.....	29
Figura C. Base de datos final MEGA X	30
Figura D. Frecuencia de las mutaciones en el gen <i>pbp1A</i> de aislados de <i>H. pylori</i> de pacientes con lesiones gástricas del departamento del Cauca	31

LISTA DE TABLAS

Tabla A. Relación de mutaciones en <i>pbp1A</i> de <i>H. pylori</i> y lesiones gástricas encontradas en los pacientes.....	32
Tabla B. Relación de mutaciones en <i>pbp1A</i> de <i>H. pylori</i> y las características sociodemográficas de los pacientes con lesiones gástricas.....	33

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	48
Anexo B	49

1. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria Gram negativa que coloniza la mucosa gástrica de los seres humanos e infecta a más de la mitad de la población mundial, con tasas de infección que van desde 24.4% en la región de Oceanía hasta 79.1% para el continente africano, con un estimado de aproximadamente 4 mil millones de habitantes infectados para el 2015 (Hooi et al., 2017). La infección con *H. pylori* es la principal causa de gastritis crónica, úlceras pépticas gastroduodenales y adenocarcinoma gástrico (Moss, 2017). Así mismo, produce linfomas MALT gástricos, anemia ferropénica y se considera relacionada por lo menos con el 50% de los casos púrpura trombocitopenia inmune (Salar, 2019). La erradicación de la infección es el tratamiento recomendado para los pacientes con úlceras gástricas, gastritis atrófica, linfomas MALT de bajo grado, anemias inexplicadas por deficiencia de hierro y púrpura trombocitopenica idiopática (Malfertheiner et al., 2016; El-serag et al., 2018). La triple terapia estándar que incluye un inhibidor de la bomba de protones, claritromicina y amoxicilina ha sido el tratamiento universal recomendado para el manejo de la infección (Malfertheiner et al., 2016; Mégraud, 2017; El-serag et al., 2018). Sin embargo, la resistencia bacteriana ha significado un verdadero reto en la práctica clínica. El problema de salud pública más grave ocasionado por *H. pylori* es el riesgo de padecer cáncer gástrico. A pesar de la reducción de su incidencia, el cáncer gástrico sigue siendo uno de los cánceres fatales más importantes, ocupando el segundo lugar de todos los casos de cáncer en el mundo (9.9%) (Mégraud et al., 2015). En Colombia, el cáncer de estómago representa la localización con la segunda incidencia más frecuente en hombres y la cuarta en mujeres (Instituto Nacional de Cancerología Colombia, 2017). En el Cauca, esta patología es el cáncer más frecuente en hombres (24.8%) y el cuarto en las mujeres (6.5%) (Orozco et al., 2018).

Es así que *H. pylori* se convierte en uno de los principales patógenos del ser humano, afectando cerca de dos tercios de la población mundial, en países en vía de desarrollo afecta a más de 80% de los adultos, en contraste con 20 a 50% en países desarrollados (Hooi et al., 2017). En Colombia, la prevalencia de la infección es de 69.1%; las zonas con más alta prevalencia son: Manizales, Tunja, Región Andina y la Costa atlántica (Bravo et al., 2003). Según un estudio previo de casos-controles, realizado por el grupo de investigación en Genética Humana Aplicada (GIGHA), acerca de la epidemiología molecular del cáncer gástrico en el suroccidente colombiano (Sin publicar) se

encontró que, en el departamento del Cauca, la prevalencia de la infección por *H. pylori* es del 83% en la población control. En todos los infectados causa gastritis crónica, y solo el 20% de ellos tendrá alguna enfermedad clínica, del 10 a 20% de los infectados durante su vida tendrán riesgo de desarrollar úlceras pépticas y en 1-2% de tener cáncer gástrico (Moss, 2017). Sin embargo, las consecuencias finales de la infección dependen de factores genéticos del huésped, la bacteria y factores medioambientales. Dada la alta prevalencia de esta infección y su posibilidad de seguir un curso de malignidad, existe un gran interés en su erradicación, la cual se ha visto afectada por la creciente resistencia a los antibióticos utilizados (Liou et al., 2018; Savoldi et al., 2018); llegando a ser la resistencia a los medicamentos antimicrobianos una de las primeras causas del fracaso del tratamiento y es en gran parte la responsable de la disminución de las tasas de erradicación de este patógeno (Ortiz Godoy et al., 2003).

A nivel mundial, las tasas de prevalencia de la resistencia a la amoxicilina en las cepas de *H. pylori* son generalmente muy bajas y se han observado tasas de resistencia de hasta el 33% en otros países. En Taiwán se detectó la existencia de una cepa resistente a amoxicilina (CIM; 256 mg/l) y productora de betalactamasa, TEM-1 codificada por el gen blaTEM 1 (Tseng et al., 2009). En Latinoamérica, el porcentaje de la resistencia varía en un rango de 0 a 38%; las tasas de resistencia más altas se encuentran en Brasil entre 29 y 38%, seguida por Colombia con 20,5% (Figuroa et al., 2012). Un estudio de Trespacios et al, en 2010 reportó una tasa de resistencia a metronidazol del 81,01% (IC 95% 70,31-88,64), claritromicina 17,72% (IC 95% 10,37-28,29%), y amoxicilina 3,8% (IC 95% 0-8,6%) mediante prueba de E-test en Colombia. Por todo lo anterior y sumando la falta de información regional de las características de resistencia a la amoxicilina por parte de *H. pylori*, realizar este proyecto permitirá entender los patrones de resistencia de la bacteria en el departamento Cauca; información de vital importancia para poder establecer a corto plazo, si la terapia utilizada actualmente es recomendable según el porcentaje de resistencia encontrado en la población y establecer si es necesario realizar ajustes a esta con el objetivo de maximizar la erradicación de la bacteria en los pacientes de la región.

De tal forma, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la frecuencia de las mutaciones que han sido asociadas con la resistencia al antibiótico amoxicilina de *H. pylori* en pacientes con lesiones gástricas en el departamento del Cauca?

1. GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA HUMANA APLICADA

El Grupo de Investigación en Genética Humana Aplicada (GIGHA) nace en el año 2000 bajo la coordinación de la PhD Sulma Muñoz Benítez, planteándose como misión: contribuir a la generación y apropiación social del conocimiento a través del desarrollo de proyectos científicos y tecnológicos orientados a la solución de problemas prioritarios en salud en nuestra región, para lo cual tiene establecido la línea de investigación enfocada en las enfermedades crónicas no transmisibles, destacándose dentro de esta línea las investigaciones realizadas en cáncer de estómago, enfocadas en la tipificación de la virulencia y las mutaciones en genes de resistencia de *Helicobacter pylori*, al igual que sobre las alteraciones epigenéticas, susceptibilidad genética y su relación con la carcinogénesis gástrica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Aspectos generales de *H. pylori*.

Helicobacter pylori es un bacilo Gram-negativo, curvado, altamente móvil que coloniza de manera persistente la mucosa gástrica de humanos. Afecta a cerca de dos tercios de la población mundial y su prevalencia está fuertemente relacionada con las condiciones socioeconómicas (Suerbaum & Michetti, 2002). En países en vía de desarrollo afecta a más de 80% de los adultos, en contraste con 20 a 50% en países desarrollados (Hooi et al., 2017). Se adquiere en la infancia y si no se elimina con antimicrobianos, persiste durante la vida del individuo (Suerbaum & Michetti, 2002). En todos los infectados produce gastritis crónica, pero solo el 20% de ellos tendrá alguna enfermedad clínica. Del 10 a 20% de los infectados durante su vida tendrán riesgo de desarrollar úlceras pépticas y 1-2% de tener cáncer gástrico, un porcentaje menor (1%) podrá presentar dispepsia y 1/100.000 linfomas MALT (Otero et al., 2015; Salar, 2019).

2.2. Tratamiento de erradicación de *H. pylori*

En la actualidad las guías de consenso recomiendan la erradicación de *H. pylori* en pacientes con síntomas dispépticos. Los regímenes de erradicación más utilizados hoy en día se consideran una combinación de tres drogas, un inhibidor de la bomba de protones (IBP) o ranitidina citrato de bismuto y dos antibióticos, elegidos entre la amoxicilina (AMX), claritromicina (CLA) y metronidazol (MTZ) (Malfertheiner et al., 2017). En la práctica médica en Colombia para la erradicación de *H. pylori*, la pauta terapéutica recomendada es la de 20 mg de omeprazol (el IBP más común) dos veces al día durante una semana, unido a 500 mg de amoxicilina en cuatro tomas diarias durante una semana y 200 mg de claritromicina, también en cuatro tomas diarias durante una semana (Malfertheiner et al., 2017; Otero et al., 2018). Sin embargo, este tratamiento puede ser cuestionado por el aumento de las tasas de fracaso de erradicación. Muchos factores han sido implicados como causas de fracaso del tratamiento, incluyendo la incorporación de los antibióticos ineficaces en la mucosa gástrica, la inactivación de antibióticos por el pH del estómago, falta de

cumplimiento por parte del paciente y la más común es la aparición de resistencia adquirida a los antibióticos por *H. pylori* (Vicente et al., 2012; Sierra et al., 2014; Liou et al., 2018)

2.3. Mecanismos de resistencia de *H. pylori*

La mayoría de las bacterias, por su inmensa capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos para poder sobrevivir a las condiciones del medio tales como: i) la resistencia natural o intrínseca, aquí las bacterias carecen de un sitio diana para la actuación del antibiótico; ii) la resistencia adquirida, se debe a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por transferencia genética (Tafur et al., 2008). Sin embargo, investigadores consideran que las mutaciones (cualquier cambio en la secuencia de ADN) son el único mecanismo que puede producir nuevas actividades y funciones genéticas en el mundo biológico y proporcionan un mecanismo para la evolución que explique el origen de la resistencia a los antibióticos (Krishnamurthy et al., 1999; Graham & Shiotani, 2008; Graham & Fischbach, 2012)

La resistencia a antibióticos es probablemente la principal causa del fracaso del tratamiento para *H. pylori* y es en gran parte responsable de la disminución de las tasas de erradicación (Mégraud, 2004; Gisbert et al., 2016; Kuo et al., 2017) Se conoce que los mecanismos de resistencia a antibióticos de *H. pylori* no están mediados por plásmidos, se deben fundamentalmente a mutaciones en genes cromosomales, es decir, que la resistencia es intrínseca y por lo tanto todos los organismos de *H. pylori* son resistentes a los siguientes antibióticos: glucopéptidos, polimixinas, ácido nalidíxico, sulfonamidas, trimetoprima y agentes antimicóticos, en consecuencia estos antibióticos no pueden utilizarse para su erradicación (Martínez et al., 2014; Malfertheiner et al., 2017). Para todos los otros antibióticos la resistencia no ocurre en todas las células bacterianas, pero puede ser adquirida, en particular se incluyen los β -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, rifampicinas, cloranfenicol y 5-nitroimidazoles (Sugano et al., 2015). Teniendo en cuenta que las bacterias Gram negativas

cuentan con varios mecanismos de resistencia y que la selección de estos mecanismos puede llevar a falla terapéutica. Por tal razón, se hace importante conocer los mecanismos más prevalentes (Kao et al., 2016).

2.4. Resistencia de *H. pylori* a la amoxicilina

La amoxicilina es un derivado semisintético de la penicilina, es el único antibiótico β -lactámico empleado para tratar la infección por *H. pylori*. (Puig et al., 2016). Es el β -lactámico más estable en el medio ácido del estómago y alcanza mayores concentraciones en tejidos después de una dosis oral, inhibe la biosíntesis de la pared celular bacteriana, uniéndose a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) localizadas en la pared celular, interfiriendo con la síntesis del peptidoglicano (Krishnamurthy et al., 1999; Calvo & Martínez-Martínez, 2009) Esta inhibición resulta en un debilitamiento de la pared celular bacteriana y finalmente en la lisis y muerte celular (Francesco, 2011; Martínez et al., 2014). Alteraciones en las PBP pueden conferir resistencia a los antibióticos β -lactámicos afectando la unión de los mismos a las PBP (DeLoney & Schiller, 2000; Gerrits et al., 2002; Okamoto et al., 2002; Gerrits et al., 2006; Godoy et al., 2007; Rimbara et al., 2007; Matteo et al., 2008; Kwon et al., 2017; Diab et al., 2018). Además de las alteraciones en las PBP, se ha sugerido que la reducción de la permeabilidad o la expulsión activa pueden contribuir a producir niveles más altos de resistencia (Postius et al., 2001; Rimbara et al., 2007; Qureshi et al., 2011; Niv, 2017 Mégraud, 2018). En las bacterias Gram negativas, la resistencia a los antibióticos β -lactámicos se da principalmente por la producción de β -lactamasas, ya sea cromosómicamente, o por plásmido codificante. (Tafur et al., 2008). En *H. pylori*, no hay indicios de que la resistencia a Amx se deba a la adquisición o expresión de β -lactamasas (Francesco, 2011; Kwon et al., 2017), se han propuesto otros posibles mecanismos de *H. pylori* relacionados con la resistencia a la Amx, como: i. Alteraciones estructurales en las proteínas de unión a penicilina (PBP); ii. Disminución de la permeabilidad de la membrana bacteriana; iii. Expulsión activa que excretan los medicamentos (Malfertheiner & Selgrad, 2014; Qureshi et al., 2014; Mégraud, 2017) Los cambios de aminoácidos en las PBP1 pueden generar resistencia debido a la menor afinidad que se da por la amoxicilina (Rimbara et al., 2007; Qureshi et al., 2011). Varios estudios han demostrado que

las sustituciones de aminoácidos que dan lugar a resistencia ocurren en el extremo carboxilo de PBP1 en el dominio de unión a la penicilina (Co & Schiller, 2006; Rimbara et al., 2007; Qureshi et al., 2011). Por ejemplo, PBP1 una sola sustitución de aminoácido de serina a arginina en la posición 414 (Ser414Arg) ha sido reportada como causante de resistencia (Hu et al, 2016; King et al., 2017). Sin embargo otras mutaciones no tienen una asociación directa con la resistencia a los β -lactámicos por ejemplo mutaciones como: Glu406Ala, Ser417Thr, Met515Ile, Asp535Asn, Ser543Arg, Thr556Ser, Asn562Tyr, Lys648Gln, Arg649Lys, y Arg656Pro, se han reportado en cepas resistentes pero con amplias variaciones en la concentración mínima inhibitoria (MIC) encontrada (Okamoto et al., 2002; Co & Schiller, 2006; Godoy et al., 2007; Francesco, 2011; Kwon et al., 2017; Diab et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Analizar las mutaciones presentes en el gen *pbp1A* asociadas a resistencia frente a amoxicilina en *Helicobacter pylori* aislado en pacientes con lesiones gástricas del departamento del Cauca.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar las mutaciones presentes en secuencias del gen *pbp1A* asociadas a resistencia a amoxicilina según lo reportado en literatura.
- Establecer las relaciones entre las mutaciones del gen *pbp1A* y el diagnóstico histopatológico de las biopsias de pacientes con lesiones gástricas

4. METODOLOGÍA

Esta investigación de tipo observacional de corte transversal, incluye 265 pacientes con lesiones gástricas *Helicobacter pylori* positivo del departamento del Cauca. De los cuales, se obtuvieron 229 secuencias validas, de 79 pares de bases correspondientes al gen *pbp1A* relacionado con la resistencia de *H. pylori* al antibiótico Amoxicilina para el posterior análisis bioinformático de las mutaciones presentes. La información utilizada para el presente estudio se almaceno en la base de datos del Grupo de Investigación en Genética Humana Aplicada de la Universidad del Cauca, como parte del macroproyecto MUTACIÓN EN LOS GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *H. pylori* Y SU RELACIÓN CON LA VIRULENCIA, aprobado por COLCIENCIAS mediante la convocatoria 519-2010 BANCO PROYECTOS EN SALUD - REGIONAL código: 110351929123.

4.1. Obtención de las muestras de ADN

El ADN genómico bacteriano fue extraído usando el Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADN fue reconstituido en 100 µL de solución de rehidratación y almacenadas a – 30 °C hasta su uso.

4.2. Protocolos de PCR y secuenciación

Para determinar la presencia de *H. pylori* se tipificó el gen *vacA* en las muestras mediante una prueba PCR múltiple, empleando el estuche Qiagen Multiplex PCR ®. Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes: *vacA s* F 5' - ATGGAAATACAACAAACACAC – 3'; R 5' - CTGCTTGAATGCGCCAAAC – 3'; *vacA m* F 5' - CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG – 3'; R 5' - GCG TCT AAA TAA TTC CAA GG – 3'. La reacción incluyó una mezcla de 2 µl de ADN genómico bacteriano, 1x de Qiagen Master Mix ®, 0,3 pmol/µl de cada cebador, dos µl de agua libre de RNAsas en un volumen de 12 µl de reacción. Los productos de amplificación se evidenciaron en geles de agarosa al 1,5 % por tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta, teniendo como referencia las bandas de amplificación de las cepas NCTC 11637 (genotipo: *cagA*, *vacA s1/m1*) y 3062 (genotipo: *cagA* negativo, *vacA s2/m2*) de *H. pylori*.

El gen *pbp1A* fue amplificado por PCR empleando las siguientes secuencias de primer: *pbp1F* 5' - GCTATTCCACGACTTCTAAA - 3'; *pbp1R* 5' - GCAAGGTTACAAGCCCTAAA- 3', de acuerdo a lo descrito por Rimbara et al., 2007. Las condiciones de amplificación fueron denaturación inicial por 5 min a 95 °C, 35 ciclos de denaturación a 95°C por 30 segundos, hibridación a 54°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, extensión final a 72°C por 10 min, mediante un termociclador (MyCycler thermal cycler-BIORA D). Los productos de PCR fueron visualizados mediante gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, en cada ensayo de PCR se incluyó un control negativo correspondiente a agua destilada estéril. El ADN amplificado por PCR fue secuenciado por medio de la empresa MACROGEN, utilizando la tecnología Secuenciación estándar con las siguientes condiciones de la muestra: ADN (Plasmido: concentración: 100ng/ $\mu\ell$, volumen: 20 $\mu\ell$, producto de PCR purificado (concentración 50ng/ $\mu\ell$, volumen 20 $\mu\ell$) y primer (Concentración: 5 pmol/ $\mu\ell$, volumen: 20 $\mu\ell$) (Rimbara et al., 2007).

4.3.Criterios Inclusión

Electroferograma que cumplieron con los siguientes criterios de calidad: Picos agudos, sin ruido de fondo, con una precisión de lectura del 99 %.

4.4.Criterios Exclusión

Se excluyeron del análisis de bioinformática los electroferogramas que presentaron: Picos de fluorescencia con las siguientes características: ancho de base mayor a $\frac{1}{4}$ de la altura, con nucleótidos no incorporados, múltiples picos por posición, presencia de ruido o contaminación que dificulte la lectura de los electroferogramas (Mattocks et al., 2000).

4.5.Creación de la base de datos bioinformática del gen *pbp1A*

Las secuencias obtenidas y sus correspondientes electroferogramas fueron analizados siguiendo la Guía para interpretar el electroferograma de secuenciación de ADN versión 3.0 de la Universidad de Ohio, para establecer que cumplan con los estándares de calidad, mediante el paquete informático BIOEDIT V 7.0.5© (Ibis therapeutics, 2005)

Las secuencias fueron codificadas en formato FASTA, posteriormente se realizó el alineamiento mediante Clustal X 1.81 (Thompson et al., 1997) dentro del programa MEGA X © (Kumar et al., 2018) Para lo cual se fijaron los siguientes parámetros: I). opción de alineamiento múltiple y completo, II). Selección del parámetro de desactivación de todas las deleciones e inserciones (gaps) en las secuencias, antes del alineamiento, III). Depuración de secuencias con tamaño menor al 95% del promedio de las secuencias (Mattocks et al., 2000).

4.6. Detección de mutaciones en el gen *pbp1A*

La presencia de mutaciones en el gen *pbp1A* se realizó mediante la comparación por medio de alineamiento múltiple utilizando la herramienta bioinformática MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version X for bigger datasets (Kumar et al., 2018) cotejando las secuencias seleccionadas en el paso anterior contra la secuencia ATCC43504 usada como control y cepa de referencia, ya que la MIC determinada experimentalmente para la cepa ATCC 43504 de *H. pylori* se ha confirmado como menor a 0.125 por lo cual es usada regularmente como control para estudios moleculares (Kwon et al., 2017). La presencia de mutaciones asociadas a resistencia frente a amoxicilina correspondientes al fragmento de 79 pb del gen *pbp1A* secuenciado, fue por medio de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para comparar las secuencias de nucleótidos con las mutaciones: P372S (Qureshi et al., 2014), E406A (Gerrits et al., 2002), S543R (Qureshi et al., 2011), S417T, T556S, N562Y (Zerbetto De Palma et al., 2017), V374L, S414R, A474T, A474V, D479E, N504D, N562Y, T593A, T593S, T593G, y T593K (Okamoto et al., 2002; Co & Schiller, 2006; Godoy et al., 2007; Francesco, 2011; Kwon et al., 2017; Diab et al., 2018) relacionadas con resistencia a amoxicilina.

4.7. Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue procesado mediante SPSS versión 20.0 © para Windows © (SPSS, Inc., IBM Company, Chicago, IL, EE. UU.). Para encontrar si existe asociación entre los resultados histopatológicos de las biopsias de los pacientes y la presencia de mutaciones en el gen *pbp1A*

asociadas a resistencia se calculó mediante la prueba de Chi-cuadrado, con un P-valor $<.05$ considerado estadísticamente significativo, finalmente se calculó los valores de OR y sus intervalos de confianza para determinar si existe asociación entre las variables sociodemográficas y la presencia de mutaciones en el gen *pbp1A* asociadas a resistencia.

5. ASPECTOS ÉTICO - LEGALES

Este proyecto está acorde a las Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud establecidas en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud. Lo respalda la aprobación del comité de ética de la Universidad del Cauca, en el marco del proyecto MUTACIÓN EN LOS GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *H. pylori* Y SU RELACIÓN CON LA VIRULENCIA (Anexo #1 Aval ético). De igual forma para garantizar los derechos los participantes, se realizó el consentimiento informado individualizado para cada paciente, previa explicación sobre el estudio, los posibles beneficios y riesgos, al igual que la garantía de la confidencialidad de la información suministrada, dejando constancia por medio del formato de consentimiento informado firmado (Anexo B)

6. RESULTADOS

6.1. Características sociodemográficas general de la población de pacientes incluida

Se incluyeron en el estudio un total de 229 pacientes, de los cuales se diagnosticó la infección por *H. pylori* mediante estudio histopatológico. La edad media de los pacientes fue 49,8 años ($\pm 14,1$). El 62% (142/229) fueron mujeres y el 38% (87/229) hombres, el 45,6 (102/229) provenían del área rural, y el 55,4% (127/229) del área urbana.

6.2. Base de datos bio-informática del gen *pbp1A*

Como resultado de la revisión de la base de datos de secuencias del gen *pbp1A* almacenada en el Grupo de Investigación en Genética Humana Aplicada, se encontraron un total de 265 secuencias correspondientes a igual número de pacientes, las cuales se encontraban de forma simultánea en formato ABI, pdf y txt, usando el formato ABI se realizó el proceso de confirmar la secuencia registrada con su correspondiente patrón de electroferograma, como resultado de este proceso se creó una nueva base de datos, de esta fase se obtuvieron finalmente 229 (86.4%) secuencia válidas y 36 (13.6%) invalidas, los errores encontrados fueron problemas por ruido de fondo (Figura Aa), baja señal en el electroferograma (Figura Ab) y adicionalmente en todas las secuencias se encontró baja especificidad al inicio de la secuencia (Figura Ac) lo cual redujo el número final de pares de bases validas desde las 134 pb esperadas para el conjunto de primers hasta las 79 pb que se lograron validar para el análisis posterior.

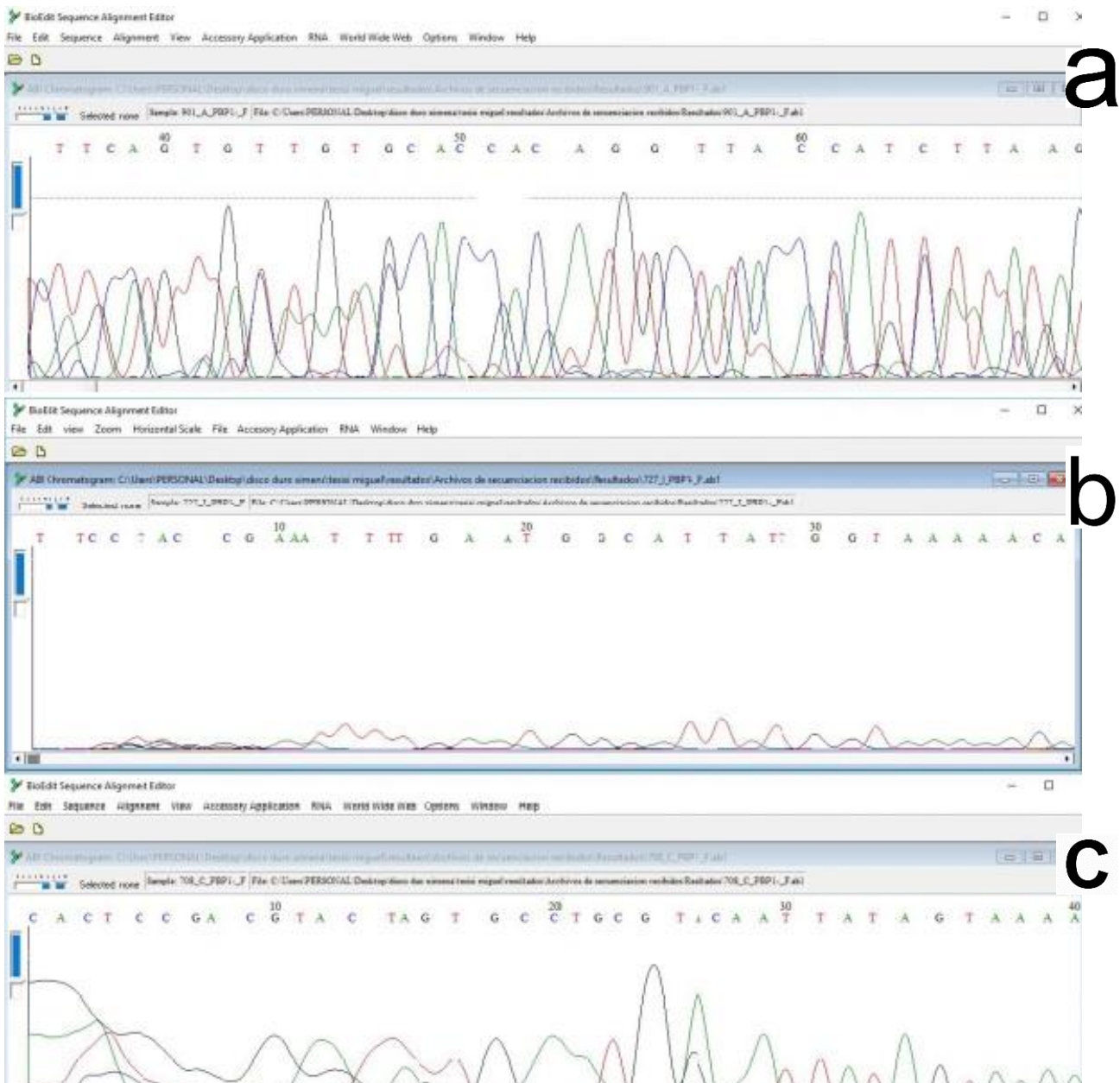


Figura A. Errores de secuenciación encontrados en los electroferogramas, elaborado en: BIOEDIT V 7.0.5. a) ruido de fondo, b) señal de lectura, c) baja especificidad al inicio de la secuencia.

En la siguiente fase, ya usando solo las secuencias que cumplieran con los criterios de inclusión, se procedió a realizar la comparación con la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando la herramienta “blastx” por medio de la cual se confirmó el alineamiento con la secuencia registrada para el gen *pbp1A* de *Helicobacter pylori* y la posición

dentro de esta del fragmento secuenciado (Figura B), entre las posiciones 401 – 426 correspondientes a la cepa control NC_000915_1_.

[Download](#) ▾ [GenPept](#) [Graphics](#)

penicillin-binding protein [Helicobacter pylori]
 Sequence ID: [WP_000913684.1](#) Length: 660 Number of Matches: 1
[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 401 to 426 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
60.8 bits(146)	4e-12	Composition-based stats.	26/26(100%)	26/26(100%)	0/26(0%)	+1
Query 1	YSKNSEQNHAWHPSNYSRKFLGLVTL		78			
Sbjct 401	YSKNSEQNHAWHPSNYSRKFLGLVTL		426			

[Download](#) ▾ [GenPept](#) [Graphics](#)

penicillin-binding protein [Helicobacter pylori]
 Sequence ID: [WP_089482540.1](#) Length: 659 Number of Matches: 1
[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 401 to 426 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
60.8 bits(146)	4e-12	Composition-based stats.	26/26(100%)	26/26(100%)	0/26(0%)	+1
Query 1	YSKNSEQNHAWHPSNYSRKFLGLVTL		78			
Sbjct 401	YSKNSEQNHAWHPSNYSRKFLGLVTL		426			

Figura B. Alineamiento mediante Blastx del fragmento secuenciado, elaborado en: herramienta online Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

(174/229), seguida de la mutación E406A presente en el 50.63% (116/229) y E406V en el 20.52% (47/229) (Figura 4).

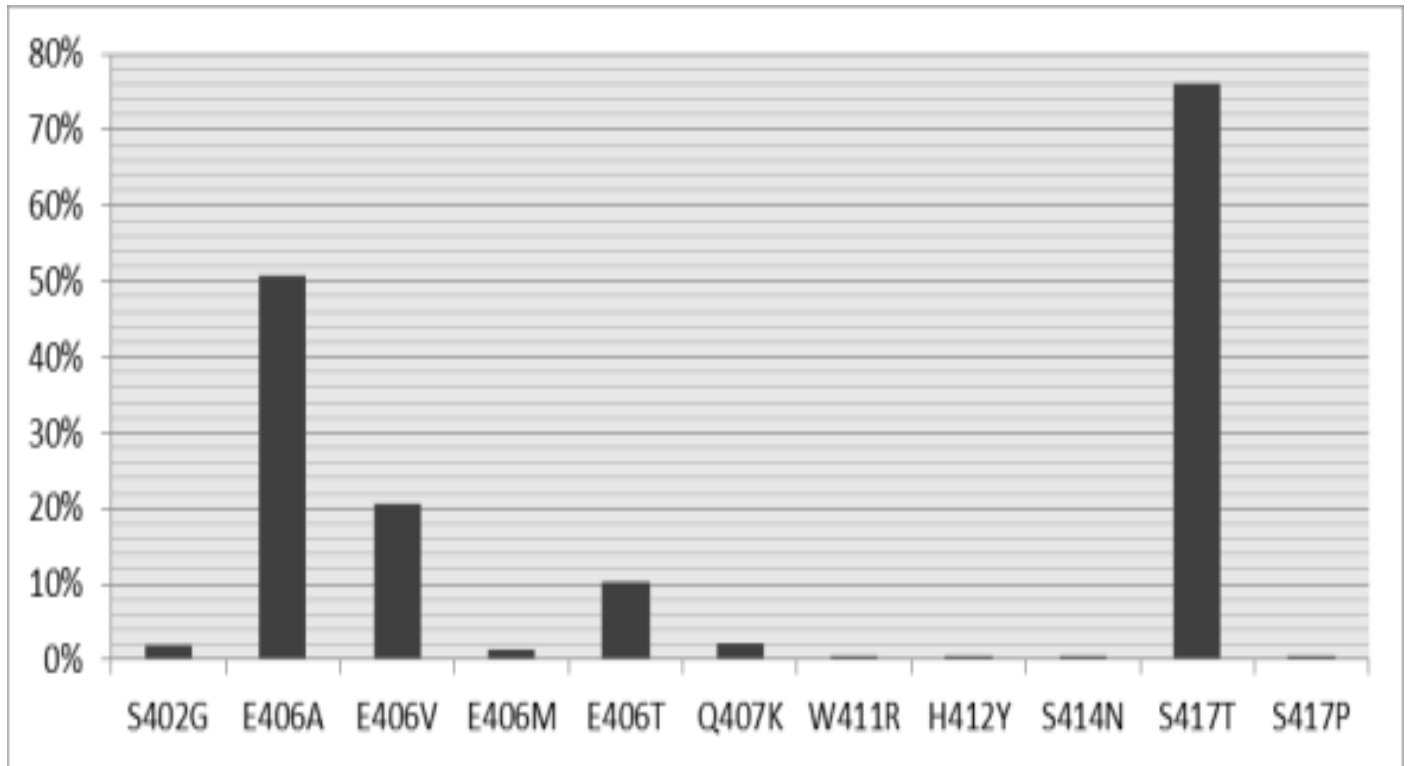


Figura D. Frecuencia de las mutaciones en el gen *pbp1A* de aislados de *H. pylori* de pacientes con lesiones gástricas del departamento del Cauca, Elaborado en: Excel versión 2016 (Microsoft Office)

6.4. Asociación de los resultados histopatológicos con la presencia de mutaciones asociadas a resistencia

Se logró obtener el resultado histopatológico para 226 pacientes con lesiones gástricas distribuidos tal como se presenta en la tabla 1. En todas las lesiones (gastritis crónica no atrófica, gastritis crónica atrófica, metaplasma intestinal, displasia y cáncer gástrico), se encontraron mutaciones relacionadas con la resistencia de *H. pylori* a la amoxicilina, aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p=0,61$).

Tabla A. Relación de mutaciones en *pbp1A* de *H. pylori* y lesiones gástricas encontradas en los pacientes

<i>Lesión gástrica</i>	<i>n</i>	<i>Numero de amplificados con mutaciones</i>	χ^2	<i>p-value</i>
<i>Gastritis crónica no atrófica</i>	79	64	2,695	0,61
<i>Gastritis crónica atrófica</i>	34	29		
<i>Metaplasma intestinal</i>	86	77		
<i>Displasia</i>	9	8		
<i>Cáncer gástrico</i>	18	16		
<i>Total</i>	226	194		

n: Número de pacientes, χ^2 : Chi cuadrado.

6.5. Asociación de las variables sociodemográficas con la presencia de mutaciones asociadas a resistencia

Para las características sociodemográficas se estableció las variables edad y sexo para 228 pacientes, y para procedencia en 226 paciente, logrando encontrar en este estudio encontró que ni la edad o procedencia, presentaban diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$), sin embargo, el sexo si presento una asociación estadísticamente significativa con la presencia de mutaciones asociadas a resistencia ($p < 0.05$) como se puede observar en la tabla 2.

Tabla B. Relación de mutaciones en *pbp1A* de *H. pylori* y las características sociodemográficas de los pacientes con lesiones gástricas

CARACTERÍSTICA SOCIO-DEMOGRÁFICA	MUTACIONES ASOCIADAS CON RESISTENCIA		OR	IC	χ^2	p-value
	Presentes	Ausentes				
EDAD						
18 - 40	48	10	1,09	0,39 - 3,03	1,212	0,5455
41 - 60	106	14	0,677	0,32 - 1,43		
61 - > 71	42	8	0,928	0,39 - 2,17		
SEXO						
HOMBRE	79	7	2,411	0,99 - 5,85	3,978	0,0461
MUJER	117	25	0,414	0,17 - 1,00		

PROCEDENCIA						
URBANO	105	19	1,719	0,36 - 7,99	0,532	0,7666
RURAL CABECERA	70	11	1,492	0,30 - 7,31		
RURAL DISPERSO	19	2	0,581	1,12 - 2,70		

OR: Odds Ratio, IC: Intervalo de confianza, X^2 : Chi cuadrado.

7. DISCUSIÓN

Los estudios de resistencia de *H. pylori* muestran diferencias considerables entre los países e incluso entre los estudios en un mismo país. En América Latina, la prevalencia de resistencia a amoxicilina se encuentra entre el 0%-39% (Thung et al., 2016; Hooi et al., 2017), aunque países como el Ecuador, reportan prevalencias del 43% de cepas con una CMI $\geq 0,125$. (Camargo et al., 2014) En Colombia los estudios orientados a evaluar la susceptibilidad de *H. pylori* a amoxicilina son escasos y estos difieren en la metodología de análisis de susceptibilidad y en la prevalencia de la resistencia. En la población del sur de Colombia (Tumaco – Nariño) se encontró una resistencia del 20.5% (Figueroa et al., 2012), mediante dilución en agar; en la ciudad de Bogotá se ha reportado una prevalencia del 9.5% con la misma técnica (Yepes et al., 2008), mientras que Trespacios et al en el 2010 reportó una resistencia del 3.8% mediante técnica de E-test en la misma ciudad (Trespacios et al., 2010). En contraste con lo reportado en aislados de *H. pylori* del eje cafetero (Armenia y Pereira) donde no se encontró resistencia a amoxicilina por medio de E-test (Álvarez et al., 2009). Estas variaciones geográficas de la resistencia de *H. pylori* a amoxicilina, podrían indicar que en algunas zonas del sur occidente colombiano presentan mayores niveles contrastando lo observado al interior del país. El primer hallazgo importante de esta investigación fue la alta prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia a amoxicilina en la población de estudio con frecuencias de (89,52%). En contraste con otros estudios realizados por técnicas moleculares en regiones colombianas como Tuquerres y Montería, donde las frecuencias de mutaciones relacionadas son de 5.4% y 50% respectivamente (Vergara, 2017; Fernandez, 2013). La mutación más frecuente encontrada en la población de estudio fue S417T con (75.98%); donde estudios fenotípicos de resistencia de *H. pylori* a amoxicilina mediante concentraciones mínimas inhibitorias (MIC); se ha encontrado valores entre 0.032 hasta 0.064 mg/L. cuando esta es la única mutación presente en la cepa (Zerbetto De Palma et al., 2017). La mutación E406A siendo la segunda más frecuente con (59.18%), los estudios de resistencia han encontrado valores MIC que van desde 0.032 hasta 1 mg/L en estudios previos (Godoy et al., 2007; Zerbetto De Palma et al., 2017; Azucena et al., 2019). Esta mutación de forma individual se asocia a resistencia con valores bajos de MIC, sin embargo, al estar de forma conjunta con S417T este valor incrementa entre 1 y

2mg/L (Gerrits et al., 2002; Gerrits et al., 2006; Zerbetto De Palma et al., 2017); lo cual podría indicar que existe algunas mutaciones del gen *pbp1A* de carácter aditivo lo que pueden establecer la resistencia a amoxicilina. Finalmente, la mutación E406V se presentó en el 20.57% de los pacientes, de esta mutación en nuestro país solo existe el reporte de (Azucena et al., 2019). Sin embargo estas mutaciones aun que están asociadas a la resistencia a amoxicilina no son determinantes únicos de esta, como prueba de esto la el estudio de (Betancourt, 2013) demostró que la presencia de estas mutaciones en aislados de pacientes no se relacionó con un fracaso terapéutico medido por test de ureasa en aliento. Por otra parte, las demás mutaciones no tienen reportes previos y se desconoce si tienen alguna relación con resistencia, siendo mutaciones como E406M, S414N y S417P de especial interés ya que se ubican en posiciones donde se ha presentado asociación con resistencia a amoxicilina. Teniendo en cuenta los resultados del presente estudio, sumado a la resistencia encontrada a claritromicina y metronidazol en la región (Acosta et al., 2014; Acosta et al., 2017) se recomienda como un posible esquema de primera línea la triple terapia por 14 días con IBP, amoxicilina y claritromicina para el tratamiento de la infección por *H. pylori* en la población del departamento del Cauca. Esto en concordancia con las recomendaciones presentadas por el consenso de Maastricht/Flores V (Malfertheiner et al., 2017) Finalmente, los resultados del análisis estadístico para el tipo de lesión gástrica encontrada, no se encontraron diferencias significativas, lo cual concuerda con los reportes previos (Yepes et al., 2008; Álvarez et al., 2009; Figueroa et al., 2012; Fernandez, 2013;), donde hasta el momento no se ha establecido que la presencia de mutaciones asociadas a resistencia a amoxicilina esté relacionada con el pronóstico en los resultados histopatológicos de los pacientes.

8. CONCLUSIÓN

Este estudio genotípico de las cepas de *H. pylori* en la población con lesiones gástricas del departamento del Cauca, constituye un punto de partida regional, para establecer la variabilidad genética del gen *pbp1A*. Adicionalmente por la alta frecuencia de varias mutaciones reportadas en este estudio y su posible implicación sobre la resistencia a amoxicilina, es necesario realizar estudios complementarios in vitro para evaluar la expresión de la resistencia en los aislados encontrados.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con los estudios sobre la epidemiología de la resistencia, ya que permite establecer dentro de las opciones terapéuticas avaladas internacionalmente la mejor a nivel regional para hacer frente a la infección por *H. pylori* de acuerdo al patrón de resistencias encontrado, sobre todo teniendo en cuenta que este varía con el tiempo.

A nivel de técnicas de laboratorio se recomienda evaluar otras técnicas de amplificación sobre el gen *pbp1A*, como por ejemplo por PCR anidada, para mejorar la sensibilidad de los productos de PCR, al igual como evaluar otros pares de cebadores para aumentar el tamaño de la secuencia amplificada, ya que esto puede permitir encontrar otras mutaciones, que por el tamaño de la secuencia analizada en el presente estudio pudieron no ser registradas.

10. LITERATURA CITADA

- Acosta, C. P., Hurtado, F. A., & Trespalacios, A. A. (2014). Determinación de mutaciones de un solo nucleótido en el gen 23S rRNA de *Helicobacter pylori* relacionadas con resistencia a claritromicina en una población del departamento del Cauca, Colombia. *Biomedica*, 34(1), 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.10.006>
- Acosta, C. P., Quiroga, A. J., Sierra, H., & Trespalacios, A. A. (2017). Frecuencia de mutaciones en RdxA una nitroreductasa de *Helicobacter pylori* para la activación del metronidazol: estudio en una población del departamento del Cauca. *Biomédica*, 37(2), 1–31. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i4.836>
- Álvarez, A., Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., Corredor, L. F., Reinoso, E., Martínez, J. W., & Beltrán, L. (2009). Resistencia a metronidazol y claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos en Colombia. *Revista Medica de Chile*, 137(10), 1309–1314. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872009001000005>
- Azucena, A., Otero, W., & Trespalacios, A. A. (2019). *Helicobacter pylori*: resistencia múltiple en pacientes de Bogotá-Colombia. *Biomédica*, 39(1), 1–26.
- Betancourt Ruiz, P. L. (2013). *Evaluación de las mutaciones en el gen pbp1A de Helicobacter pylori, que confieren resistencia a amoxicilina*. Pontificia Universidad Javeriana Facultad.
- Bravo, L. E., Cortés, A., Carrascal, M. D. E., Jaramillo, R., García, L. S., Bravo, P. E., ... Bravo, P. A. (2003). *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colombia Médica*, 34, 124–131.
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Camargo, M. C., García, A., Riquelme, A., Otero, W., Camargo, C. A., Hernandez-García, T., ... Rabkin, C. S. (2014). The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: A

- systematic review in latin America. *American Journal of Gastroenterology*, 109, 485–495.
<https://doi.org/10.1038/ajg.2014.24>
- Co, E. M. A., & Schiller, N. L. (2006). Resistance mechanisms in an in vitro-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(12), 4174–4176. <https://doi.org/10.1128/AAC.00759-06>
- DeLoney, C. R., & Schiller, N. L. (2000). Characterization of an in vitro-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3368–3373. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3368-3373.2000>
- Diab, M., El-Shenawy, A., El-Ghannam, M., Salem, D., Abdelnasser, M., Shaheen, M., ... Saber, M. (2018). Detection of antimicrobial resistance genes of *Helicobacter pylori* strains to clarithromycin, metronidazole, amoxicillin and tetracycline among Egyptian patients. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 19(4), 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2018.01.004>
- Fernandez, F. F. (2013). *Análisis de mutaciones en los genes 23S rRNA y pbp1A de aislados de Helicobacter ylori resistentes a Claritromicina y Amoxicilina, provenientes de Tumaco y Túquerres*. UNIVERSIDAD DEL VALLE.
- Figuroa, M., Cortés, A., Pazos, Á., & Bravo, L. E. (2012). Sensibilidad in vitro a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. *Biomédica*, 32(1), 32–42. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i1.454>
- Francesco, V. De. (2011). Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 2(3), 35. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v2.i3.35>
- Gerrits, M., Schuijffel, D., Kuipers, E., Vandenbroucke-Grauls, M., & Kuster, J. (2002). Alterations in Penicillin-Binding Protein 1A Confer Resistance to β -Lactam Antibiotics in *Helicobacter pylori*. *ANTIMICROB.AGENTS CHEMOTHER*, 46(7), 2229–2233. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.7.2229>

- Gerrits, Monique M., Godoy, A. P. O., Kuipers, E. J., Ribeiro, M. L., Stoof, J., Mendonça, S., ... Kusters, J. G. (2006). Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, *11*(3), 181–187. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2006.00398.x>
- Gisbert, J. P., Molina-Infante, J., Amador, J., Bermejo, F., Bujanda, L., Calvet, X., ... McNichol, A. G. (2016). IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterología y Hepatología*, *39*(10), 697–721. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.gastrohep.2016.05.003>
- Godoy, A. P., Lima Ribeiro, M., Borges Benvengo, Y. H., Mendonça, S., Vitiello, L., Bueno Miranda, M. de C., & Pedrazzoli, J. (2003). Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterology*, *3*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-230x-3-20>
- Godoy, A. P. O., Reis, F. C., Ferraz, L. F. C., Gerrits, M. M., Mendonça, S., Kusters, J. G., ... Pedrazzoli, J. (2007). Differentially expressed genes in response to amoxicillin in *Helicobacter pylori* analyzed by RNA arbitrarily primed PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *50*(2), 226–230. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00209.x>
- Graham, D. Y., & Fischbach, L. (2012). *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut*, *59*(8), 1143–1153. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.192757>
- Graham, D. Y., & Shiotani, A. (2008). Newer concepts regarding resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.*, *5*(6), 321–331. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep1138>
- Hooi, J. K. Y., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M. Y., Fox, E., Tanyingoh, D., ... Ng, S. C. (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
- Hu, Y., Zhang, M., Lu, B., & Dai, J. (2016). *Helicobacter pylori* and Antibiotic Resistance, A Continuing and Intractable Problem. *Helicobacter*, *21*(5), 349–363.

<https://doi.org/10.1111/hel.12299>

- Instituto Nacional de Cancerología Colombia. (2017). *Análisis de Situación del Cáncer en Colombia 2015*. (I. N. de Cancerología, Ed.) (Primera ed). Bogotá DC.
- Kao, C., Sheu, B., & Wu, J. (2016). ScienceDirect Helicobacter pylori infection : An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical Journal*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.06.002>
- King, D. T., Sobhanifar, S., & Strynadka, N. C. J. (2017). The mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. En A. Berghuis, G. Matlashewski, M. A. Wainberg, & D. Sheppard (Eds.), *Handbook of Antimicrobial Resistance* (pp. 177–201). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0694-9_10
- Krishnamurthy, P., Parlow, M. H., Schneider, J., Burroughs, S., Wickland, C., Vakil, N. B., ... Phadnis, S. H. (1999). Identification of a Novel Penicillin-Binding Protein from Helicobacter pylori, *181*(16), 5107–5110.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuo, Y., Liou, J., El-omar, E. M., Wu, J., Hwong, A., Leow, R., ... Lin, J. (2017). Articles Primary antibiotic resistance in Helicobacter pylori in the Asia-Pacific region: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, *2016*(17), 85–86. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30219-4](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30219-4)
- Kwon, Y. H., Kim, J. Y., Kim, N., Park, J. H., Nam, R. H., Lee, S. M., ... Lee, D. H. (2017). Specific mutations of penicillin-binding protein 1A in 77 clinically acquired amoxicillin-resistant Helicobacter pylori strains in comparison with 77 amoxicillin-susceptible strains. *WILEY Helicobacter*, *22*(6), 1–7. <https://doi.org/10.1111/hel.12437>
- Liou, J., Chen, P., Luo, J., Lee, J., Chen, C., Fang, Y., ... Shun, C. (2018). Efficacies of Genotypic Resistance-Guided vs Empirical Therapy for Refractory Helicobacter pylori Infection. *Gastroenterology, In Press*, 1–11. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.06.047>

- Malfertheiner, P, & Selgrad, M. (2014). *Helicobacter pylori*. *Current Opinion in Gastroenterology*, 30(6), 589–595. <https://doi.org/10.1097/MOG.000000000000128>
- Malfertheiner, P, Megraud, F., O’Morain, C. A., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A. T., ... European Helicobacter and Microbiota Study Group and Consensus panel. (2017). Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*, 66(1), 6–30. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>
- Martínez, M., David, J., Henao, R., Consuelo, S., Lizarazo, R., & Iván, J. (2014). Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en América Latina y el Caribe Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* in Latin America and the.
- Matteo, M. J., Granados, G., Olmos, M., Wonaga, A., & Catalano, M. (2008). *Helicobacter pylori* amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1A in isogenic isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(3), 474–477. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm504>
- Mattocks, C., Tarpey, P., Bobrow, M., & Whittaker, J. (2000). Comparative Sequence Analysis (CSA): A new sequence-based method for the identification and characterization of mutations in DNA. *Human Mutation*, 16(5), 437–443. [https://doi.org/10.1002/1098-1004\(200011\)16:5<437::AID-HUMU9>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1098-1004(200011)16:5<437::AID-HUMU9>3.0.CO;2-Q)
- Mégraud, F. (2004). *H pylori* antibiotic resistance: Prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*, 53(9), 1374–1384. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.022111>
- Mégraud, F, Bessède, E., & Varon, C. (2015). *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.06.004>
- Mégraud, F. (2017). Comment Time to change approaches to *Helicobacter pylori* management, 1253(17), 6–7. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30245-5](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30245-5)
- Mégraud, F. (2018). Antibiotic resistance – the key element to consider in *Helicobacter pylori* treatment. *Gastroenterology*, 155(5), 1300–1302. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.10.012>
- Moss, S. F. (2017). The clinical evidence linking *Helicobacter pylori* to gastric cancer. *Cellular*

and Molecular Gastroenterology and Hepatology.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.12.001>

Niv, Y. (2017). The Toronto Helicobacter pylori Consensus in Context. *Gastroenterology*, *152*(1), 303. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.08.066>

Okamoto, T., Yoshiyama, H., Nakazawa, T., Park, I. D., Chang, M. W., Yanai, H., ... Shirai, M. (2002). A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of helicobacter pylori. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *50*(6), 849–856. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf140>

Orozco, C., Benavides, E., Bastidas, E., & Gómez, C. (2018). Registro de cáncer de dos instituciones de referencia en el departamento del Cauca 2011. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca*, *20*(2), 16–21.

Otero R, W., Trespalacios R, A. A., Otero P, L., Vallejo O, M. T., Torres Amaya, M., Pardo, R., & Sabbagh, L. (2015). Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of Adult Patients with Helicobacter pylori Infection. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, *30*(1), 17–33. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572015000500004&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Otero R, W., Gómez Z, M., Otero P, L., & Trespalacios R, A. (2018). Helicobacter pylori: ¿cómo se trata en el 2018? *Revista de Gastroenterología del Perú*, *38*(1), 54–63.

Postius, S., Paul, R., Melchers, K., & Schäfer, K. P. (2001). Mutations of the Helicobacter pylori genes rdxA and pbp1 cause resistance against metronidazole and amoxicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(3), 962–965. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.962-965.2001>

Puig, I., Baylina, M., Sánchez-Delgado, J., López-Gongora, S., Suarez, D., García-Iglesias, P., ... Calvet, X. (2016). Systematic review and meta-analysis: Triple therapy combining a proton-pump inhibitor, amoxicillin and metronidazole for Helicobacter pylori first-line treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *71*(10), 2740–2753.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkw220>

- Qureshi, N. N., Morikis, D., & Schiller, N. L. (2011). Contribution of specific amino acid changes in penicillin binding protein 1 to amoxicillin resistance in clinical *Helicobacter pylori* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(1), 101–109. <https://doi.org/10.1128/AAC.00545-10>
- Qureshi, N. N., Gallaher, B., & Schiller, N. L. (2014). Evolution of Amoxicillin Resistance of *Helicobacter pylori* In Vitro: Characterization of Resistance Mechanisms. *Microbial Drug Resistance*, *20*(6), 509–516. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0019>
- Rimbara E, Noguchi N, Kawai Ti, S. M. (2007). Correlation between Substitutions in Penicillin Binding Protein 1 and Amoxicillin Resistance in *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol*, *51*(10), 939–944.
- Salar, A. (2019). Linfoma MALT gástrico y *Helicobacter pylori*. *Medicina Clinica*, *152*(2), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2018.09.006>
- Savoldi, A., Carrara, E., Graham, D. Y., Conti, M., & Tacconelli, E. (2018). Prevalence of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: A Systematic Review and Meta-Analysis in World Health Organization Regions Alessia. *Gastroenterology*, (October), 1–11. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.007>
- Sierra, F., Forero, J. D., & Rey, M. (2014). Tratamiento ideal del *Helicobacter pylori*: una revisión sistemática. *Revista de Gastroenterología de Mexico*. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.03.003>
- Suerbaum, S., & Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* Infection. *New England Journal of Medicine*, *347*(15), 1175–1186. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020542>
- Sugano, K., Tack, J., Kuipers, E. J., Graham, D. Y., El-Omar, E. M., Miura, S., ... Kamada, T. (2015). Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*, *64*(9), 1353–1367. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309252>
- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos

en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3), 217–226. Recuperado de http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/mecanismos_de_resistencia_a_los_antibioticos_en_bacterias_gram_negativas.pdf

Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>

Thung, I., Aramin, H., Vavinskaya, V., Gupta, S., Park, J. Y., Crowe, S. E., & Valasek, M. A. (2016). Review article: The global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 43(4), 514–533. <https://doi.org/10.1111/apt.13497>

Trespacios, A., Otero, W., & Mercado, M. (2010). Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Rev Col Gastroenterol*, 25(1), 31–38. <https://doi.org/ISSN:0120-9957>

Tseng, Y. S., Wu, D. C., Chang, C. Y., Kuo, C. H., Yang, Y. C., Jan, C. M., ... Chang, L. L. (2009). Amoxicillin resistance with β -lactamase production in *Helicobacter pylori*. *European Journal of Clinical Investigation*, 39(9), 807–812. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02166.x>

Vergara, C. A. (2017). *DETECCIÓN BIOINFORMÁTICA DE MUTACIONES EN LOS GENES gyrA, pbp1a Y 23S rRNA DE Helicobacter pylori EN PACIENTES DE LA CIUDAD DE MONTERÍA*. UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA.

Vicente, R., Sicilia, B., Gallego, S., Revillo, M. J., Ducóns, J., & Gomollón, F. (2012). Erradicación de *Helicobacter pylori* en pacientes con úlcera péptica tras fracaso de dos tratamientos previos: estudio prospectivo guiado por cultivo. *Gastroenterología y Hepatología*, 25(7), 438–442. [https://doi.org/10.1016/s0210-5705\(02\)70283-5](https://doi.org/10.1016/s0210-5705(02)70283-5)

Yepes, C. A., Rodríguez, A., Ruiz Morales, Á., & Ariza, B. (2008). Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá Antibiotics resistance

of *Helicobacter pylori* at the San Ignacio University Hospital in Bogota. *Acta Medica Colombiana*, 33(1), 11–14. <https://doi.org/ISSN: 0120-2448>

Zerbetto De Palma, G., Menciondo, N., Wonaga, A., Viola, L., Ibarra, D., Campitelli, E., ... Catalano, M. (2017). Occurrence of Mutations in the Antimicrobial Target Genes Related to Levofloxacin, Clarithromycin, and Amoxicillin Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates from Buenos Aires City. *Microbial Drug Resistance*, 23(3), 351–358. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0361>

Anexo A



Universidad
del Cauca

Vicerrectoría de Investigaciones

6-1807

Popayán, 11 de Octubre de 2010

Doctora
Claudia Patricia Acosta
Departamento de Ciencias Fisiológicas
Facultad Ciencias de la Salud
Universidad del Cauca

Asunto: Aval ético proyecto

Cordial saludo.

Me permito informarle que el Comité de Ética en sesión de hoy revisó el cumplimiento de los requerimientos hechos al proyecto "*Mutación en los genes de resistencia antimicrobiana en Helicobacter Pylori y su relación con la virulencia*", formulado por los grupos de investigación en Enfermedades Digestivas, en Enfermedades Infecciosas, Genética Humana Aplicada y Biología de Cáncer (GIBIC) y verificado el cumplimiento de las normas de carácter nacional e Internacional que rigen la ética en la investigación científica, le da el correspondiente aval.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Franklin Fajardo Sandoval', written over a horizontal line.

Franklin Fajardo Sandoval
Presidente Comité de Ética

Carrera 2a. No. 1A-25 Urbanización Caldas
Teléfono 8209800 exts. 2630 - 2601 Fax (57) (072) 8209860
Popayán - Colombia

Anexo B

Código

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Entiendo que se me ha pedido que participe voluntariamente como sujeto de investigación en la Línea de Epidemiología Molecular en Cáncer Gástrico con los proyectos "HELICOBACTER PYLORI, ALTERACIONES EPIGENÉTICAS, SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA Y SU RELACIÓN CON LA CARCINOGENÉISIS GÁSTRICA" y "MUTACIÓN EN LOS GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN HELICOBACTER PYLORI Y SU RELACIÓN CON LA VIRULENCIA" bajo la dirección del Ph.D. Carlos Hernán Sierra Torres y la Mg. Claudia Patricia Acosta Astala, respectivamente, docentes del Laboratorio de Genética Humana, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Popayán.

PROPÓSITO: Determinar el papel de la virulencia del *Helicobacter pylori* sobre el patrón de metilación y su relación con la herencia de polimorfismos en genes de inflamación para el desarrollo de lesiones gástricas preneoplásicas y cáncer gástrico en una población caucana con diferentes orígenes raciales; de igual manera, determinar las mutaciones de resistencia antimicrobiana de los genes bacterianos rfaA, 23 rNAI y PBP1A y su relación con los genotipos de virulencia, en los pacientes que se encuentren infectados con *H. pylori* en una población del departamento del Cauca.

BENEFICIOS AL SUJETO: Entiendo que me beneficiara por mi participación en este estudio recibiendo un informe detallado de patología sin costo alguno; pero entiendo que no recibiré los resultados de los análisis genéticos de la muestra dado que este estudio es de tipo poblacional y no diagnóstico. Además, por mi participación no recibiré ninguna compensación económica (dinero).

BENEFICIOS A LA SOCIEDAD: Aportara información acerca del papel de los factores de virulencia del *Helicobacter pylori* sobre el patrón de metilación de distintos genes involucrados en el proceso infeccioso, para identificar los posibles biomarcadores tempranos de susceptibilidad en el desarrollo de cáncer gástrico. Igualmente, se determinara la frecuencia de las mutaciones de los genes asociados a la resistencia a antibióticos frecuentemente usados en el tratamiento de la infección. Los resultados de estas investigaciones contribuirán a la formulación de mejores estrategias de prevención, pronóstico y tratamiento de pacientes con lesiones gástricas en la población.

ENTIDADES PARTICIPANTES: Las investigaciones serán lideradas por investigadores de la Universidad del Cauca, en colaboración con el Hospital Universitario San José, el Hospital Susana Lopez de Valencia, y financiadas por Colciencias.

NUMERO DE PARTICIPANTES: El número aproximado será de 750 pacientes.

PROCEDIMIENTOS: Si decido participar voluntariamente en estos estudios una vez haya firmado el consentimiento informado, entiendo que:

- 1) Completaré un cuestionario sobre estilo de vida y estado de salud, facilitando información como teléfono y dirección que podrá ser utilizada para contactarme si existe la necesidad en el futuro.
- 2) Permitiré que se me tomen unas biopsias de tejido gástrico, acorde con las guías actuales de práctica clínica, procedimiento que será realizado por Médicos Gastroenterólogos calificados con el fin de: extraer material genético (ADN) a partir de las biopsias de tejido tomadas para establecer el tipo de cepa de *H. pylori* presente en la mucosa gástrica, para realizar análisis de los patrones de metilación de los genes objeto de estudio y la genotipificación de los genes de resistencia antimicrobiana.
- 3) Permitiré voluntariamente se me tome dos muestras de sangre por venopunción que se hará solamente en las venas periféricas de las extremidades superiores. El personal autorizado me realizara un máximo de tres intentos para obtener las muestras de sangre, las cuales se van a tomar de acuerdo al protocolo provisto por el investigador. La cantidad de sangre que me tomaran deben ser regulada adecuadamente. Esto con el fin de: extraer material genético (ADN) para análisis de polimorfismos y determinación del origen racial, respectivamente.
- 4) Aceptaré que mis muestras sean guardadas en un Banco de Muestras Biológicas. El ADN extraído de las biopsias del tejido gástrico y de sangre periférica, será almacenado a -20 °C en una solución buffer tris-EDTA y guardado durante un periodo de 10 años en el área de custodia del Laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca.
- 5) Permitiré el uso de los datos y las muestras biológicas para estudios posteriores debidamente aprobados por los respectivos Comités de Ética en esta u otras instituciones nacionales o internacionales que pudieran colaborar en el desarrollo esta u otras investigaciones.

RIESGOS POR PARTICIPACIÓN: Entiendo que como riesgos potenciales de mi participación en este estudio se pueden presentar perforación faríngea, asfórgica o gastrointestinal, así como hemorragia e infecciones en el sitio de toma de muestras. Sin embargo, estas lesiones son poco frecuentes cuando son tomadas por personal médico calificado y experimentado y serán evitadas al máximo mediante el uso de técnicas endoscópicas de alta calidad, manteniendo los estándares de asepsia. Cualquier incomodidad, dolor, riesgo o inconveniente asociado con mi participación serán atendidos por el Médico Gastroenterólogo que realice el procedimiento. Con respecto a la toma de muestra de sangre, entiendo que podría experimentar un síncope o malestar durante y luego de la toma de muestras, para lo cual se tendrá especial cuidado en el momento de realizarme el procedimiento. Entiendo también que el consentimiento para recibir los tratamientos e intervenciones que podría necesitar para mi enfermedad será responsabilidad de la IPS

CONFIDENCIALIDAD: Entiendo que la información del cuestionario y todas las muestras serán identificadas con un código único para proteger mi identidad y datos personales. Esta información será mantenida bajo estricta confidencialidad por parte de los investigadores principales el PhD. Carlos Hernán Sierra Torres y la Mg. Claudia Patricia Acosta Astalza.

APROBACION: Se me ha informado que los protocolos y procedimientos de investigación que se emplearan en estos estudios han sido aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca.

PERSONAS A CONTACTAR: Si tengo una pregunta durante o después del procedimiento puedo contactar al PhD. Carlos Hernán Sierra Torres o a la Mg. Claudia Patricia Acosta Astalza en el Laboratorio de Genética Humana de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca o al tel. 8209872.

CLAUSULAS ESTANDAR:

- Entiendo que el consentimiento voluntario es requerido para todas las personas que participan en estos proyectos.
- Me han explicado en un lenguaje que yo puedo entender el propósito de estas investigaciones, los beneficios, los procedimientos y riesgos por participación.
- Me han dicho que la Universidad de Cauca no tiene mecanismos de compensación si algún daño físico ocurriera como resultado directo para los sujetos de investigación de estos proyectos. Sin embargo, entiendo que los tratamientos de emergencia disponibles para el público en general están disponibles para mí también.
- Me han informado que tengo derecho a la privacidad y confidencialidad de toda la información obtenida con relación a estos estudios y que solo los investigadores principales podrán tener acceso a mi historia clínica si es necesario.
- Entiendo que los resultados de estos estudios pueden ser divulgados en eventos nacionales y/o internacionales o ser publicados en revistas científicas sin identificar mi nombre.

Después de explicarme la finalidad de los proyectos con un lenguaje sencillo y comprensible, haber respondido a mis preguntas, estar conforme con las respuestas, dejo constancia que acepto voluntariamente participar como sujeto de investigación en los proyectos antes mencionados, por lo tanto, firmo o coloco mi huella digital para ingresar a la investigación.

_____ Nombre del participante	_____ Firma/huella del participante	_____ Fecha
_____ Nombre del testigo	_____ Firma del testigo	_____ Fecha
Como constancia firma:	_____ Firma del director del proyecto	_____ Fecha

AUTORIZACION PARA GUARDAR Y ENVIAR MUESTRAS A OTRAS INSTITUCIONES: Una vez procesadas las muestras biológicas colectadas, los investigadores las almacenaran en un Banco de Muestra Biológicas en el Laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca. Es posible que algunas de las pruebas de laboratorio que sean necesarias realizar con mis muestras no puedan hacerse en las instalaciones de la Universidad del Cauca, por lo que sería necesario enviarlas a otras instituciones de Colombia o del exterior. En caso de que esto fuera necesario mis muestras estarían marcadas solo con el código único y mi nombre o datos personales no aparecerían en ninguna parte. Entiendo también que estas muestras podrán ser utilizadas para investigaciones futuras siempre y cuando estas se desarrollen con propósitos científicos enmarcados en la línea de investigación de estos proyectos.

Para constancia,

_____ Nombre del participante	_____ Firma/huella del participante	_____ Fecha
_____ Nombre del testigo	_____ Firma del testigo	_____ Fecha
Como constancia firma:	_____ Firma del director del proyecto	_____ Fecha