

005911
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Helicobacter pylori Y EL GEN ASOCIADO A LA
CITOTOXINA (*cagA*) EN PACIENTES MEXICANOS
CON ULCERA PÉPTICA HEMORRÁGICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

GONZALO CASTILLO ROJAS

TUTOR: DRA. YOLANDA LOPEZ VIDAL

UNAM
POSGRADO



MEXICO, D. F.

JUNIO 2003



I



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Helicobacter pylori Y EL GEN ASOCIADO A LA CITOTOXINA (*cagA*) EN PACIENTES MEXICANOS CON ÚLCERA PÉPTICA HEMORRÁGICA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección de la Dra. Yolanda López Vidal en el laboratorio del Programa de Inmunología Molecular Microbiana, en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Yolanda López Vidal	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Dr. Alejandro Cravioto Q.	Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Sergio Ponce de León Rosales, del Departamento de Consulta Externa y Servicios Paramédicos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán", quién me asesoró en todos y cada uno de los análisis estadísticos de los resultados de esta tesis.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (27557-M), DGPA-UNAM (IN218698) y PAEP-UNAM (202307). Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. José Luis Puente García	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dr. Heliodoro Celis Sandoval	Instituto de Fisiología, UNAM
Vocal	Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz	Inst. de Invest. Biomédicas, UNAM
Secretario	Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Edgardo Escamilla Marván	Instituto de Fisiología, UNAM
Suplente	Dr. Edmundo Calva Mercado	Instituto de Biotecnología, UNAM

Dedico este trabajo:

A mi Mamá Maria del Carmen Rojas C. y a mis Hermanos José Luis y José por el gran apoyo que me han brindado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la educación y formación que me ha brindado y que ha sido mi casa en estos últimos años.

Agradecimientos:

Agradezco a la Dra. Yolanda López Vidal por la oportunidad de realizar el presente trabajo, por brindarme parte de su tiempo y por su amistad.

Al Dr. Sergio Ponce de León Rosales por ser un maestro y sobre todo un amigo.

A la Señora Maria Elena Tapia Labourdette por el apoyo que me ha brindado todos estos años y por considerarme como un hijo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio "Programa de Inmunología Molecular Microbiana".

A la Química Rosa I. Amieva F. por su apoyo para el cultivo de las cepas de *H. pylori*.

INDICE GENERAL

	página
RECONOCIMIENTOS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE GENERAL	iv
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE GRÁFICAS	viii
RESUMEN	ix
SUMMARY	x
ABREVIATURAS	xi
<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>1</u>
Características microbiológicas de <i>H. pylori</i> .	1
Epidemiología de la infección por <i>H. pylori</i> .	2
Modo de transmisión de <i>H. pylori</i> .	4
Patogénesis de la infección por <i>H. pylori</i> .	5
Úlcera péptica hemorrágica.	16
<u>JUSTIFICACIÓN</u>	<u>19</u>
<u>HIPÓTESIS</u>	<u>19</u>
<u>OBJETIVOS</u>	<u>20</u>
Objetivo general.	20
Objetivos particulares.	20
<u>METODOLOGÍA</u>	<u>21</u>
Pacientes.	21

Endoscopia y muestreo.	21
Histología.	22
Cultivo Microbiológico.	22
Conservación de las cepas.	23
Extracción de DNA de las biopsias gástricas.	23
Detección de <i>H. pylori</i> en las biopsias gástricas por PCR.	23
Detección del gen <i>cagA</i> en las biopsias gástricas.	24
Obtención de las sondas CAG4, CAG25 y 16S.	24
Sensibilidad y especificidad de los ensayos de PCR.	25
Determinación del polimorfismo de gen <i>cagA</i> .	25
Detección del gen <i>cagA</i> de las cepas de <i>H. pylori</i> .	26
Análisis de los resultados de la amplificación por PCR e hibridación.	27
Secuenciación de los productos de PCR.	27
Secuenciación completa del gen <i>cagA</i> .	27
Análisis de las secuencias de DNA.	28
Seroprevalencia de <i>H. pylori</i> .	29
Métodos estadísticos.	29
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIONES	72
PERSPECTIVAS	73
BIBLIOGRAFÍA	74
ARTÍCULO PUBLICADO	89

INDICE DE TABLAS

	página
TABLA 1. Iniciadores usados para la detección de <i>H. pylori</i> y el gen <i>cagA</i> por PCR.	31
TABLA 2. Características demográficas y prevalencia de <i>H. pylori</i> por diferentes métodos en los tres grupos de sujetos estudiados.	40
TABLA 3. Detección del gen <i>cagA</i> por PCR en las biopsias positivas por PCR- <i>16S RNAr</i> a <i>H. pylori</i> .	42
TABLA 4. Anticuerpos IgG e IgA contra la proteína recombinante de CagA y ureasa de <i>H. pylori</i> por ELISA.	42
TABLA 5. Patrones de amplificación del gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> por PCR usando diferentes iniciadores.	46
TABLA 6. Detección del gen <i>cagA</i> por PCR usando diferentes pares de iniciadores. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la amplificación.	47
TABLA 7. Análisis de las secuencias de nucleótidos de los productos de PCR del gen <i>cagA</i> .	51
TABLA 8. Proporción de sustituciones sinónimas y no sinónimas por sitio del fragmento de 243 pb del gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> .	55
TABLA 9. Diversidad de las secuencias del fragmento de 243 pb del gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> .	55

INDICE DE FIGURAS

	página
FIGURA 1. Gen <i>cagA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> .	11
FIGURA 2. Variantes de la estructura primaria del extremo 3' del gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> .	12
FIGURA 3. Posibles vías de señalización inducidas en las células epiteliales después del contacto con <i>H. pylori</i> y la translocación de la proteína CagA.	15
FIGURA 4. Representación esquemática de la secuencia de la proteína CagA de <i>H. pylori</i> conteniendo tres motivos (I, II y III) con homología a sitios de fosforilación por tirosina cinasa eucariótica [RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y.	16
FIGURA 5. Asociación de <i>H. pylori</i> con la úlcera péptica sangrante.	41
FIGURA 6. Hibridación de colonias de cultivo primario de <i>H. pylori</i> con la sonda CAG4.	43
FIGURA 7. Detección del gen <i>cagA</i> por dot blot-hibridación	44
FIGURA 8. Representación esquemática de la amplificación del gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> por PCR usando diferentes pares de iniciadores.	45
FIGURA 9. Análisis de la sensibilidad y especificidad de cada par de iniciadores utilizando la curva ROC.	48
FIGURA 10. Asociación en la detección del gen <i>cagA</i> por PCR con siete pares de iniciadores y cuadro clínico.	49
FIGURA 11. Análisis de las secuencias del gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> aislado de pacientes mexicanos.	50
FIGURA 12. Sitios polimórficos en el fragmento de 243 pb del gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> de pacientes mexicanos, comparadas con cepas aisladas de pacientes holandeses y chinos.	53
FIGURA 13. Posibles sustituciones de aminoácidos en el fragmento de 243 pb del gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> de pacientes mexicanos, comparadas con cepas aisladas de pacientes holandeses y chinos.	54
FIGURA 14. Análisis filogenético del fragmento de 324 pb del gen <i>cagA</i> de 39 cepas de <i>H. pylori</i> aisladas de pacientes mexicanos, holandeses y chinos.	57
FIGURA 15. Análisis de la estructura primaria de la región 3' del gen <i>cagA</i> de la cepa de <i>H. pylori</i> 53CSN.	58
FIGURA 16. Sitios putativos de fosforilación de tirosina en la proteína CagA de <i>H. pylori</i> .	59

INDICE DE GRÁFICAS

	página
GRÁFICA 1. Comparación de las sustituciones sinónimas (d_S) y sustituciones no sinónimas (d_N) en el fragmento de 400 pb del gen <i>cagA</i> .	52
GRÁFICA 2. Comparación de las sustituciones sinónimas (d_S) y sustituciones no sinónimas (d_N) en el fragmento de 243 pb del gen <i>cagA</i> de 39 cepas de <i>H. pylori</i> aisladas de pacientes mexicanos, holandeses y chinos.	56

RESUMEN

H. pylori-cagA+ incrementa significativamente el riesgo para desarrollar gastritis severa y cáncer gástrico. Sin embargo, la variación alélica del gen *cagA*, puede ser relevante en patogénesis. **Objetivo:** Determinar si la presencia de *H. pylori* y el gen *cagA* incrementan el riesgo de sangrado en pacientes con úlcera péptica y analizar la diversidad alélica del gen *cagA*. **Metodología:** La prevalencia de *H. pylori* se determinó por histología, prueba rápida de ureasa, cultivo, serología y PCR. La diversidad del gen *cagA* fue realizada por PCR, hibridación y secuenciación. **Resultados:** *H. pylori* no se asoció en pacientes con úlcera péptica hemorrágica. La prevalencia de *H. pylori-cagA+* fue del 92%. De 57 cepas de *H. pylori* se obtuvieron 34 patrones de amplicones del gen *cagA*, usando 7 pares de iniciadores, con una sensibilidad y especificidad de amplificación del 19 al 89% y del 26 al 95%, respectivamente. El análisis de las secuencias del gen *cagA* mostró cambios de nucleótidos en los extremos 3' de los sitios complementarios a los iniciadores y dos sitios de fosforilación de tirosina. El análisis filogenético del fragmento de 243 pb del gen *cagA* mostró una asociación entre las cepas mexicanas y holandesas, no así con cepas chinas. **Conclusiones:** El sangrado de la úlcera péptica puede deberse a otros factores de riesgo, más que a *H. pylori-cagA+*. Las secuencias de los fragmentos del gen *cagA* mostraron polimorfismo en los sitios complementarios a los iniciadores y dos sitios de fosforilación de tirosina. La región 5' del gen es altamente conservada.

SUMMARY

H. pylori-cagA+ strains significantly increase the risk of developing severe gastritis and gastric cancer. Nevertheless, allelic variation in the *cagA* gene could be associated with pathogenesis. This study aimed to determine whether *H. pylori* and the *cagA* gene increase the risk of bleeding in patients with peptic ulcers and to analyze the allelic variation of the *cagA* gene. **Methodology:** Prevalence of *H. pylori* was assessed by histological examination, urease fast test, culture, serology and PCR amplification. *cagA* gene diversity was carried out by PCR, genomic DNA hybridization and DNA sequencing. **Results:** *H. pylori* was not associated with the bleeding peptic ulcer group. There was a 92% prevalence for *H. pylori-cagA+*. Thirty four PCR amplification patterns of the *cagA* gene with seven pairs of primers were obtained from 57 *H. pylori* strains, with a sensibility and specificity of amplification between 19% and 89%, and between 26% and 95% respectively. DNA sequence analysis of the *cagA* gene showed nucleotide changes at the ends, 3' from the complementary site to the primers, and two tyrosine phosphorylation sites. The phylogenetic analysis of a 243 bp fragment of the *cagA* gene showed an association between Mexican and Dutch strains, but not with Chinese strains. **Conclusions:** The risk of bleeding in patients with peptic ulcers may be due to factors other than *H. pylori-cagA+*. Sequences of fragments from the *cagA* gene showed polymorphism at the complementary site to the primers and two tyrosine phosphorylation sites, whereas, the 5' region of the *cagA* gene was highly conserved.

ABREVIATURAS

A	Adenina
ABC	Antígeno bacteriano completo
AINES	Anti-inflamatorio no esteroideo
ATP-asa V	Enzima ATPasa vacuolar
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Citosina
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. fetus</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. lari</i>	<i>Campylobacter lari</i>
CagA	Proteína asociada a la citotoxina
<i>cagA</i>	Gen asociado a la citotoxina
CL	Cloro
CLOtest	<i>Campylobacter Like Organism test</i>
CO ₂	Bióxido de carbono
DE	Desviación Estándar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>d_N</i>	Sustituciones no sinónimas
<i>d_S</i>	Sustituciones sinónimas
<i>d_N/d_S</i>	Proporción de Sustituciones no sinónimas y sinónimas
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etiléndiamino tetraacético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
<i>flaA</i>	gen que codifica para la flagelina A
<i>flaB</i>	gen que codifica para la flagelina B
G	Guanina
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G

IL-8	Interleucina 8
Kb	Kilo bases
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilo daltones
M	Molar
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
N ₂	Nitrógeno
NoUP	No úlcera péptica
O ₂	Oxígeno
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RM	Razón de Momios
ROC	Receiver Operating Characteristic
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSC	Solución salina de citratos
T	Timina
UG	Úlcera gástrica
UP	Úlcera péptica
UPH	Úlcera péptica hemorrágica
UreA	Enzima ureasa (subunidad A)
UreB	Enzima ureasa (subunidad B)
UV	Luz Ultravioleta
VacA	Citotoxina vacuolizante
<i>vacA</i>	gen de la citotoxina vacuolizante
<i>vapD</i>	Gen de la proteína asociada a virulencia D
µm	Micrómetros
µL	Microlitro
<i>16S RNAr</i>	Gen <i>16S RNA ribosomal</i>

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) en un principio llamado *Campylobacter pyloridis* y posteriormente, *Campylobacter pylori*. Fue aislado por primera vez por Barry Marshall y Robin Warren en 1982, introduciéndonos a una nueva era en la microbiología clínica al descubrir que la úlcera péptica puede ser causada por una bacteria. Actualmente, se reconoce a *H. pylori* como un importante patógeno en humanos ^{1,2}.

H. pylori causa infección persistente en un alto porcentaje de la población, particularmente en países con un nivel socioeconómico bajo ³. Una vez adquirida la infección, *H. pylori* persiste en la inmensa mayoría de los individuos por años, décadas y posiblemente de por vida. Esta infección trae como resultado una inflamación de la mucosa gástrica (gastritis crónica superficial) e infiltración de polimorfonucleares (gastritis crónica activa). Sin embargo, la mayoría de los individuos infectados son asintomáticos y sólo algunas personas desarrollan úlcera péptica, y algunas otras pueden desarrollar gastritis crónica atrófica, que es un factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma y linfoma gástrico ⁴⁻⁸.

Características microbiológicas de *H. pylori*.

H. pylori es un bacilo gramnegativo, helicoidal o en forma de S, mide 0.3 a 1.0 µm de ancho y 1.5 a 5.0 µm de largo, microaerofílico (O₂ 5%, CO₂ 10% y N₂ 85%), la temperatura óptima de crecimiento es de 35 a 37° C ⁹, aunque, algunas cepas son capaces de crecer a 42° C. También se sabe que puede crecer en presencia de glicerol al 0.5% y en cloruro de trifeniltetrazolium al 0.04%,

una alta humedad puede favorecer el crecimiento del microorganismo. El tiempo de incubación es de 3 a 5 días y ocasionalmente hasta 7 días. Las características bioquímicas más sobresalientes son la catalasa, citocromo oxidasa y la presencia de una potente enzima, la ureasa, que se emplean para la identificación del microorganismo. La morfología colonial de *H. pylori* nos muestra; colonias pequeñas, grises, translúcidas y ligeramente hemolíticas ¹⁰.

Epidemiología de la infección por *H. pylori*.

A pesar de que *H. pylori* infecta la mitad de la población mundial, se observan marcadas diferencias en seroprevalencia entre países y entre comunidades o regiones de un mismo país. Por ejemplo, la población rural afroamericana de Louisiana tiene una prevalencia de *H. pylori* muy parecida a la de países en vías de desarrollo ¹¹. En contraste, la prevalencia de *H. pylori* entre peruanos con un estatus socioeconómico alto, quienes cuentan con su propio suministro de agua es comparable a la de los Estados Unidos ¹².

En países desarrollados la seroprevalencia de *H. pylori* es de entre un 25 a un 50% en población adulta. En Estados Unidos la incidencia de infección es de 0.5 a 1% por año para niños menores de 10 años y se incrementa aproximadamente hasta un 50% en sujetos mayores de 60 años ^{14, 15, 16}. En un estudio realizado en 1999 por Redlinger y cols. ^{16a} en una escuela de una comunidad fronteriza de Estados Unidos y México, encontraron una seroprevalencia del 21% en niños de 4 a 7 años, con una significativa disminución de la seroprevalencia por año (36% en niños de 4 años, 24% en niños de 5 años, 20% en niños de 6 años y 14% en los niños de 7 años), los autores sugieren que la infección por *H. pylori* es transitoria en este grupo de edad. Sin embargo, puede existir un efecto de cohorte. Por otro lado, en población afroamericana, hispana y en indios nativos de Estados

Unidos, la incidencia de la infección por *H. pylori* en etapas tempranas de la vida es sustancialmente alta, así como la transmisión intrafamiliar. Se ha encontrado una asociación directa con el estatus socioeconómico bajo, hacinamiento y pobres condiciones higiénicas ^{14, 17}, como se observa en países en vías de desarrollo, en donde el 80% de la población está infectada a la edad de 20 años, lo que sugiere, que la infección es adquirida en la niñez ¹³. En México un estudio seroepidemiológico realizado por Torres y cols. ¹⁸ en 1998, mostró que el 20% de los niños de 1 año de edad presentaban anticuerpos contra *H. pylori* y que la seropositividad aumentaba hasta un 50% en los niños de 10 años de edad, con una tasa de seropositividad de aproximadamente el 5% anual durante los primeros 10 años de vida que se incrementa en un 80% en los adultos jóvenes de entre 18 y 20 años de edad, lo que indica que la infección por *H. pylori* en México se adquiere en etapas tempranas de la vida ¹⁸ como ocurre en otros países en vías de desarrollo.

La infección por *H. pylori* es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico, que puede actuar a través de diferentes mecanismos, como son: la inducción de hiperproliferación de células gástricas, interferencia con las funciones de los antioxidantes y el incremento en la concentración de especies de oxígeno reactivas y óxido nítrico, las cuales pueden ser responsables del daño oxidativo de los ácidos nucleicos ¹⁹. Sin embargo, se ha sugerido que *H. pylori* puede estar involucrado con el cáncer gástrico en sólo una pequeña proporción de las personas infectadas con el microorganismo ²⁰.

La incidencia de cáncer gástrico tiene una marcada variación geográfica. Japón presenta la más alta incidencia en cáncer a nivel mundial (78.8 por 100,000 habitantes), siendo seis veces mayor que en Estados Unidos (12.1 por 100,000 habitantes). En América Latina, Costa Rica y Brasil presentan una incidencia anual de 45 por 100,000 habitantes. En un estudio realizado en Chiapas,

México por Guarner y cols. en 1993, encontrando una asociación con la presencia de *H. pylori* y el incremento en el riesgo de lesiones neoplásicas y preneoplásicas²¹.

Modo de transmisión de *H. pylori*.

La transmisión de *H. pylori* se considera que ocurre de persona a persona, ya que en la actualidad aún no se conoce la existencia de algún reservorio no humano. Sin embargo, observaciones de transmisión realizadas en *H. pylori* se parecen a las descritas en otras bacterias entéricas, las cuales son frecuentemente transmitidas en las familias por niños. Muchas de estas bacterias entéricas son transmitidas en asociación con los alimentos, agua, de persona a persona y es rara la transmisión por saliva o vómito. El vehículo de infección de mayor importancia para una especie bacteriana en particular es ocasionalmente diferente en ambientes geográficos diferentes, siendo el agua el vehículo más común en países en vías de desarrollo²².

Datos publicados sugieren que los alimentos y posiblemente el agua son vehículos de transmisión para *H. pylori*^{23,24}; sin embargo, los patrones de infección en estos estudios sugieren que la presencia de la bacteria en alimentos y aguas, no refleja directamente el riesgo de infección. Otra vía de transmisión controversial es la fecal-oral, oral-oral y gastro-oral. Argumentos que apoyan la ruta fecal-oral se basaron en el cultivo de *H. pylori* a partir de heces^{25,26}. Sin embargo, no ha sido reproducible la detección del microorganismo por cultivo. Aunque, se ha detectado a *H. pylori* en heces por PCR^{27, 28}, obteniéndose resultados consistentes con la eliminación del microorganismo, pero no se ha diferenciado entre organismos viables y no viables. Por otro lado, el ensayo ha resultado difícil de reproducir, por la presencia de inhibidores en las heces para la reacción de amplificación²⁸, aunque, recientemente se han detectados antígenos de *H. pylori* en

heces por ELISA ^{28a}. Por otro lado, *H. pylori* se ha recuperado de jugo gástrico, lo que posiblemente indica que la regurgitación y el vómito proveen un origen de transmisión del microorganismo. Sin embargo, la baja recuperación de *H. pylori* en boca se explica por el antagonismo de las bacterias en mucosa oral ²⁹.

Patogénesis de la infección por *H. pylori*.

A pesar que *H. pylori* infecta la mitad de la población mundial, la mayoría de los individuos infectados no desarrollan úlcera gástrica o duodenal: esto implica que existen características de las cepas y en el hospedero que juegan un papel importante en la patogénesis de la úlcera péptica. Los aislamientos de *H. pylori* se han clasificado en dos grupos en base a diferencias genotípicas y fenotípicas de sus factores de virulencia, denominadas cepas Tipo I y II ^{30, 80}. Ambas cepas Tipo I y II, son productoras de ureasa, flagelo, adhesinas y proteínas de choque térmico, entre otros componentes. Solo las cepas Tipo I expresan la citotoxina vacuolizante y/o la proteína asociada a la citotoxina (CagA). Esta diferencia de expresión puede ser utilizada para distinguir cepas patógenas de no patógenas.

La ureasa es un factor de virulencia esencial, ya que le permite a *H. pylori* sobrevivir a las condiciones ácidas del lumen del estómago antes que la bacteria alcance la capa de moco. La ureasa es una proteína expresada en gran cantidad por el microorganismo, que representa el 6% del peso seco ³¹, y cataliza la hidrólisis de urea produciendo amonio y carbamato. La enzima está compuesta de seis subunidades de UreA y seis de UreB, organizadas en un doble anillo de 13 nm de diámetro y un tamaño molecular de 550 kDa ^{32, 33}. La biosíntesis de la ureasa es controlada por un grupo de siete genes contiguos (*ureABIEFGH*), que comprenden los genes que codifican para la misma

(*ureAB*) y cinco genes accesorios que son responsables de la captación e inserción de iones de níquel (Ni^{2+}), en el sitio activo de la apoenzima ^{34,35}.

Cepas mutantes ureasa negativas, construidas por la inserción de casetes de resistencia a antibióticos en los genes *ureA*, *ureB* y *ureG* ³⁶, perdieron la actividad de ureasa y no se observaron alteraciones en la tasa de crecimiento, demostrando que la actividad de ureasa no es necesaria para la viabilidad *in vitro* del microorganismo. Sin embargo, estudios realizados en 1994 por Tsuda y cols. ³⁷ utilizando una cepa ureasa negativa en el gen *ureB*, demostraron que está no colonizaba el estómago de ratones desnudos. Además, la coinoculación de una cepa ureasa negativa (*ureG*) con una cepa ureasa positiva, resultó en la colonización de la cepa ureasa positiva en el estómago de cerdos gnotobióticos ³⁸, sugiriendo que no sólo la neutralización del microambiente es la única función de la ureasa. Además, la ureasa puede contribuir a la toxicidad de las células por la producción de amonio, ya que este es tóxico para las células epiteliales por sí mismo. En presencia de cloruro de amonio, la citotoxina vacuolizante (VacA) presenta una mayor actividad vacuolizante comparada con la toxina sola, lo que sugiere una cooperación substancial de la ureasa para que la citotoxina vacuolizante cause daño celular ³⁹.

Otro factor de colonización esencial en *H. pylori* es la movilidad, basado en la inhabilidad de cepas aflageladas, no móviles, para infectar cerdos gnotobióticos ⁴⁰. Normalmente *H. pylori* posee de dos a seis flagelos polares cubiertos por una vaina, la cual es continua con la membrana externa, presentando una composición similar en lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas ⁴¹. Los flagelos están compuestos por dos distintas subunidades de flagelina (*flaA* y *flaB*) ^{42,43}. Las dos subunidades de flagelinas comparten el 50 % de identidad en aminoácidos y probablemente evolucionaron de un

ancestro común. La mutación inducida de estos genes mostró que ambos genes son esenciales para la movilidad^{42,43} y para la colonización de cerdos gnotobióticos⁴⁴.

La unión de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas es considerada un factor de virulencia importante para la colonización del estómago humano. El microorganismo se une a las células epiteliales mediante adhesinas y receptinas⁴⁵. Las adhesinas son proteínas, glicoconjugados o lípidos bacterianos, involucrados en el evento inicial de la colonización mediante la interacción entre la bacteria y los receptores en la superficie de la célula epitelial, tales como: lípidos, proteínas, glicolípidos o glicoproteínas. La adherencia induce una respuesta inflamatoria (infiltración de neutrófilos y monocitos) y eventualmente la persistencia del microorganismo⁴⁵. Las receptinas⁴⁶ son proteínas microbianas con propiedades de unión a proteínas de mamíferos, estas interactúan con proteínas séricas tales como: inmunoglobulinas, albúmina; o bien con proteínas de matriz extracelular (heparina, sulfato de heparan, fibronectina, fibrinógeno, colágeno, laminina, plasminógeno, plasmina y vitronectina), una vez que la bacteria entra en contacto con tejido dañado por acción de factores tóxicos⁴⁵. Estos eventos le permiten a *H. pylori* evadir la respuesta inmune e iniciar una infección crónica de por vida^{45,47}.

Las cepas de *H. pylori* frecuentemente expresan los antígenos Lewis X (Le^x) y/o Le^y en la superficie celular, como un constituyente del antígeno O de su lipopolisacárido^{48,49}, los cuales son parecidos a los antígenos del grupo sanguíneo Lewis y a los glicoconjugados de superficie que expresan las células epiteliales gástricas humanas. Ocasionalmente, *H. pylori* expresa otros antígenos relacionados^{50,51}. Se ha sugerido que la expresión de los antígenos Lewis en *H. pylori* pueden ayudar a evadir la respuesta inmune por el mimetismo del microorganismo y a la promoción de la adherencia bacteriana⁵². Sin embargo, en un estudio reciente hecho por Takata y cols. en 2002

⁵³, demuestran que la expresión de Le^x y Le^y no es necesaria para la colonización de la mucosa gástrica de ratones o para la adherencia de *H. pylori* a células epiteliales gástricas humanas.

Un factor de virulencia importante en *H. pylori* es la citotoxina vacuolizante. Leunk y cols.⁵⁴ reportaron en 1988 que sobrenadantes de cultivos libres de *H. pylori* inducían una fuerte degeneración vacuolar en cultivos de células eucarióticas. Posteriormente, Cover en 1992⁵⁵ demostró que este efecto era debido a una proteína secretada, designada VacA. Esta proteína está codificada por el gen *vacA* como una protoxina de aproximadamente 140 kDa. La secuencia señal (amino terminal) y un fragmento carboxilo terminal son proteolíticamente cortados durante el proceso de secreción de la proteína VacA y finalmente una toxina madura de aproximadamente 88 kDa es exportada^{55, 56, 57, 58}. Las moléculas de la toxina madura son liberadas al espacio extracelular o bien pueden ser retenidas en la superficie de la bacteria⁵⁷.

El polipéptido formando la toxina madura VacA tiende a ser cortado en el sitio donde hay una asa expuesta sensible a proteasas, entre el fragmento amino terminal de 34 kDa denominado p37 y el fragmento carboxilo terminal de 54 kDa denominado p58^{57, 59, 60, 61}. Ambos fragmentos permanecen unidos por uniones no covalentes y pueden corresponder a subunidades estructural y funcionalmente distintas. Cuando se purifica la proteína VacA de sobrenadantes de cultivos líquidos, VacA es recuperada como un complejo oligomérico de una masa mayor a los 900 kDa⁵⁵, esta estructura oligomérica vista al microscopio electrónico semeja a una flor o un copo de nieve de cerca de 30 nm en diámetro^{59, 62}. Dicha estructura está compuesta de dos anillos, cada uno conformado por 6 a 7 monómeros de VacA^{60, 62}. La exposición de VacA a un pH ácido o básico resulta en él desensamblar del complejo oligomérico en monómeros y se asocia con un marcado incremento de la toxicidad de VacA^{59, 63, 64}.

Todas las cepas de *H. pylori* contienen secuencias que hibridan con sondas de *vacA* y casi todas las cepas secretan un producto VacA ^{56, 65, 66}. Sin embargo, existe una considerable variación intercepas en la actividad de la toxina vacuolizante. Esta variación puede parcialmente ser debida a diferencias a nivel de transcripción del gen *vacA* ⁶⁶ y a la variación en la secuencia nucleotídica que codifica para el gen. Atherton y cols. ⁶⁵ en 1995, describieron diferentes familias de alelos en el gen *vacA*, basado en el análisis de secuencias halladas en el extremo 5' del gen (región que codifica la secuencia señal amino terminal y la porción N-terminal de la proteína VacA madura) y en la región media del gen. Secuencias de la región 5' del gen *vacA* se agrupan en dos familias, designadas s1 y s2; la región media se agrupa de igual manera en dos familias, designadas m1 y m2 ^{65, 67, 68}. Todas las posibles combinaciones de estas dos regiones han sido identificadas (aunque el alelo s2/m1 es muy raro). Ensayos realizados en células HeLa muestran que el genotipo s1/m1 se asocia aún alto nivel de actividad vacuolizante, toxinas con el genotipo s1/m2 con una actividad intermedia y el genotipo s2/m2 pierde actividad detectable ⁶⁵. Se ha reportado que pacientes con enfermedad úlcero péptica, son usualmente infectados por cepas con alelo s1, el alelo s2 se ha encontrado predominantemente en pacientes sin úlcera ^{65, 69, 70}, lo que sugiere que la proteína VacA contribuye a la patogénesis de la enfermedad úlcero péptica. Consistente con esta hipótesis, la administración intragástrica de la proteína VacA en ratones causa daño en el epitelio gástrico ⁵⁷.

La proteína VacA induce la formación de vacuolas delimitadas por membranas en las células intoxicadas. Estas membranas están formadas por un híbrido de membranas de endosoma tardío y membrana de lisosoma ^{71, 72}. La vacuolización de las células epiteliales no sólo depende de la proteína VacA, sino también de la presencia de bases débiles como el cloruro de amonio ^{39, 55}. Se han propuesto dos modelos de acción de la citotoxina vacuolizante. El primero postula que la

proteína VacA actúa como una toxina tipo A/B, en donde el dominio carboxilo terminal p58 media la unión a la célula y el dominio amino terminal p37 induce la vacuolización y apoptosis^{73, 74, 75, 76}. Sin embargo, no se ha detectado actividad enzimática asociada con p37 y tampoco un blanco citoplasmático. El segundo modelo de acción es la formación de canales en la membrana celular, donde son endocitados y transportados a la membrana del endosoma tardío y lisosomal, en donde el canal es funcionalmente activo. Estos canales aniónicos facilitan la entrada de Cl^- y HCO_3^- , lo que estimula la actividad de la ATP-asa V, produciendo un incremento en la concentración de amonio en el lumen del endosoma, lo que promueve la acumulación osmótica de agua y por consiguiente el hinchamiento del compartimiento del endosoma⁷⁷⁻⁷⁹.

Otro factor de virulencia importante en *H. pylori* es la proteína asociada a la citotoxina (CagA), la cual fue identificada como un antígeno inmunodominante, expuesto en la superficie de la bacteria, que presenta una variabilidad de tamaño de 120 a 130 kDa, y que está presente en aproximadamente el 60% de las cepas de *H. pylori*^{81, 82}, notablemente, la proteína CagA es frecuentemente coexpresada con la citotoxina vacuolizante (VacA) por lo que se denominó "proteína asociada a la citotoxina" (CagA). Sin embargo, estos genes están separados por 300 kb y la expresión de VacA es independiente de la presencia del gen *cagA*; ya que mutantes nulas en *cagA* expresan la proteína VacA^{80, 83}. Además, la expresión de la proteína CagA por cepas de *H. pylori* es altamente asociada con la ulceración péptica^{81, 82, 84, 85}.

El gen *cagA* codifica para una proteína de 1,147 aminoácidos con una masa teórica de 128,012 Da. La proteína es altamente hidrofílica, muestra una repetición de secuencia EFKNGKNDFSK y EPIYA, y una extensión de seis asparaginas contiguas (Figura 1). En la posición 3,406 pb en la secuencia del gen, un fragmento de 102 pb compuesto de tres segmentos

(Figura 1), que están presentes una vez en la cepa 84-183 (ATCC 53726) y tres veces en la cepa G39. La repetición del segmento de 102 pb es lo que le confiere la variabilidad de tamaño a la proteína CagA. Además, estas repeticiones son ricas en prolina, altamente hidrofílicas con una gran probabilidad de estar expuesta en superficie de la proteína y ser muy inmunogénica ^{81, 86}.

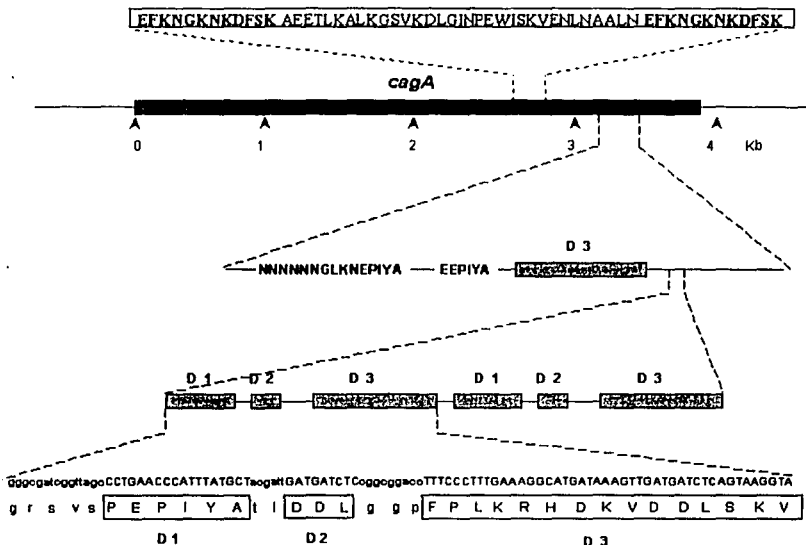


FIGURA 1. Gen *cagA* de *Helicobacter pylori*.

En 1998, Evans y cols. ⁸⁷ analizaron la región variable del gen *cagA*, encontrando que dentro de ésta había dos regiones variables adyacentes que denominaron región variable proximal y distal. La región variable proximal se extiende a partir del motivo de 4 a 6 asparaginas a una secuencia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

repetida de 7 aminoácidos (KIDQLNQ); la región variable distal está confinada entre KIDQLNQ y su duplicado altamente conservado.

Adicionalmente, en 1998 Yamaoka y cols. analizaron el número de secuencias repetidas en la región variable en el extremo 3' del gen *cagA*, describiendo cuatro tipos de estructura primaria (Figura 2), en donde el tipo C de estructura primaria fue asociado con títulos altos de anticuerpos contra la proteína CagA y a un mayor grado de atrofia gástrica⁸⁸. En un estudio posterior, encontró que las cepas con más de 3 regiones repetidas se asociaban con un mayor daño histológico y con una reducida supervivencia a condiciones ácidas⁸⁹. Recientemente, en el 2002 Azuma y cols.^{89a} analizaron el número de secuencias repetidas R1 (EPIYA) en la región variable, encontraron que las cepas con más de 4 secuencias R1 podían asociarse con la patogénesis de atrofia y cáncer gástrico.

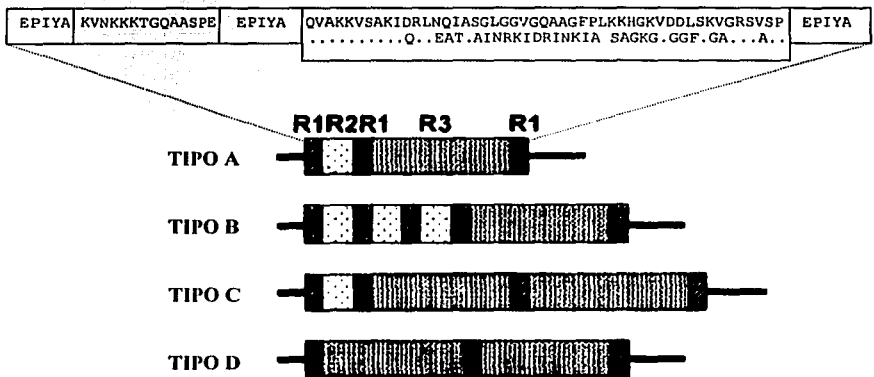


FIGURA 2. Variantes de la estructura primaria del extremo 3' del gen *cagA* de *H. pylori*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Adicionalmente, Censini y cols.⁹⁰ en 1996, analizaron las regiones adyacentes al gen *cagA*, en donde identificaron una región de 40 kb a la que denominaron isla de patogenicidad *cag* (PAI-*cag*). La PAI-*cag* es un locus que está insertado en el gen cromosomal de la glutamato racemasa (*glr*), contiene 31 genes y está flanqueada por repeticiones directas involucradas en la integración del locus en el genoma. La presencia de un segmento de inserción 605 (IS605) y el hecho de que su contenido de G + C (35%) es menor que el resto del genoma de *H. pylori* (39%), sugiere que ésta fue adquirida de otro microorganismo por transferencia horizontal⁹⁰⁻⁹³. Adicionalmente, el orden de los genes en la PAI-*cag* es esencialmente conservado entre las cepas de *H. pylori*⁹¹⁻⁹³.

Diferentes estudios revelaron que la PAI-*cag* puede encontrarse como una simple unidad continua o dividida en dos regiones (*cagI* y *cagII*) ya sea por el elemento de inserción IS605 o por un segmento de DNA cromosomal, así como también puede haber pérdida parcial de la isla de patogenicidad⁹⁰⁻⁹⁴. Esta variación en la estructura de PAI-*cag* explica la existencia de cepas PAI-*cag*⁻ y cepas PAI-*cag*⁺. Por otro lado, seis de los genes en la PAI-*cag* son homólogos a genes presentes en los operones con un arreglo colineal en *Bordetella pertussis*, *Agrobacter tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophilla*, *Rickettsia prowazekii* y *Brucella suis*. Estos operones codifican para un sistema de secreción de proteínas tipo IV (SSPT-IV) especializado en la transferencia de complejos multimoleculares a través de la membrana bacteriana hacia el espacio extracelular, o adentro de otra célula^{95,96}.

Un gran número de eventos ocurre en las células epiteliales después del contacto con *H. pylori* PAI-*cag*⁺. Esto es, se induce la secreción de IL-8 en células epiteliales, la cual es un mediador de inflamación por la activación del complejo del factor nuclear kappa beta (NF- κ B); también se induce el barrido de las microvellosidades en el sitio de unión con las células y el

rearrreglo del citoesqueleto con la formación del pedestal ⁹⁷, debido a la fosforilación de la proteína CagA ⁹⁸⁻¹⁰¹; la activación del factor de transcripción AP-1, la expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* por la activación de la cascada de las ERK/MAP cinasas, resultando en la fosforilación de ELK-1 y el incremento en la transcripción de *c-fos* ^{95, 102}.

Se han propuesto dos posibles vías de señalizaciones que ocurren en las células epiteliales después del contacto con *H. pylori*. La primera involucra un factor desconocido que es translocado por el SSPT-IV de la PAI-*cag*, el cual activa el factor de transcripción NF- κ B lo que induce la expresión de IL-8. Este mecanismo tal vez involucra la activación de la MAP cinasa y del factor de transcripción AP-1 (Figura 3) únicamente. Lo que aún no es claro es que si esta vía requiere un efector desconocido, o simplemente es activada por el SSPT-IV al perturbar la membrana celular ¹⁰³.

La segunda vía involucra la proteína CagA; esta proteína es translocada por el SSPT-IV a las células eucarióticas, en donde es fosforilada en sus residuos de tirosina de la secuencia EPIYA (Figura 4) localizada en la región variable del extremo carboxilo terminal de la proteína CagA ^{104, 105} por la cinasa eucariótica c-Src ^{106, 107}, una vez fosforilada CagA (CagA-P), ésta se une a la fosfatasa Shp-2. Este complejo puede activar diversas vías: i) puede unirse directamente a la proteína del síndrome neural Wiskott-Aldrich (N-WASP) y promover la unión al factor de nucleación de actina Arp2/3 y así estimular la polimerización de actina con la consecuente formación del pedestal (Figura 3); ii) alternativamente, el complejo proteico CagA-P-SH2 puede activar a proteínas pequeñas de la familia Rho ligadora de GTP (Cdc42, Rac o Chp), las cuales controlan la organización del citoesqueleto de actina. iii) por otro lado, el complejo proteico CagA-P-SH2 puede disparar una cascada de señalizaciones, posiblemente vía MAP cinasas e inducir la transcripción de genes nucleares. Sin embargo, aún no hay evidencias suficientes que apoyen esta última vía ¹⁰³.

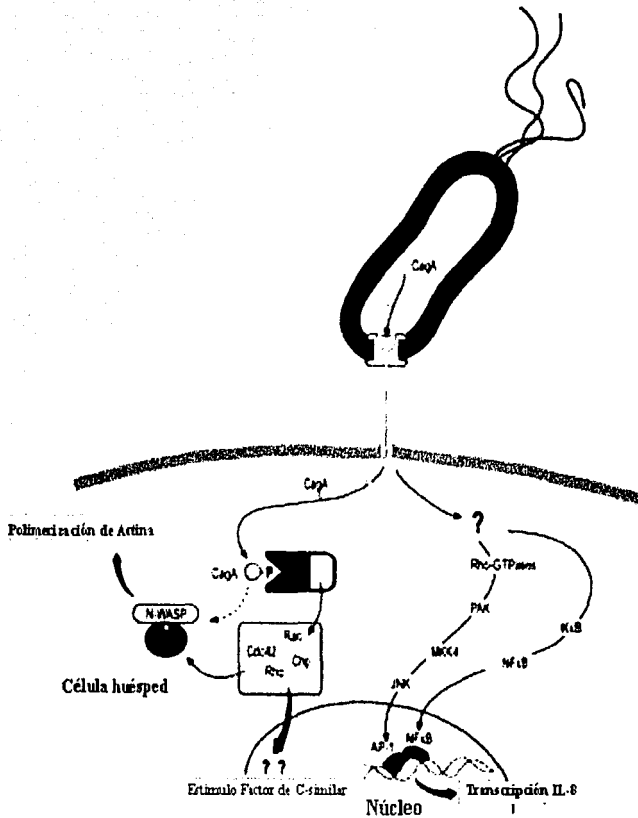


FIGURA 3. Posibles vías de señalización inducidas en las células epiteliales después del contacto con *H. pylori* y la translocación de la proteína CagA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

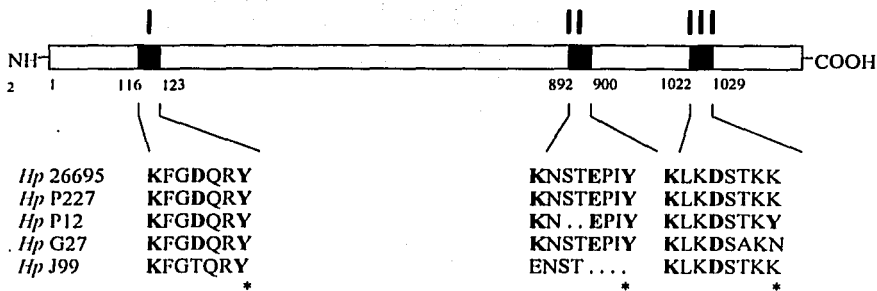


FIGURA 4. Representación esquemática de la secuencia de la proteína CagA de *H. pylori* conteniendo tres motivos (I, II y III) con homología a sitios de fosforilación de tirosina cinasas eucarióticas ([RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y).

Si bien el gen *cagA* es considerado como un marcador de virulencia, reportes previos sugieren la existencia de variación alélica en cepas de *H. pylori* aisladas de poblaciones étnicas diferentes^{108, 109 110}, datos que fueron confirmados por Arie van der Ende y cols.¹¹¹ basados en la comparación de un fragmento de 243 pb del gen *cagA* aislado de pacientes holandeses y chinos. Sin embargo, los estudios de la heterogeneidad del gen *cagA* (a excepción de los últimos artículos mencionados) se han limitado a las secuencias parciales de la región variable carboxilo terminal.

Úlcera péptica hemorrágica.

H. pylori se asocia en el 90% a la úlcera péptica. Sin embargo, una entidad clínica en la cual la asociación de *H. pylori* no es clara es la úlcera péptica hemorrágica, la cual es una complicación

severa de la úlcera péptica, siendo una causa de hospitalización de emergencia y el intervalo de mortalidad (del 6 al 7%) por esta complicación se ha mantenido a pesar de la introducción de los medicamentos anti-secretores ¹¹². Si bien *H. pylori* se asocia con la úlcera péptica y gastritis crónica, la erradicación del microorganismo reduce las recurrencias, no sólo de la úlcera péptica, sino que además del riesgo de sangrado en pacientes sin otros factores de riesgo ^{113, 114}. Sorprendentemente, una baja prevalencia de *H. pylori* en pacientes con úlcera péptica hemorrágica ha sido reportado, al compararse los pacientes con úlcera péptica sin complicación alguna. Sin embargo, estos resultados son controversiales, ya que Graham y cols. ¹¹⁵ en 1991 detectaron una seroprevalencia de *H. pylori* del 55.6% en los pacientes con esta complicación, misma frecuencia que aumenta con la edad, siendo independiente de la ingesta de medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES).

En estudios realizados por Rokkas y cols. ¹¹⁶ y Jarpersen y cols. ^{117, 118}, ambos en 1995, en donde se evaluó la erradicación de *H. pylori* en pacientes con úlcera péptica hemorrágica, encontrándose una reducción en la tasa de recurrencias de la formación de úlceras y del sangrado en éstos pacientes. Sin embargo, Tagaris y cols. en 1995 ¹¹⁹, cuestionaron el papel de *H. pylori* en la úlcera péptica hemorrágica, y más aún, han descrito la infección por *H. pylori* como un factor protector, debido a que *H. pylori* no influye en la incidencia o severidad de las hemorragias gastrointestinales. Aunque, la limitante de éstos estudios ha sido el empleo de métodos de diagnóstico como son la serología, el CLOtest e histología con tinción de plata y en algunas ocasiones la prueba de urea en aliento con ¹⁴C para el diagnóstico de *H. pylori*, en donde los resultados obtenidos podrían reflejar la sensibilidad y especificidad de las pruebas seleccionadas. En este sentido, la prueba rápida de ureasa para la detección de *H. pylori* ha sido cuestionada en presencia de residuos de sangre, lo cual ha llevado a subestimar la presencia de *H. pylori* ¹²⁰.

Por otro lado, la discusión de la baja prevalencia de *H. pylori* en los pacientes con úlcera péptica hemorrágica, se debe a la inclusión de pacientes con ingesta de antiinflamatorios no esteroideos, que es un factor de riesgo reconocido para el sangrado de pacientes con úlcera péptica, principalmente en pacientes con úlcera gástrica ^{119, 121}.

Recientemente Stack y cols. ¹²² en 2002, asociaron la infección por *H. pylori* CagA positivo con un mayor riesgo de que la úlcera sangre. También observaron que el riesgo de sangrado disminuye en sujetos con ingesta de AINES diferentes a la aspirina e infectados con *H. pylori* CagA positivo.

JUSTIFICACION

Se ha descrito que la prevalencia de *H. pylori* en la úlcera péptica sangrante es baja comparada con la úlcera péptica no sangrante. Sin embargo, la erradicación de *H. pylori* virtualmente previene el resangrado de la úlcera péptica en la mayoría de los casos, donde el sangrado ha sido endoscópicamente controlado, más aún, el papel de *H. pylori* no ha sido completamente definido como un contribuyente importante para que la úlcera péptica sangre. *H. pylori cagA+* se asocia a la úlcera péptica en el 40 al 90%, por lo que el gen *cagA* tiene un papel importante en patogénesis.

HIPOTESIS

Las cepas de *H. pylori* se asocian en el 90% de las úlceras pépticas, por lo que, las cepas de *H. pylori cagA* positivas podrían estar asociadas con el sangrado de la úlcera péptica y los cambios en la estructura genética del gen *cagA* pueden estar asociados a la patogénesis de *H. pylori*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de *Helicobacter pylori* y el gen asociado a la citotoxina (*cagA*) en biopsias de pacientes mexicanos con úlcera péptica hemorrágica y analizar la diversidad alélica del gen *cagA*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar la frecuencia de *Helicobacter pylori* por varias técnicas en pacientes con úlcera péptica hemorrágica.
- 2) Comparar las secuencias parciales y completa del gen *cagA* de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos con diferentes cuadros clínicos y evaluar la diversidad alélica del gen *cagA*.

METODOLOGIA

Este trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio del programa de inmunología molecular microbiana del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Pacientes. Pacientes con úlcera gástrica o duodenal, con sangrado activo y/o reciente (UPH), fueron reclutados en un estudio prospectivo, transversal, doble ciego, que llegaron al servicio de Gastroenterología del Hospital Central Sur de alta especialidad de Petróleos Mexicanos, de noviembre 1995 a agosto de 1997. Dos grupos de pacientes fueron simultáneamente incluidos como controles: pacientes con úlcera péptica sin sangrado (UP); y pacientes a los que se les realizó una endoscopia por presentar dispepsia no ulcerosa y/o reflujo gastroesofágico (NoUP). Estos sujetos fueron estratificados acorde a tabaquismo e ingesta esporádica de anti-inflamatorios no esteroideos (AINES). Los pacientes fueron excluidos del estudio en los siguientes casos: embarazo, ingesta regular de AINES, enfermos hepáticos crónicos, con historia de sangrado por hipertensión portal o por incapacidad para tomar la decisión de participar. Los pacientes fueron también excluidos si ellos recibieron cualquier clase de medicamento antisecretor en las dos semanas previas al estudio. Todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio.

Endoscopia y muestreo. Se realizó una panendoscopia gastrointestinal en todos los pacientes, así como, la toma de sangre venosa. Los pacientes con úlcera sangrante fueron estudiados en las primeras 24 horas después de su ingreso a la sala de urgencia. Aquellos pacientes con pérdida de sangre severa, fueron estabilizados y las muestras fueron tomadas 48 horas después de que el

sangrado fue controlado. Se tomaron al menos siete biopsias de la mucosa gástrica de cada paciente; cuatro fueron de antro y tres de cuerpo. Una biopsia de cada región fue utilizada en la prueba rápida de ureasa (Hp FAST GL Supply Camp Hill PA, USA). Se utilizó una muestra de antro y cuerpo para histología. Las muestras restantes se transportaron en medio de Stuart ¹²³ del servicio de Gastroenterología al laboratorio del Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina, UNAM para el cultivo microbiológico de *H. pylori*. Por otro lado, se realizó la detección molecular de *H. pylori* por PCR. Los hallazgos endoscópicos se clasificaron de acuerdo a la clasificación de Forrest ¹²⁴ (localización y tamaño de la úlcera). Después de cada estudio, el endoscopio y las pinzas fueron lavadas con detergente, desinfectadas con glutaraldehído al 2%, por 20 min. y lavadas en solución estéril.

Histología. Biopsias gástricas de cuerpo y antro fueron embebidas en parafina; se realizaron cortes histológicos y se tifaron con hematoxilina y eosina para medir el grado de gastritis. La tinción de Giemsa se usó para detectar *H. pylori*. La clasificación y grado de gastritis se realizó basado en el sistema de Sydney ^{125, 126}. La detección de la presencia de *H. pylori* fue realizada por dos patólogos que no mantuvieron comunicación para efecto del estudio.

Cultivo Microbiológico. Las biopsias de antro y cuerpo de cada paciente se estudiaron por separado. Cada biopsia fue homogenizada y diluida en 500 µl de solución salina isotónica estéril. 100 µl fueron empleados para el aislamiento de *H. pylori* en placas de agar sangre de caballo [(base de agar Casman BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md) con 10% de sangre de caballo y cultivadas en condiciones de microaerofilia, 5% oxígeno y 10% dióxido de carbono (CampyPack Plus, Becton Dickinson) por 5 días a 37° C]. Los organismos fueron identificados como *H. pylori* por morfología colonial, tinción de Gram, y por confirmación de las pruebas

positivas de ureasa, catalasa y citocromo oxidasa ⁹. Así como, por la amplificación del gen *16S RNAr* por PCR ¹²⁷. El remanente del homogenizado se depositó en un vial y se almacenó a -70° C, hasta su uso para la extracción de DNA.

Conservación de las cepas. Las cepas identificadas como *H. pylori* fueron guardadas en caldo Brucella suplementado con suero fetal bovino al 10% y glicerol al 15%, los viales se almacenaron a -70° C.

Extracción de DNA de las biopsias gástricas. El DNA cromosomal se extrajo de cada biopsia gástrica por el método de tiocianato de guanidina ¹²⁸. Brevemente, se adicionaron 500 µl de una solución de tiocianato de guanidina-EDTA-sarcosinato a 100 µL del homogenizado de la biopsia, se mezclaron suavemente. Se agregaron 250 µl acetato de amonio 7.5 M y se mezcló. Se adicionaron 550 µL de cloroformo - alcohol isoamílico (1:24) y se mezclaron por 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas por 15 min. a 16,000 X g. El sobrenadante fue transferido a tubos nuevos y se le adicionó 600 µL de isopropanol, se mezclaron y se centrifugaron por 5 min. El DNA precipitado fue lavado dos veces con etanol al 70% y se dejaron secar por 10 min. Las muestras se almacenaron a -70° C hasta su uso.

Detección de *H. pylori* en las biopsias gástricas por PCR. La detección de *H. pylori* se realizó por la amplificación del gen *16S RNA ribosomal* por PCR. Método descrito por Sheng-Ang y cols. ¹²⁷ (ver Tabla 1). Cinco µl del templado de DNA fueron adicionados a 25 µl de una mezcla de reacción para PCR, que contenía: Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1.0 mM, gelatina 0.01% (peso/vol.), 200 µM de cada uno de los deoxinucleótido (Boehringer, Mannheim), 10 pmol de cada uno de los iniciadores y 1U de *Taq* DNA polimerasa (Boehringer, Mannheim).

La amplificación por PCR se realizó en un termociclador GeneAmp 9700 (PE, Applied Biosystems). Para cada ensayo de amplificación por PCR, se incluyó DNA de *H. pylori* 84-183 como control positivo y DNA de *E. coli* DH5 α como control negativo, así como agua como un control negativo de contaminación. Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y examinados en un transiluminador con luz ultravioleta (UV).

Detección del gen *cagA* en las biopsias gástricas. Para la detección del gen *cagA* se emplearon dos pares de iniciadores, *cagA1-cagA2* descrito por Lage y cols.¹²⁹ y F1-B1 por Tummuru y cols.⁸² (Tabla 1). La detección del gen *cagA* fue hecha usando una mezcla de reacción de PCR similar a la mencionada arriba. Diez microlitros de los productos de PCR fueron pasados a través de una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham) y fijada con luz UV. La hibridación de la membrana se realizó a 55° C con la sonda CAG4-digoxigenina (10 ng/ml). La membrana se lavó primero con una solución salina de citratos (SSC) 2X y 0.1% de dodecil sulfato de sodio (SDS) y posteriormente con una solución de SSC 0.1X - 0.1% SDS a 65° C por 1 hora, cada lavado. El revelado de la membrana se realizó acorde a las indicaciones del fabricante (Kits for Labeling and Detection. Boehringer, Mannheim).

Obtención de las sondas CAG4, CAG25 y 16S. Las sondas CAG4 Y CAG25 fueron obtenidas a partir de los productos amplificados por PCR del gen *cagA* de la cepa de *H. pylori* 84-183 (ATCC 53726), con los iniciadores *cagA1-cagA2* y DRO2-DRO4, respectivamente. La sonda 16S fue obtenida por PCR a partir del gen *16S RNA ribosomal* de *Escherichia coli*, clonado en el plásmido pKK3535. Los productos de PCR fueron purificados usando Wizard PCR preps DNA

(Promega, Madison, USA) y marcados con digoxigenina de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Kits for Labeling and Detection, Boehringer, Mannheim).

Sensibilidad y especificidad de los ensayos de PCR. Diluciones seriadas de DNA de la cepa *H. pylori* 84-183 (de 100 ng a 0.0001 ng), fueron utilizadas como templado en reacciones de amplificación por PCR con los iniciadores Hp1, Hp2 y Hp3, *cagA1-cagA2* y F1-B1. Por otro lado, la especificidad de la amplificación por PCR del gen *16S RNAr* fue evaluada utilizando DNA de linfocitos humanos, así como DNA de *Escherichia coli* DH5 α , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Campylobacter jejuni* 217. La amplificación del gen beta-globina fue utilizada como un control interno en las biopsias gástricas. Para determinar cuál de los juegos de iniciadores (*cagA1-cagA2* y F1-B1) era el mejor en la detección del gen *cagA* por PCR. Se emplearon 20 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos y provenientes de diferentes cuadros clínicos, con ambos juegos de iniciadores. Para determinar la especificidad del ensayo de PCR-Hibridación con los iniciadores *cagA1-cagA2*, en la detección del gen *cagA* en las biopsias gástricas positivas por PCR-*16S RNAr*. Se empleó el DNA de las cepas de *H. pylori* 84-183 y 88-23 (ambas *cagA* positivas) y Hp 88-22 (*cagA* negativa), así como también, el DNA de las cepas de *C. jejuni* 217 y *E. coli* DH5 α , usados como controles negativos.

Determinación del polimorfismo de gen *cagA*. Se estudiaron 57 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos con diferentes cuadros clínicos (11 cepas aisladas de pacientes con UP, 18 de UPH y 24 cepas de pacientes NoUP) y 5 cepas de referencia como controles (*H. pylori* 88-22, 88-23, 84-183, 86-313 y ATCC 43504). El DNA cromosomal fue extraído de cada una de las cepas de *H. pylori* por el método de tiocianato de guanidina ¹²⁹, anteriormente descrito. Se

emplearon 5 pares de iniciadores previamente descritos (ver Tabla 1) y dos pares de iniciadores diseñados a partir de las secuencias de DNA reportadas en el banco de genes ^{129a} [X70039, L11714, AE000511 y AE001439 (CCUG 17874, ATCC 53726, Hp 26695 y Hp J99, respectivamente)]. Las secuencias obtenidas del banco de genes fueron alineadas utilizando los programas ALIGN (Scientific and Educational software), ClustalW (BCM Search Launcher: Multiple Sequence Alignments) ^{129b} y PRIMER DESIGNER (Scientific and Educational software). La amplificación por PCR se realizó de acuerdo a las condiciones arriba descritas, las temperaturas de amplificación se muestran en la Tabla 1. Los productos de amplificación por PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, tenidos con bromuro de etidio y examinados bajo la luz UV.

Detección del gen *cagA* de las cepas de *H. pylori*. Un µg de DNA de cada una de las cepas de *H. pylori* arriba descritas, así como de los siguientes microorganismo: *C. jejuni* 217, *C. coli* 183-83, *C. fetus* INN783, *C. lari* 83A-2872, *E. coli* DH5α, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y del plásmido pCR53N241 (contiene un fragmento de 2.5 kb del gen *cagA* de un aislamiento clínico mexicano) fueron hibridadas con las sondas CAG4 y CAG25-digoxigenina, para asegurar la especificidad de los 7 juegos de iniciadores para la detección del gen *cagA*. La hibridación de las membranas se realizó a 55° C con la sonda CAG4 o CAG25. La membrana fue lavada primero con SSC 2X - 0.1% SDS y después con SSC 0.1X - 0.1% SDS a 65° C por 1 hora cada lavado. El revelado se realizó acorde a las indicaciones del fabricante (Kits for Labeling and Detection. Boehringer, Mannheim). Como control de la presencia de DNA se utilizó la sonda 16S-digoxigenina, la hibridación se realizó a 42° C, la membrana fue lavada durante 15 minutos con SSC 2X - 0.1% SDS y luego con SSC 0.1X - 0.1% SDS a temperatura ambiente. El revelado

se realizó acorde a las indicaciones del fabricante (Kits for Labeling and Detection. Boehringer, Mannheim).

Análisis de los resultados de la amplificación por PCR e hibridación. El análisis de la sensibilidad y especificidad de cada uno de los pares de iniciadores fue realizado al comparar los resultados del ensayo de hibridación con las sondas CAG4 y CAG25, como el estándar de oro, con los resultados de la amplificación por PCR. Se construyó una curva ROC (Receiver Operating Characteristic) ^{129c} como la función discriminatoria para determinar el mejor par de iniciadores para la detección del gen *cagA* por PCR. Sobre la base de los resultados obtenidos de los diferentes patrones de amplificación, se seleccionaron los productos de PCR para su secuenciación.

Secuenciación de los productos de PCR. Los productos de PCR amplificados con los diferentes pares de iniciadores fueron purificados usando Wizard PCR preps DNA (Promega, Madison, USA) y secuenciados en ambas direcciones usando un ABI PRISM, BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE, Applied Biosystems) y el electroferograma fue obtenido usando el secuenciador ABI PRISM 377 DNA Sequencer (PE, Applied Biosystems).

Secuenciación completa del gen *cagA*. Para la secuenciación del gen completo se empleó el DNA de la cepa de *H. pylori* 53C5N aislada de un paciente mexicano con úlcera péptica hemorrágica. La amplificación del gen se realizó empleando los iniciadores DRO2-DRO4 y DRO6-DRO8, la mezcla de reacción de PCR y condiciones de amplificación fueron similar a las descritas arriba. Los productos de PCR fueron purificados usando Wizard PCR preps DNA (Promega, Madison, USA), estos productos de PCR fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO

utilizando el TOPO TA Cloning Kit, acorde a las indicaciones del fabricante (Invitrogene, Life technologies) y utilizados para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue, de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Epicurian Coli XL1-Blue Competent Cells. Stratagene, La Jolla. CA). El plaqueo de las células transformantes se realizó en placas de agar Luria conteniendo 40 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido (X-gal), 20 mM de isopropil-1-tio-beta-D-galactopiranosido (IPTG) y 50 µg/mL de Kanamicina. Se tomaron 10 colonias blancas y se crecieron en caldo Luria conteniendo 50 µg/mL de Kanamicina. La extracción de los plásmidos se realizó por lisis alcalina, utilizando el Quantum prep. Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad, Laboratories). La selección del plásmido se realizó por PCR, utilizando los iniciadores M13 Forward (-20) y M13 Reverse. Los plásmidos seleccionados fueron secuenciados en ambas direcciones a partir de los sitios de secuenciación M13, con los iniciadores M13 Forward (-20) y M13 Reverse, utilizando un ABI PRISM, BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE, Applied Biosystems), los electroferogramas fueron obtenidos usando el secuenciador ABI PRISM 377 DNA Sequencer (PE, Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron analizadas usando el programa de DNAMAN versión 3.0 (Lynnon BioSoft, 1994-97) para obtener los iniciadores para la secuencia completa del inserto. El ensamblaje de las secuencias obtenidas en ambas direcciones, se realizó con el programa Sequense assembly de DNAMAN.

Análisis de las secuencias de DNA. Las secuencias de DNA fueron analizadas con los programas ALIGN (Scientific and Educational software), ClustalW (BCM Search Launcher: Multiple Sequence Alignments) y BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool) ¹³⁰. El análisis filogenético y de evolución molecular fue realizado usando el algoritmo de "neighbor-joining" de Saitou y Nei, con la medición de distancias de Kimura, dos parámetros implementado en el programa de MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) ¹³¹. La proporción de

sustituciones sinónimas (d_S) y no sinónimas (d_N) en sitios sinónimos y no sinónimos, respectivamente, se realizó utilizando el método de Nei-Gojobori con la corrección de Jukes-Cantor, implementado en el programa de MEGA y por el programa SWAAP versión 1.0.0¹³².

Seroprevalencia de *H. pylori*. Anticuerpos IgG e IgA contra los antígenos de bacteria completa y contra las proteínas recombinantes de CagA y ureasa, fueron medidos en las muestras de suero de los pacientes de los tres grupos estudiados, por un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Estos ensayos se realizaron según lo descrito previamente^{18, 133}. Brevemente, la concentración de cada antígeno fue la siguiente: 0.5 µg/pozo para antígenos de bacterias completas; 0.1 µg/pozo para IgG contra CagA y 0.5 µg/pozo para IgA contra CagA, IgA e IgG contra ureasa. La dilución de los sueros fue 1:1000 para los antígenos de bacterias completas, 1:200 para IgG anti CagA; 1:400 para IgG contra ureasa y 1:50 para IgA contra CagA e IgA contra ureasa. Anticuerpos monoclonales (IgG anti-humano o IgA anti-humano, conjugados con fosfatasa alcalina [Southern Biotech, Birmingham, AL]) fueron diluidos 1:1000, y se incubó por 1 h a 37° C. El sustrato utilizado fue el p-nitrofenilfosfato, 1 mg/ml (Southern Biotech). La absorbancia fue leída a 405 nm (iEMS analyzer, LabSystems, Finland). Los resultados de cada suero fueron expresaron en unidades de ELISA (U). Muestras de sueros con valores > 1.0 U de ELISA fueron consideradas positivas.

Métodos estadísticos. Para propósitos descriptivos, los resultados fueron analizados usando frecuencias relativas, medias aritméticas (desviación estándar, DE) y medianas (intervalos), según fuera apropiado de acuerdo a la distribución y nivel de medición. Los niveles de anticuerpos séricos se analizaron como variables dicotómicas (positivo/negativo) después de que fueron definidas con los puntos de corte. Comparaciones simultáneas a través de los 3 grupos se

sustituciones sinónimas (d_S) y no sinónimas (d_N) en sitios sinónimos y no sinónimos, respectivamente, se realizó utilizando el método de Nei-Gojobori con la corrección de Jukes-Cantor, implementado en el programa de MEGA y por el programa SWAAP versión 1.0.0¹³².

Seroprevalencia de *H. pylori*. Anticuerpos IgG e IgA contra los antígenos de bacteria completa y contra las proteínas recombinantes de CagA y ureasa, fueron medidos en las muestras de suero de los pacientes de los tres grupos estudiados, por un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Estos ensayos se realizaron según lo descrito previamente^{18, 133}. Brevemente, la concentración de cada antígeno fue la siguiente: 0.5 µg/pozo para antígenos de bacterias completas; 0.1 µg/pozo para IgG contra CagA y 0.5 µg/pozo para IgA contra CagA, IgA e IgG contra ureasa. La dilución de los sueros fue 1:1000 para los antígenos de bacterias completas, 1:200 para IgG anti CagA; 1:400 para IgG contra ureasa y 1:50 para IgA contra CagA e IgA contra ureasa. Anticuerpos monoclonales (IgG anti-humano o IgA anti-humano, conjugados con fosfatasa alcalina [Southern Biotech, Birmingham, AL]) fueron diluidos 1:1000, y se incubó por 1 h a 37° C. El sustrato utilizado fue el p-nitrofenilfosfato, 1 mg/ml (Southern Biotech). La absorbancia fue leída a 405 nm (iEMS analyzer, Labsystems, Finland). Los resultados de cada suero fueron expresaron en unidades de ELISA (U). Muestras de sueros con valores > 1.0 U de ELISA fueron consideradas positivas.

Métodos estadísticos. Para propósitos descriptivos, los resultados fueron analizados usando frecuencias relativas, medias aritméticas (desviación estándar, DE) y medianas (intervalos), según fuera apropiado de acuerdo a la distribución y nivel de medición. Los niveles de anticuerpos séricos se analizaron como variables dicotómicas (positivo/negativo) después de que fueron definidas con los puntos de corte. Comparaciones simultáneas a través de los 3 grupos se

realizaron por ANOVA de una cola para variables dimensionales y la prueba de Chi cuadrada para las variables categóricas. En relación a la asociación entre *H. pylori* y la presencia de sangrado, la razón de momios (RM) y su intervalo de confianza al 95%, fueron calculados usando el método exacto¹³⁴. El grupo UPH se tomó como “casos” y se comparó con los grupos de UP y NoUP, denominados “controles”. Para la comparación de los grupos UP y NoUP, el primero se consideró como los “casos” y el segundo como los “controles”¹³⁵. La variabilidad de observador entre patólogos fue medida como se describe por Kramer y cols.¹³⁶. La significancia estadística fue estimada por la prueba exacta de Fisher (Statxact-4 for windows). La consistencia en la detección de *H. pylori* entre el antro y el cuerpo gástrico se evaluó por la prueba pareada de Chi cuadrada de McNemar. El valor de alfa se estableció en 0.05.

TABLA 1. Iniciadores usados para la detección de *Helicobacter pylori* y el gen *cagA* por PCR.

Iniciador	Secuencia 5' → 3'	Tamaño Producto (bp)	Temperatura de Amplificación (° C)	Posición 5' - 3' (bp)	Referencias
Amplificación del gen <i>16S rRNA</i> .					
Hp1	CTGGAGAGACTAAGCCCTCC	109	60	834 - 853	Sheng-Ang y cols. ¹²⁸
Hp2	ATTACTGACGCTGATTGTGC			744 - 763	
Hp3	AGGATGAAGGTTTAAGGATT			407 - 426	
Amplificación del gen <i>cagA</i> .					
cagA1 (93089)	AATACACCAACGCCTCCAAG	400	55	2054 - 2073 ^δ	Lage y cols. ¹³⁰
cagA2 (93261)	TTGTTGCCGCTTTTGCTCTC			2450 - 2431 ^δ	
F1	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG	350	50	691 - 713 ^δ	Tummuru y cols. ⁸²
B1	CTGCAAAAGATTGTTGGCAGA			1039 - 1018 ^δ	
B7629	ACACAGAAGACAGAGCGTTATT	750 ^φ	55	1441 - 1420 ^δ	Tummuru y cols. ⁸²
DRO2	TTGAYACYAAAYAAGATACCG	2343	58	482 - 500 ^δ	Este estudio*
DRO4	TTGCTTGCGTTACCTTGCTG			2824 - 2805 ^δ	
DRO6	GCTAATAGRGAYGCAAGAGC	1428	58	2521 - 2540 ^δ	Este estudio*
DRO8	TARCRITYTTGATTCATGC			3949 - 3930 ^δ	
CagA1	GATATAGCCACTACCACCACCG	570 ^δ	55	1249 - 1270 ^δ	Zhi-Ju y cols. ¹⁰⁹
CagA2	GGAAATCTTTAATCTCAGTTCGG			1819 - 1797 ^δ	
CagA5	GGCAATGGTGCTCTGGAGCTAGGC	324 [‡]	55	1495 - 1519 ^δ	

* Obtenidos a partir de las secuencias previamente reportadas en el banco de genes (Número de acceso del GenBank X70039, L11714, AE000511 y AE001439). ^δ Acorde a Covacci y cols.⁸¹. ^φ Usado con el iniciador F1. [‡] Usado con el iniciador CagA2. Y = C o T, R = A o G.

RESULTADOS

Población del estudio. Las características demográficas de los grupos estudiados se muestran en la Tabla 2. Sesenta y siete pacientes fueron incluidos en el estudio: 30 UPH, 20 UP y 17 NoUP. No existen diferencias significativas en cuanto a sexo, tabaquismo o exposición previa de AINES. Ninguno de los pacientes admitidos refirió ingesta de AINES en las últimas dos semanas previas a su ingreso al estudio.

Hallazgos Endoscópicos: En el grupo UPH, las lesiones fueron localizadas en el estómago en 10 casos (33%); en 16 pacientes (53%) se observaron úlceras duodenales; y la presencia de úlceras múltiples (por ej. gástricas y duodenales) se observó en los 4 casos restantes (14%). Para el grupo UP, la distribución de la localización fue 9 (45%) en el estómago, 9 (45%) úlceras duodenales y 2 (10%) úlceras múltiples. La actividad de sangrado en los pacientes fue medida de acuerdo a la clasificación de Forrest: Ia (2 casos), Ib (2 casos), IIa (5 casos), IIb (8 casos), IIc (7 casos) y III (6 casos). En estos pacientes, el promedio de los niveles de hemoglobina en el momento de su admisión fue de 9.7 g/dl (intervalo 6.0-16) y 25 de ellos (83%) requirieron de transfusión. El número promedio de unidades de sangre requeridas para estabilización fue de 2.1 (intervalo 0 - 8) unidades.

Detección de *H. pylori* por prueba rápida de la ureasa, histología y cultivo. El análisis de la prueba rápida de ureasa demostró una prevalencia de *H. pylori* del 37%, 60% y 65% para UPH, UP y NoUP, respectivamente. No se encontró significancia estadística ($p=0.11$) cuando se comparó a los tres grupos en conjunto. Los resultados de histología mostraron una concordancia aceptable entre los dos observadores, en la evaluación de la presencia de *H. pylori* (78% de

concordancia global, Kappa 0.51, $p < 0.05$). La frecuencia de detección de *H. pylori* varía del 67% al 85% entre los grupos y nuevamente sin significancia estadística (Tabla 2). El cultivo fue positivo para *H. pylori* en sólo 11 pacientes (16.5%) (Tabla 2).

Detección del gen *16S RNAr*, sensibilidad y especificidad por PCR. La frecuencia de *H. pylori* por PCR en el grupo total fue del 74.6% (Tabla 2), con una alta prevalencia para el grupo UP (90%) y una menor prevalencia en los grupos UPH (70%) y NoUP (65%). Se encontró una diferencia significativa al comparar los controles y UP ($p < 0.05$), pero sin significancia cuando se comparó el grupo UPH contra el grupo UP. El diagnóstico de la úlcera asociada a *Helicobacter* se estableció en todos los pacientes basados en histología y PCR (detección del gen *16S RNAr*). La distribución de *H. pylori* por PCR-*16S RNAr* en antro y cuerpo no mostró diferencia estadísticamente significativa, no obstante que 12 de los 67 casos fueron discordantes (chi-cuadrada de McNemar 1.3, $p = 0.25$).

La sensibilidad en la detección de *H. pylori* con los iniciadores Hp1, Hp2 y Hp3 fue de 0.001 ng, que corresponde a 1 genoma, para cagA1-cagA2 fue de 0.01 ng (6 genomas), mientras que para F1-B1 fue de 0.1 ng (55 genomas). Por otro lado, no hubo amplificación de productos de PCR a partir de los DNAs de linfocitos humanos, así como de los DNAs bacterianos probados para evaluar la especificidad del ensayo de PCR para la detección de *H. pylori*, empleando el gen *16S RNAr*. Todas las muestras gástricas fueron positivas para la amplificación del gen β -globina. La detección del gen *cagA* de aislamientos clínicos fue del 90% con los iniciadores cagA1-cagA2 y del 65% para los iniciadores F1-B1. La diferencia en la detección del gen *cagA* de los aislamientos clínicos, usando estos iniciadores fue estadísticamente significativa (chi-cuadrada de McNemar 3.84, $p < 0.05$), razón por la cual sólo se utilizaron estos iniciadores para la detección

del gen *cagA* en las biopsias gástricas. Por otro lado, estos iniciadores (*cagA1-cagA2*) mostraron ser específicos en la detección del gen *cagA*, ya que sólo se obtuvieron productos de amplificación con las cepas Hp 84-183 y Hp 88-23 (cepas *cagA* positivas) y que fueron positivas a la hibridación con la sonda CAG4

Asociación de *Helicobacter pylori* con la úlcera péptica sangrante. La asociación de *H. pylori* con UPH se muestra en la Figura 5, la cual describe la asociación entre la presencia de *H. pylori* (definida por la detección del gen de *16S RNAr* por PCR en las biopsias gástricas) y los tres grupos de estudio. Como previamente se ha demostrado, *H. pylori* presenta una fuerte asociación con la UP. El riesgo relativo, cuando se comparan el grupo de UP con los controles fue de 4.91 (95% IC: 0.68 a 55.51, $X^2= 3.47$, $p=0.06$). Sin embargo, no se observó asociación entre los grupos de UPH y NoUP (RM: 1.27, 95% IC: 0.29 a 5.30, $X^2= 0.14$, $p>0.4$). Más aún, cuando el grupo de UPH se comparó con el grupo de UP, la asociación se tornó "protectora" (RM: 0.26, 95%IC 0.02 a 1.53, $X^2= 2.79$, $p<0.10$), sugiriendo que la prevalencia de *H. pylori* es menor cuando la úlcera sangra.

Detección del gen de *cagA* por PCR-Hibridación en las biopsias gástricas. La prevalencia total del gen *cagA* por PCR-Hibridación en las biopsias gástricas (positivas por *16S RNAr*) con los iniciadores *cagA1-cagA2* fue de 92%. Cuando se analizaron los grupos individualmente, se encontró una prevalencia entre el 90.5% y 94.4% (Tabla 3), sin significancia estadística. Simultáneamente, biopsias gástricas negativas por PCR-*16S RNAr* de los tres grupos, fueron amplificadas con los iniciadores *cagA1-cagA2*, resultando todas las muestras negativas. Topográficamente se encontró una diferencia significativa en la distribución de las biopsias positivas para *cagA* en las diferentes regiones gástricas: esto es (18 pares antro negativo-cuerpo

positivo y 7 pares antro positivo y cuerpo negativo; las restantes 25 biopsias gástricas fueron positivas, concordantes tanto en el antro, como en el cuerpo (chi-cuadrada de McNemar 4.84, $p=0.028$). Por otro lado, la hibridación de cultivos primarios de las biopsias, con la sonda CAG4, mostró la presencia de colonias *cagA* + y *cagA* – en un mismo cultivo (Figura 6).

Scroprevalencia de anticuerpos IgA e IgG. La presencia de anticuerpos IgG contra los antígenos de bacterias completas de *H. pylori* fue determinada en 35 sueros. No se observaron diferencias significativas en los tres grupos estudiados (Tabla 2). Sin embargo, los anticuerpos IgA contra la proteína recombinante de CagA se detectaron con mayor frecuencia en pacientes UP, comparados con los grupos de UPH y NoUP (Tabla 4), con una significancia límite ($p=0.06$). Los anticuerpos IgG contra la ureasa mostraron una mayor frecuencia en el grupo de UPH comparado con el grupo NoUP ($p=0.07$). Los análisis de los anticuerpos de IgA contra ureasa y los anticuerpos IgG contra CagA se muestran en la Tabla 4, observándose que las frecuencias en los tres grupos son muy similares.

Detección del gen *cagA* de las cepas de *H. pylori*. El 67% (38/57) de los DNAs bacterianos fueron positivos a la presencia del gen *cagA* por hibridación con las sondas CAG4 y CAG25-Digoxigenina (Figura 7). Ninguno de los diferentes pares de iniciadores produce algún producto inespecífico con las diferentes cepas bacterianas (*Campylobacter sp* y *Enterobacteriaceae*) usadas como controles. Además, todos los DNAs genómicos (*H. pylori* y controles) hibridaron con la sonda 16S (ver Tabla 5).

Determinación del polimorfismo del gen *cagA*. En la Figura 8, se muestra el esquema de amplificación del gen *cagA* por PCR. De las 38 cepas positivas (Tabla 5) a la presencia del gen

cagA, todas fueron amplificadas con los iniciadores *cagA1-cagA2* y *F1-B1*, excepto cuatro de ellas, que en general presentaron una pobre detección con los siete pares de iniciadores (Tabla 5). Los iniciadores *DRO2-DRO4* fueron los que presentaron menor sensibilidad en la detección del gen *cagA*. Las cepas negativas a la presencia del gen por hibridación mostraron una amplificación positiva, principalmente con los iniciadores *CagA1-CagA2* y *CagA5-CagA2*. Siendo *DRO2-DRO4* los únicos iniciadores que no presentaron amplificación alguna del producto. Cabe mencionar que todos los DNAs hibridaron con la sonda 16S (Tabla 5).

Análisis de los resultados de la amplificación por PCR e hibridación del gen *cagA*. En la Tabla 6, se muestra la sensibilidad y especificidad de los diferentes pares de iniciadores utilizados para la amplificación del gen *cagA*, siendo los iniciadores *F1-B7629* los que presentaron la mejor sensibilidad y especificidad al compararse con los otros iniciadores (sensibilidad 68% y especificidad 84%). Mediante una gráfica ROC se pudieron comparar los diferentes iniciadores con la finalidad de identificar cuál de los pares de iniciadores resultaba mejor para la detección del gen *cagA*. Así, se encontró que los iniciadores *F1-B7629* son mejores que el resto de estos, considerándose intermedios los iniciadores *DRO6-DRO8*, *F1-B1* y *CagA1-CagA2*, y siendo los iniciadores *cagA1-cagA2*, *DRO2-DRO4* y *CagA5-CagA2* poco útiles en la detección del gen *cagA* (Figura 9). Al analizar la detección del gen *cagA* por PCR y los diferentes pares de iniciadores con respecto al cuadro clínico, se encontró una mayor detección del gen en las cepas aisladas de pacientes UP y UPH al compararse con el grupo de NoUP, con los iniciadores *F1-B1* (Figura 10), con una significancia estadística ($p=0.013$). Los iniciadores *F1-B7629* mostraron una mayor detección del gen en las cepas aisladas de pacientes UP comparado con las cepas UPH y NoUP, con una significancia límite ($p=0.057$). Los otros iniciadores no mostraron asociación significativa a cuadro clínico (Figura 10).

Análisis de las secuencias de DNA. El análisis de la secuencia de nucleótidos obtenidas por PCR con los diferentes pares de iniciadores, mostraron principalmente la presencia de cambios de nucleótidos cerca del extremo 3' de los sitios complementarios a los iniciadores en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con UPH y NoUP, resultando en una pérdida de la amplificación de los fragmentos por PCR (Figura 11). Por otro lado, cuatro secuencias de nucleótidos obtenidas del producto de PCR generado con los iniciadores CagA5-CagA2 a partir del DNA de cepas de *H. pylori*, aisladas de pacientes con diferentes cuadros clínicos; UHP (1C1N), UP (46A6N) y NoUP (21aC3 y 48C7), no presentaron homología alguna con el gen *cagA*. Al compararse estas secuencias en el banco de genes utilizando el programa BLASTn, mostraron una homología del 86 al 95% con el gen de la proteína asociada a virulencia (*vapD*) de *H. pylori*.

Por otro lado, el análisis de los demás fragmentos secuenciados del gen *cagA* de *H. pylori* aislado de pacientes UPH, UP y NoUP, presentaron una alta homología con el gen *cagA* (Tabla 7). El resultado de la comparación de 9 secuencias del fragmento de 324 pb, mostró 27 cambios de nucleótidos de 258 nucleótidos, resultando en 16 cambios de aminoácidos; para 7 secuencias del fragmento 400 pb se encontraron 29 cambios de nucleótidos de 348, resultando 18 cambios de aminoácidos; para 7 secuencias del fragmento de 570 pb, fueron 29 cambios nucleótidos de 512, resultando en 9 cambios de aminoácidos y para 10 secuencias del fragmento de 750 pb, fueron 44 cambios de nucleótidos de 682, resultando en 24 cambios de aminoácidos (datos no mostrados). Los valores de sustituciones sinónimas (d_S) y no sinónimas (d_N) de los diferentes fragmentos del gen *cagA* de *H. pylori* fueron similares en todos estos, en donde d_S es mayor que d_N (Tabla 7). Sin embargo, el segmento de 400 pb muestra una alta relación d_N/d_S . Cuando se analizaron las d_N y d_S en este fragmento, se observó la presencia de dos regiones (Gráfica 1). La región A es en donde sólo se presentan sustituciones de tipo no sinónimo. En la región B hay una alta proporción de

sustituciones de tipo sinónimo. Se encontró que el fragmento de 570 pb es un fragmento muy conservado.

Con la finalidad de comparar el fragmento de 243 pb del gen *cagA* de 15 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos, se emplearon 24 secuencias de nucleótidos reportadas en el banco de genes por van der Ender y cols. En 1998, de este mismo fragmento del gen *cagA* de cepas de *H. pylori*, aisladas de pacientes holandeses y chinos. El resultado de la comparación de las 39 secuencias en total, mostró que 32 de éstas son polimórficas, con cambios de nucleótidos en 75 posibles posiciones (Figura 12). Del número total de 75 sustituciones de nucleótidos, 28 resultaron en cambios de aminoácidos (Figura 13). Los valores de sustituciones sinónimas (d_S) y no sinónimas (d_N) en los aislados de *H. pylori* de pacientes mexicanos fueron ligeramente más bajos a los aislados de *H. pylori* de pacientes holandeses y chinos (Tabla 8). La relación de proporciones d_N/d_S de los aislados holandeses fue aproximadamente el doble al de las cepas mexicanas y chinas. Cuando se analizaron las d_N y d_S en este fragmento en las tres poblaciones, se observó una alta proporción de sustituciones de tipo sinónimo (Gráfica 2).

Más aún, el análisis filogenético de las 39 secuencias del fragmento de 243 pb mostró dos grandes grupos: el grupo I está constituido por todas las cepas de *H. pylori* de los pacientes mexicanos y holandeses; y en el grupo II, todas las cepas de *H. pylori* chinas (Figura 14). Cabe mencionar que no existió una distribución de las cepas mexicanas dentro de un clado o grupo determinado dentro del árbol filogenético, así mismo, no se agruparon de acuerdo al cuadro clínico presentado. El análisis por bootstrap (1,000 replicas) mostró una alta confiabilidad en las diferencias entre ambos grupos. Las secuencias del fragmento de 243 pb del gen *cagA* de las cepas del grupo I, demostraron una divergencia del 3.1% a nivel de nucleótidos y del 4.5% a

nivel de aminoácidos. En el grupo II la divergencia fue del 6.5 y 4.5% a nivel de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente (Tabla 9).

El análisis de la secuencia completa de nucleótidos del gen *cagA* de *H. pylori*, aislado de un paciente úlcero péptico hemorrágico, mostró una secuencia de 3,522 pb que codifica para una proteína de 1,174 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 130,609 Da. La identidad de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos fue calculada al compararse con las secuencias reportadas del banco de genes (NCTC 11638, Hp15818, NCTC 11637, F32, Hp J99, ATCC 43526, Hp 26695 y ATCC 53726), encontrándose una homología en identidad del 85 al 94% y del 78 al 93% a nivel de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente.

Al analizarse la región variable 3' de la secuencia completa del gen *cagA*, de acuerdo a la clasificación de Yamaoka, se encontró un patrón de repeticiones R1-R2-R1-R3-R1 la cual pertenece al tipo A de estructura primaria (Figura 16). Además, se analizaron los posibles sitios de fosforilación de tirosina en la proteína CagA, observándose la presencia de dos de tres sitios de fosforilación de tirosina: los sitios que se conservan están en las posiciones 122 y 899 de la secuencia de aminoácidos, habiéndose perdido el sitio de fosforilación 1029 (Figura 16), al haber un cambio de tirosina (Y) por histidina (H).

TABLA 2. Características demográficas y prevalencia de *Helicobacter pylori* por diferentes métodos en los tres grupos de sujetos estudiados.

Características de los pacientes	UP n=17	NoUP n=20	UPH n=30	valor de p
Promedio de edad, años (+/- DE)	48.9 (14.3)	56.5 (16.1)	60.5 (14.4)	0.05*
Sexo (M / F)	5 / 12	13 / 7	20 / 10	NS
Tabaquismo (%)	5 (29)	9 (45)	18 (60)	NS
AINES n (%)	3 (18)	4 (20)	8 (27)	NS
No. (%) positivos para <i>H. pylori</i> determinado por:				
Histología	12 (70)	17 (85)	20 (67)	
Cultivo	1 (6)	4 (20)	6 (20)	
PCR-16S RNAr	11 (65)	18 (90)	21 (70)	
IgG-ABC	6/7 (85.7)	11/12 (91.6)	14/16 (87.75)	

Abreviaciones: UP = Úlcero pépticos no sangrantes, NoUP = No úlcero péptico. UPH = Úlcero pépticos hemorrágicos. NS = Sin significancia estadística * ANOVA test, M = Masculinos, F = Femenino, AINES = anti-inflamatorios no esteroideos. PCR-16S RNAr = Amplificación del gen 16S RNA ribosomal por PCR. IgG = Inmunoglobulina G. ABC = Antígenos de bacterias completas. IgG se determinó por ELISA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

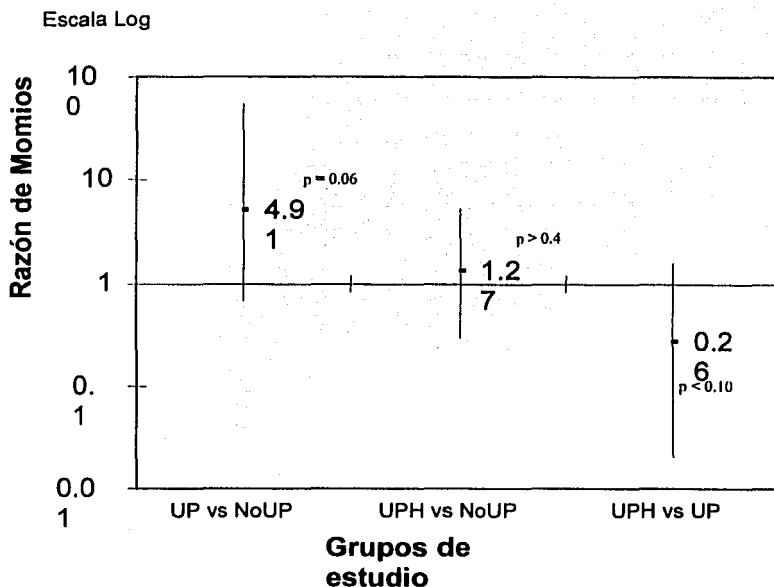


FIGURA 5. Asociación de *Helicobacter pylori* con la úlcera péptica sangrante. La presencia de *H. pylori* fue determinada en biopsias gástricas por PCR-16S RNAr en pacientes con úlcera péptica (PU), úlcera péptica hemorrágica (UPH) y en pacientes asintomáticos (NoUP).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 3. Detección del gen *cagA* por PCR en las biopsias positivas por PCR-16S RNAr a *H. pylori*.

BIOPSIAS <i>H. pylori</i> POSITIVAS	NoUP n = 11 (%)	UP n = 18 (%)	UPH n = 21 (%)
PCR- HIBRIDACIÓN <i>cagA</i>	10 (90.9)	17 (94.4)	19 (90.5)

TABLA 4. Anticuerpos IgG e IgA contra las proteínas recombinantes de CagA y ureasa de *Helicobacter pylori* por ELISA.

Detección de anticuerpos	NoUP n = 7 n (%)	UP n = 12 n (%)	UPH n = 17 n (%)	Valor de p *
IgA-CagA	4 (57.1)	10 (83.3)	8 (47)	0.06
IgG-CagA	5 (71.4)	9 (75)	12 (70.6)	ns
IgA-Ureasa	3 (42.8)	8 (66.6)	13 (76.4)	ns
IgG-Ureasa	1 (14.3) ^o	6 (50)	11 (64.7) ^o	0.07

Abreviaciones: IgG = Inmunoglobulina G. IgA = Inmunoglobulina A. CagA= proteína asociada a la citotoxina. NoUP = No úlceros pépticos. UP = Úlcera péptica no sangrante. UPH = Úlcera péptica hemorrágica. * ANOVA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

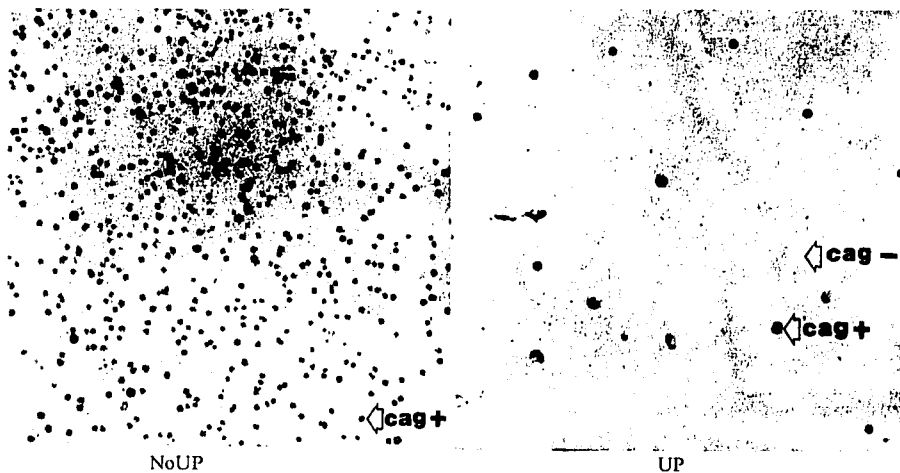


FIGURA 6. Hibridación de colonias de cultivo primario de *H. pylori* con la sonda CAG4. NoUP = No úlcera péptica, UP = Úlcera péptica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

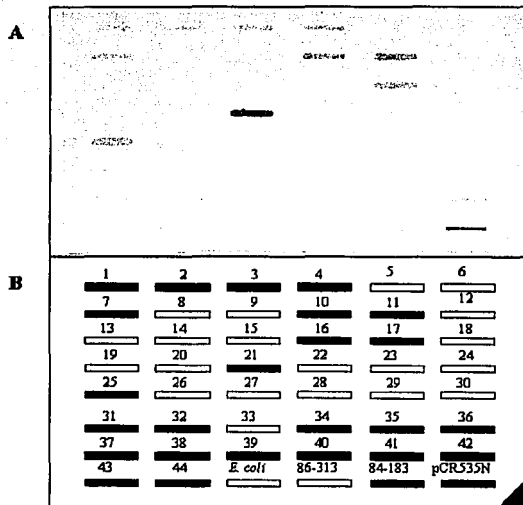


FIGURA 7. Detección del gen *cagA* por dot blot-hibridación. (A) Hibridación de DNA genómico de 44 aislados clínicos de *H. pylori* y cuatro cepas control (*H. pylori* 86-313 y *E. coli* DH5 α , como controles negativos; *H. pylori* 84-183 y pCR535N, como controles positivos) con la sonda CAG4-Digoxigenina. (B) Representación esquemática del resultado de hibridación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

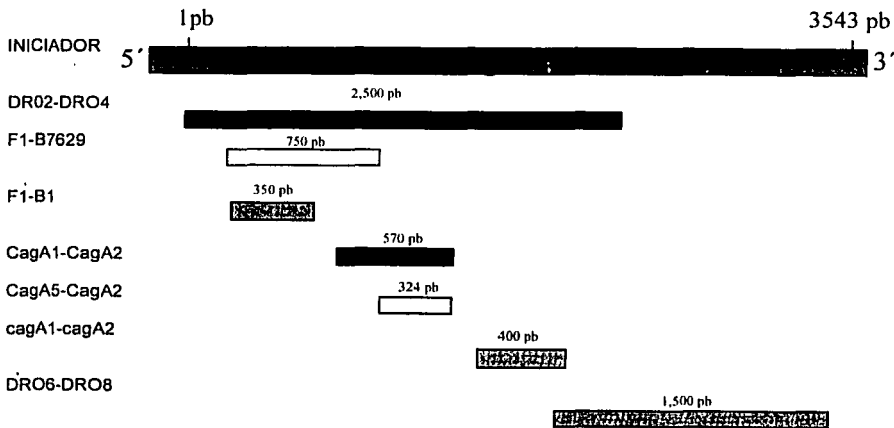


FIGURA 8. Representación esquemática de la amplificación del gen *cagA* de *H. pylori* por PCR usando diferentes pares de iniciadores.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 6. Detección del gen *cagA* por PCR usando diferentes pares de iniciadores. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la amplificación, usando como estándar de oro la hibridación con la sonda CAG4.

Iniciadores	Sensibilidad % (n+ /38)	Especificidad % (n- /19)
DRO2-DRO4	18 (7)	100 (19)
F1-B7629	68 (26)	84 (16)
F1-B1	81 (31)	68 (13)
CagA1-CagA2	55 (21)	95 (18)
CagA5-CagA2	58 (22)	68 (13)
cagA1-cagA2	89 (34)	26 (5)
DRO6-DRO8	55 (21)	84 (16)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

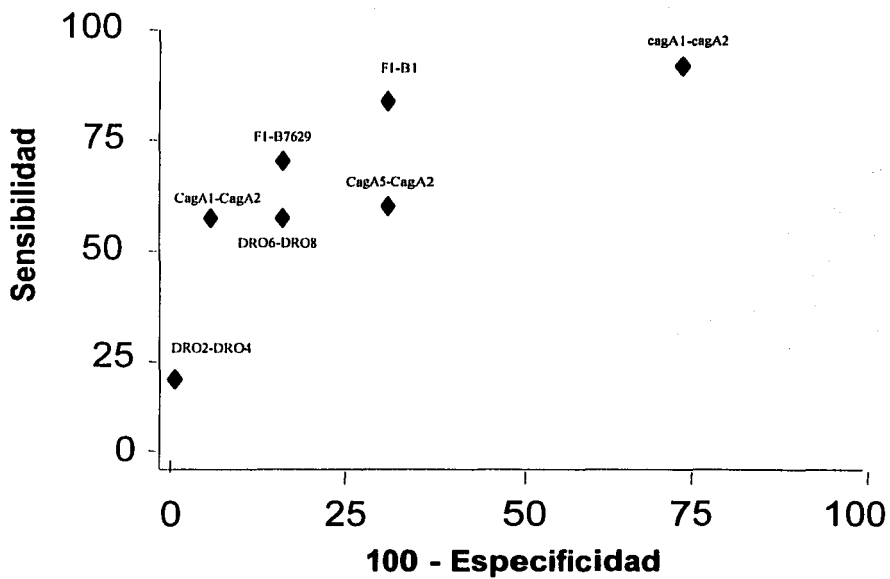


FIGURA 9. Análisis de la sensibilidad y especificidad de cada par de iniciadores utilizando la curva ROC (Receiver Operating Characteristic).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

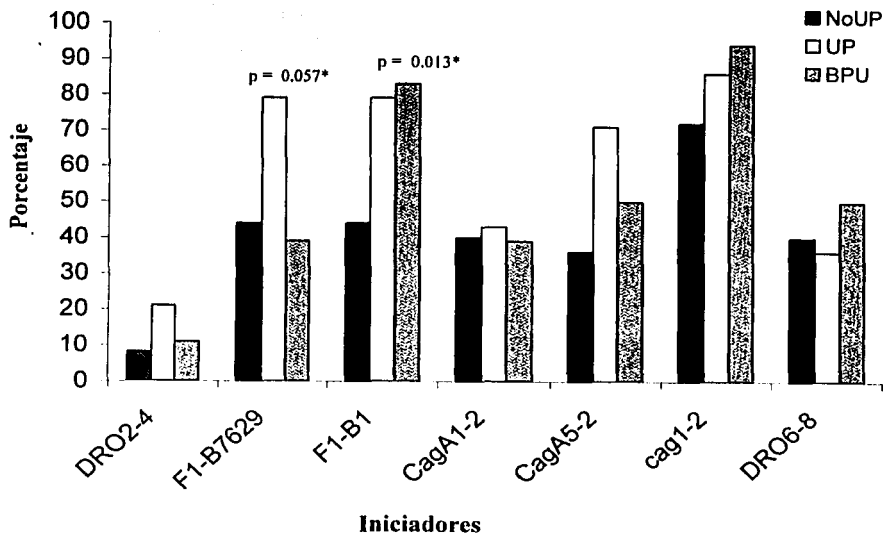


FIGURA 10. Asociación en la detección del gen *cagA* por PCR con siete pares de iniciadores y cuadro clínico. NoUP = No úlcero pépticos. UP = Úlcera péptica no sangrante. UPH =Úlcera péptica hemorrágica. * Prueba exacta de Fisher-Freeman-Halton.

TEXIS CON
FALTA DE ORIGEN

A

Cepa

53C-5N (UPH) AAGAACGATAGGGATAACAGGCAAGCTTTTAATGGAATCTCGCAATTAAGGGAAGAAT

5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG-3'

Iniciador F1

B

Cepa

48A-7 (NoUP) TTCATTATTGTATGCGGGCAATGGTGGTTTTGGAGACAAACACGATTGGAACGCCACC

48A-10 (NoUP) TTCATTATTGTATGCGGGCAATGGTGGTTTTGGAGACAAACACGATTGGAACGCCACC

92-3 (NoUP) TTCATTATTGTATGCGGGCAATGGTGGTTTTGGAGCCAAACACGATTGGAACGCCACC

53C-5N (UPI) TTCATTATTGTATGCGGGCAATGGTGGTTTTGGAGCCAAGCACGATTGGAACGCCACC

5'-GGCAATGGTGGCTCTGGAGCTAGGC-3'

Iniciador CagA5

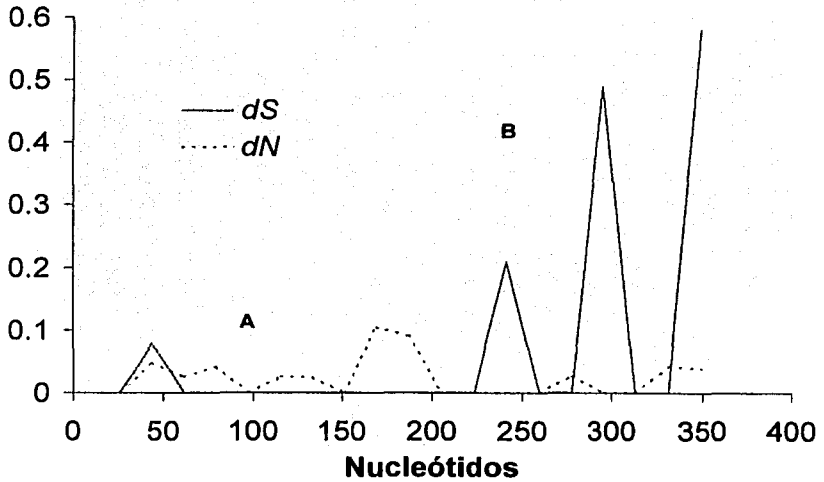
FIGURA 11. Análisis de las secuencias del gen *cagA* de *Helicobacter pylori* aislado de pacientes mexicanos. Secuencia parcial de la región correspondiente al sitio complementario de los iniciadores (Subrayado) F1-B1 (A) y CagA1-CagA2 (B). En negrillas se muestra los cambios de nucleótidos en las secuencias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 7. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los productos de PCR del gen *cagA*.

Producto Amplificado (pb)	Cepa	Homología (%)	Proporción de sustituciones		d_S/d_N
			d_S	d_N	
324 pb	53C5N, 319A ₁ 4, 46A1, 46A7N, 21A5N, 52A10, 52A1, 60A2, 62A1.	95.49 – 99.18	0.070 ± 0.023	0.023 ± 0.006	3
400 pb	53C5N, 319A ₁ 1, 60A7, 59A1, 46A1, 1C2N, 1C1N.	95.11 – 95.69	0.053 ± 0.019	0.031 ± 0.007	1.7
570 pb	53C5N, 48A7, 48A10, 92-3, 33Ca1N, 236A6, 60A9.	96.68 – 98.24	0.086 ± 0.021	0.008 ± 0.003	10
750 pb	53C5N, 59A1, 1C2N, 62A1 319A ₁ 1, 236A7, 236A6, 52A10, 46A7N, 46A1.	97.31 – 99.10	0.055 ± 0.012	0.018 ± 0.004	3

d_S = sustituciones sinónimas, d_N = sustituciones no sinónimas, d_S/d_N = Proporción de sustituciones sinónimas y no sinónimas



GRÁFICA 1. Comparación de las sustituciones sinónimas (d_S) y sustituciones no sinónimas (d_N) en el fragmento de 400 pb del gen *cagA*. A: región con sustituciones no sinónimas. B: Región con sustituciones sinónimas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

	POSICIÓN																															
	1	112	222	233	344	445	555	566	677	788	899	900	000	112	233	334	445	555	666	788	891	111	222	222	222	222	222	222	222			
	793	480	456	705	602	590	157	806	925	648	934	604	568	473	601	584	790	159	029	937	921	269	456	891	212							
CEPAS																													Homología			
Mexicana 53C5N	TTG	AAA	TAA	CTC	TAA	TGT	GAG	AAC	TGG	GAG	GAA	AAA	CAC	TTC	CGA	CAG	CCA	CGA	TAG	TCA	ATC	ACT	AAT	AGC	AGA							99.18
Mexicana 21A5NC	95.90	
Mexicana 236A6	95.49	
Mexicana 319A14	96.31	
Mexicana 33CA1N	96.31	
Mexicana 46A1	97.13	
Mexicana 46A7N	96.31	
Mexicana 48A7	96.31	
Mexicana 48A10	98.36	
Mexicana 52A1	97.54	
Mexicana 52A10	97.95	
Mexicana 60A2	97.95	
Mexicana 60A9	97.95	
Mexicana 62A1	97.95	
Mexicana 923	97.95	
Holandesa 107	97.13	
Holandesa 137	96.72	
Holandesa 161A	96.31	
Holandesa 161L	96.31	
Holandesa 239	96.31	
Holandesa 25	97.13	
Holandesa 27	97.54	
Holandesa 79	98.36	
Holandesa 419	97.95	
Holandesa 292	97.54	
Holandesa 79A	C.	93.85	
Holandesa 79J	C.	93.85	
Holandesa 392	..A	..C	91.80	
Holandesa 406	..A	..CG	90.98	
China F47	..A	..C	87.70	
China R13	..CA	84.02	
China R27	..A	..G	..C	..G	..T	..CCC	..CT	..TT	..GA	..AGA	..A	..T	..A	..T	..CC	..T	..T	..A	..TTG	..AAG	..G	..A	..G	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	84.43	
China R29	..A	..A	..G	..C	..G	..T	..CCC	..C	..CT	..T	..GA	..AGA	..A	..T	..A	..CC	..T	..A	..TTG	..AAG	..G	..A	..G	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	84.84	
China R30	..A	..G	..C	..G	..T	..CCC	..CT	..TT	..GA	..AGA	..A	..T	..A	..T	..CC	..T	..T	..A	..TTG	..AAG	..G	..A	..G	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	84.43	
China R40	..A	..G	..C	..G	..T	..CCC	..C	..ACT	..T	..CGA	..AGA	..A	..T	..A	..CC	..T	..T	..A	..TG	..AA	..AG	..A	..G	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	85.25	
China R48	..A	..A	..C	..C	..CCC	..C	..CT	..CT	..GA	..AGA	..A	..T	..A	..CC	..T	..T	..A	..TG	..AA	..AG	..A	..G	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	87.30	
China R49	..A	..A	..C	..G	..T	..CCC	..C	..CT	..T	..CGA	..AGA	..AGG	..T	..A	..CC	..T	..T	..A	..TTG	..AA	..AG	..A	..G	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	84.84	
China R47	..A	..C	..G	..T	..CCC	..C	..CT	..TT	..GA	..AGA	..A	..T	..A	..CC	..T	..T	..A	..TG	..AA	..AG	..A	..G	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	84.84	
China R59	..A	..C	..G	..T	..CCC	..C	..CT	..T	..GA	..AGA	..A	..T	..A	..CC	..T	..T	..A	..TTG	..AAG	..G	..A	..G	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	86.48	

FIGURA 11. Sitios polimórficos en el fragmento de 243 pb del gen *cagA* de *Helicobacter pylori* de pacientes Mexicanos, comparadas con cepas aisladas de pacientes Holandeses y Chinos. (Posicion 1537 a 1780, acorde a Covacci y cols.).

CEPAS

SECUENCIA DE AMINOACIDOS

Mexicana 53C5N	VG YK D Q Q G N N	V A T I I N V H M K	N G S G L V I A G G	E K G I N N P S F Y	L Y K E D Q L T G S	Q R A L S Q E E I L	N K I D F M E F L A	Q N N A K L D N L S	E
Mexicana 21A5NP.....R.....V.....
Mexicana 236A6
Mexicana 319A14D.....L.....I.....V.....L.....Q.....
Mexicana 33CA1NR.....V.....
Mexicana 46A1G.....G.....V.....
Mexicana 46A7NV.....I.....V.....
Mexicana 48A10R.....
Mexicana 48A7R.....
Mexicana 52A1R.....
Mexicana 52A10R.....Y.....
Mexicana 60A2R.....
Mexicana 60A9R.....
Mexicana 62A1R.....
Mexicana 923R.....
Holandesa 107R.....M.....
Holandesa 137R.....V.....
Holandesa 161AL.....K.....R.....
Holandesa 161LL.....K.....R.....
Holandesa 239A.....D.....Q.....V.....
Holandesa 25R.....V.....
Holandesa 27R.....
Holandesa 79R.....
Holandesa 419R.....
Holandesa 292R.....
Holandesa 79AH.....L.....M.....Q.....V.....K.....
Holandesa 79JH.....L.....M.....Q.....V.....K.....
Holandesa 392N.....L.....V.....L.....K.....Q.....K.....
Holandesa 406N.....D.....L.....V.....L.....K.....Q.....V.....
China F47N.....L.....A.....L.....N.....N.....N.....K.....Q.....L.....K.....M.....Q.....V.....K.....
China R13N.....L.....A.....L.....N.....N.....D.....K.....T.....L.....K.....M.....Q.....V.....K.....
China R27N.....S.....L.....L.....N.....I.....N.....N.....K.....L.....K.....M.....Q.....V.....K.....
China R29N.....S.....L.....A.....L.....N.....I.....N.....N.....K.....L.....K.....M.....Q.....V.....R.....
China R30N.....S.....L.....L.....N.....I.....N.....N.....K.....L.....K.....M.....Q.....V.....K.....
China R40N.....S.....L.....A.....L.....N.....I.....N.....N.....K.....L.....K.....M.....Q.....V.....K.....
China R48N.....L.....A.....L.....H.....I.....N.....N.....K.....L.....K.....M.....Q.....V.....
China R49N.....S.....L.....A.....L.....N.....I.....N.....D.....K.....L.....K.....M.....Q.....V.....R.....
China R47S.....L.....A.....L.....N.....I.....N.....N.....K.....L.....K.....M.....Q.....V.....R.....D.....
China R59N.....S.....L.....A.....L.....N.....I.....N.....N.....K.....L.....K.....M.....Q.....V.....

FIGURA 12. Posibles sustituciones de aminoácidos en el fragmento de 243 pb del gen *cagA* de *H. pylori*.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

TABLA 8. Proporción de sustituciones sinónimas y no sinónimas por sitio del fragmento de 243 pb del gen *cagA* de *H. pylori*.

Población	Aislamientos (n)	Proporción de sustituciones (Media ± EE)		d_N/d_S
		d_S	d_N	
Mexicanos	15	0.091 ± 0.027	0.013 ± 0.004	0.14
Holandeses	14	0.102 ± 0.032	0.027 ± 0.007	0.26
Chinas	10	0.158 ± 0.042	0.025 ± 0.007	0.15

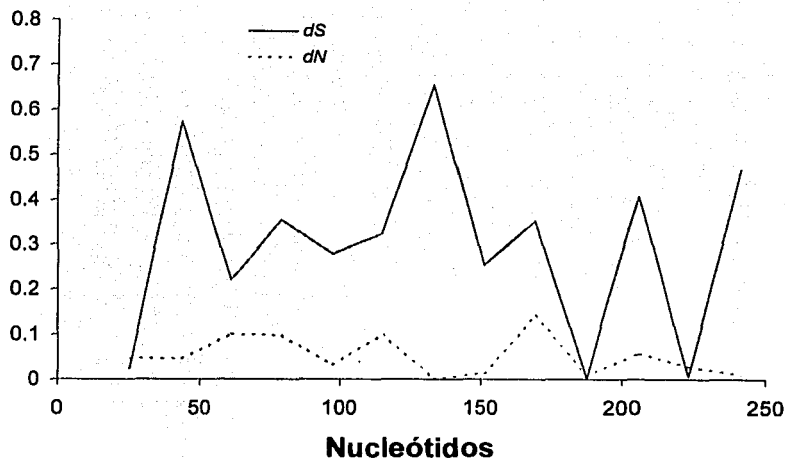
d_S - sustituciones sinónimas, d_N - sustituciones no sinónimas, d_N/d_S - Proporción de sustituciones no sinónimas y sinónimas. EE = Error estándar.

TABLA 9. Diversidad de las secuencias del fragmento de 243 pb del gen *cagA* de *H. pylori*.

Origen de los aislados	Aislamientos (n)	% de diferencias (Media ± DE)	
		Nucleótidos	aminoácidos
Grupo I	29	3.1 ± 1.2	4.5 ± 0.9
Grupo II	10	6.5 ± 2.3	4.5 ± 1.3
Grupos I y II	39	3.1 ± 0.9	8.3 ± 1.5

DE = Desviación estándar.

TESIS CON
FUELLA DE ORIGEN



GRÁFICA 2. Comparación global de las sustituciones sinónimas (d_S) y sustituciones no sinónimas (d_N) en el fragmento de 243 pb del gen *cagA* de 39 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos, holandeses y chinos.

GENES CON
ETIQUETA DE ORIGEN

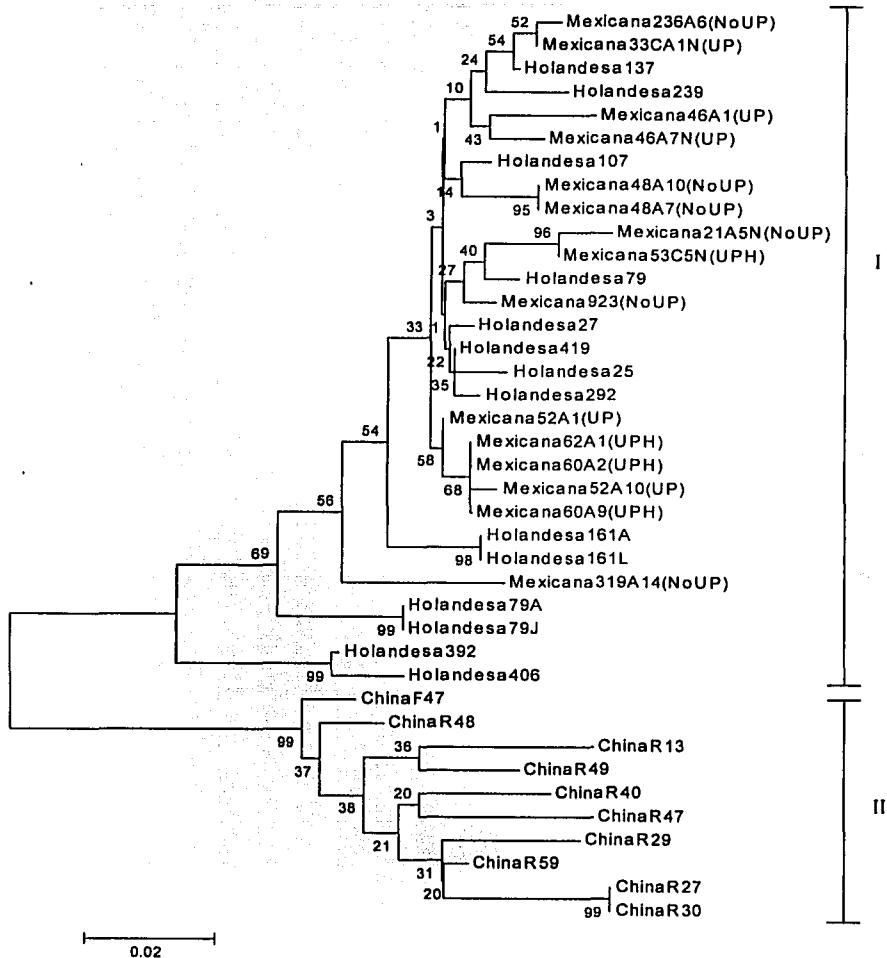
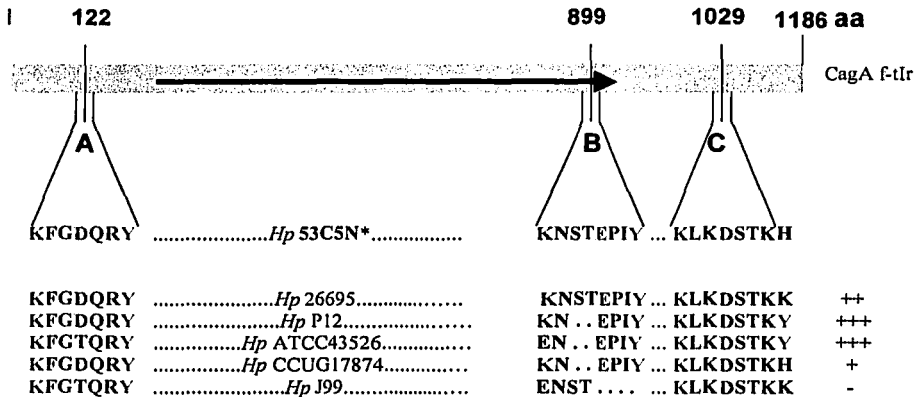


FIGURA 14. Análisis filogenético del fragmento de 243 pb del gen *cagA* de 39 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos, holandeses y chinos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Secuencia consenso: [RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y

FIGURA 16. Sitios putativos de fosforilación de tirosina en la proteína CagA de *H. pylori*. * Cepa aislada de un paciente con úlcera péptica hemorrágica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

H. pylori es un agente patógeno importante en el desarrollo de la úlcera péptica y cuando es erradicado, la recurrencia de la UP disminuye notablemente. Más del 90% de las úlceras duodenales son asociadas a la infección por *H. pylori*¹³⁷. El sangrado es la complicación más común de la UP, siendo una causa de hospitalización de emergencia. La tasa de mortalidad por úlceras sangrantes ha permanecido sin cambio durante las últimas décadas, en promedio se calcula entre el 6% y el 10% durante los últimos 30 años¹³⁸, aún cuando la endoscopia terapéutica mejora la evaluación de otros parámetros, por ej. la necesidad de transfusión o de cirugía¹³⁹.

La prevalencia de *H. pylori* en las úlceras pépticas sangrantes se ha descrito que es baja, comparada con las úlceras pépticas no sangrantes. Sin embargo, parece ser que la erradicación de *H. pylori* virtualmente previene el resangrado de las úlceras pépticas en la mayoría de los casos, donde el sangrado ha sido endoscópicamente controlado¹¹⁷, aunque la función de *H. pylori* no ha sido completamente definida como un contribuyente importante para que la úlcera sangre. La baja prevalencia de *H. pylori* ha sido atribuida a una subestimación, debida a los resultados falsos negativos obtenidos con la prueba rápida de la ureasa por la presencia de sangre¹²⁰.

En este estudio, la seroprevalencia de *H. pylori* medida por anticuerpos fue cercana al 90% en la población, como previamente ha sido reportada para los países en desarrollo^{2, 18}. Sin embargo, se observó una distribución diferencial (Tabla 2) de la infección activa en los grupos (UPH, UP y NoUP). El grupo UP mostró la mayor prevalencia de *H. pylori* (90%) detectado por la amplificación del gen *16S RNAr* por PCR, comparado con la prevalencia de los grupos de

NoUP y UPH, en los cuales la presencia del microorganismo fue del 65 y 70%, respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos en el análisis histopatológico con el uso de las tinciones de Hematoxilina-Eosina y Giemsa, con una sensibilidad del 10 al 15% menor a la amplificación del gen *16S RNAr* por PCR. La baja prevalencia de *H. pylori* encontrada para el grupo UPH es aún cuestionable.

La prueba rápida de ureasa (CLOtest) presenta una pobre sensibilidad particularmente en el grupo de UPH con sólo el 37% de positivos. Esto es consistente con estudios previos, y se debe posiblemente a la presencia de sangre, la cual puede ser causa de los resultados falsos negativos ^{120, 121}. Por otro lado, resultados falsos negativos pueden ocurrir cuando *H. pylori* está presente en cantidades pequeñas en la muestra de biopsia gástrica; es entonces cuando la amplificación por PCR puede ser el método adecuado para la detección del microorganismo a partir de la misma ¹⁴⁰. Debido a esto el CLOtest no fue considerado un método adecuado para la detección de *H. pylori* en el presente estudio.

La baja recuperación de *H. pylori* en el cultivo microbiológico puede ser explicada en parte debido al empleo del medio Stuart's y al tiempo transcurrido entre la toma de la biopsia gástrica y el procesamiento de la misma. Sin embargo, Roosendaal y cols. ¹⁴¹ han sugerido que la composición del medio de transporte no es crítica para la supervivencia de *H. pylori* en la biopsia gástrica, con una viabilidad de hasta 24 horas. Otra explicación para la baja recuperación de *H. pylori* en cultivo puede ser el uso de una sola muestra por cada sitio, ya que es bien conocido que la colonización de *H. pylori* en la mucosa gástrica ocurre en parches, por lo que el uso de una muestra incrementa la posibilidad de error de muestreo, especialmente en biopsias con una densidad bacteriana baja. Recientemente, van Doorn y cols. en 2000 ¹⁴², reportó que cepas de *H.*

pylori con los genotipos s1, m1, *iceA1* o *cagA* positivo (consideradas cepas virulentas) presentan una baja densidad bacteriana y por lo tanto son difíciles de detectar por CLOtest y cultivo microbiológico. Contrariamente, las cepas con los genotipos s2, m2, *iceA2* o *cagA* negativo están presentes en alta densidad y raramente producen falsos negativos, indicando que estas diferencias con los diferentes genotipos de *H. pylori* pueden tener implicaciones importantes en la detección del microorganismo.

Diversos estudios han sugerido que existe un pobre valor diagnóstico basado únicamente en una prueba para la detección de *H. pylori*, incluso bajo circunstancias de ausencia de sangrado. Por lo que la recomendación de algunos autores es la de usar al menos dos pruebas para determinar la infección *H. pylori* ^{143, 144}. Sin embargo, es reconocido que la amplificación de fragmentos de DNA por PCR de biopsias gástricas muestra una alta sensibilidad y especificidad, como lo muestran diversos estudios ^{129, 145}, por lo que en el presente estudio se analizaron los iniciadores por BLASTn, en donde se observó que había una homología parcial con secuencias de DNA humano. Sin embargo, no hubo productos de amplificación con los DNAs de linfocitos humanos usando los iniciadores descritos por Sheng-Ang ¹²⁷, mostrando que estos son específicos para la detección de *H. pylori*, por lo que en el presente estudio la amplificación por PCR usando el gen *16S RNAr* fue considerada como el estándar de oro.

Nuestros hallazgos (Tabla 2) son coincidentes con los reportados por Lee y cols. en 2000 ¹²⁰, quienes encontraron una prevalencia de *H. pylori* muy similar, cuando emplearon en combinación la histopatología y el cultivo microbiológico, encontrando una prevalencia del 54.5% para UPH y del 73% para UP. Más aún, Malfertheiner y cols. en 1997 ¹⁴⁶ reportó que la UP presenta diferentes patrones clínicos dependiendo de su asociación con *H. pylori*, siendo

mayor la probabilidad de sangrado en los pacientes sin infección por *H. pylori*. Además, Tagaris y cols. en 1995 ¹¹⁹ reportaron la evidencia también encontrada por nosotros, del papel protector de *H. pylori* en el sangrado de la úlcera péptica, cuando comparó la infección por *H. pylori* y la severidad del sangrado de tracto gastrointestinal alto. A diferencia de nuestro estudio, la metodología que ellos emplearon fue la histología y la prueba rápida de ureasa (CLOtest). El riesgo relativo asociado a la prevalencia de *H. pylori* calculado para ese mismo estudio fue de 0,11, los pacientes *H. pylori* negativos tuvieron una hemorragia más severa al compararlos con los pacientes *H. pylori* positivos. Resultados similares fueron obtenidos por Cullen y cols. en 1997 ¹⁴⁷. En un reporte preliminar de Shilling y col. ¹⁴⁸ también mostraron que *H. pylori* no se asociaba al sangrado de la úlcera por tensión nerviosa.

El papel de otros factores que contribuyen al sangrado de la UP, tales como la edad y la ingesta de AINES, ha sido claramente demostrado en la historia natural de esta enfermedad. En el 2000 Weil y cols. ¹⁴⁹, en un estudio realizado en Inglaterra y el país de Gales, encontraron que pacientes de 60 años o mayores con ingesta de AINES son una población con un mayor riesgo de padecer sangrado de la úlcera. En nuestro estudio (Tabla 2), la edad fue ciertamente un factor de riesgo importante para el sangrado de la úlcera, así como, la ingesta ocasional de AINES en algunos de los pacientes estudiados podría estar participando en el sangrado de la úlcera. Sin embargo, la ingesta de AINES en los tres grupos estudiados (UPH, NoUP y UP) fue muy similar (18 a 27%) y al compararse no fueron estadísticamente significativos, aunque la detección de ingesta de AINES no se comprobó en orina, ni se realizó el ensayo de agregación plaquetaria para cerciorarse de su ingesta real de AINES.

Este estudio, aunque limitado por el número de pacientes incluidos en cada grupo, tiene

suficientes sujetos para identificar como significativa la asociación de *H. pylori* y el gen *cagA* con el grupo UP, no así con el grupo UPH (Figura 5). Dado que el límite superior del intervalo para la asociación de *H. pylori* va de 5.2 (crudo) a 7.1 (ajustado), no podemos excluir una asociación. Sin embargo, la magnitud de las razones de momios estimadas podría, a lo sumo, mostrar una asociación de débil a moderada, completamente distinta a la que relaciona a *H. pylori* con la úlcera péptica, la cual usualmente va más allá de 13 para el riesgo relativo^{150, 151}. Así, los hallazgos en este estudio mostraron claramente que el sangrado de la UP no se asocia con la infección de *H. pylori*.

Durante la última década se han realizado un gran número de estudios con la finalidad de encontrar factores bacterianos en *H. pylori* que ayuden a explicar porqué justamente una pequeña proporción de individuos desarrolla gastritis, úlcera péptica, adenocarcinoma y linfoma gástrico entre la vasta población de sujetos infectados con el microorganismo. En estudios realizados sobre la detección del gen *vacA* y de su producto, la citotoxina vacuolizante, así como también, en la detección de la presencia de la isla de patogenicidad *cag* y del gen asociado a la citotoxina (*cagA*) en las cepas de *H. pylori*, las han asociado al desarrollo de UP, gastritis atrófica y cáncer gástrico; mientras que las cepas que carecen de estos factores de virulencia no se les ha descrito asociación alguna^{152, 153}. Por lo cual, el gen *cagA* ha sido convencionalmente usado como un marcador de cepas patogénicas. En el presente estudio, la prevalencia del gen *cagA* en sujetos *H. pylori* positivos fue analizado con respecto al grupo de enfermedad donde fueron incluidos, con el fin de identificar su posible contribución a la complicación de la úlcera péptica y en el cual no se encontraron diferencias en los grupos de UPH y UP (Tabla 3), en cuanto a la presencia del gen *cagA* (91% y 94% respectivamente), como se ha reportado en estudios previos¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Sin embargo, la prevalencia de *H. pylori cagA* positivo en UP permaneció significativa cuando fue

comparada con el grupo UPH. La alta prevalencia del gen *cagA* en los tres grupos estudiados sugiere que éste no puede ser utilizado como un marcador predictivo en los aislados clínicos de *H. pylori* en México, para identificar una cepa en particular como productora de gastritis o úlcera. Por otro lado, en nuestro estudio encontramos que *H. pylori cagA* positivo fue hallado predominantemente en cuerpo, aunque, Atherton y cols. en 1996 ¹⁵⁴, estudiando pacientes dis pépticos no encontraron diferencias significativas en la distribución de *H. pylori cagA* positivo en las biopsias de antro o cuerpo.

Un hallazgo interesante en el presente estudio fue la presencia de colonias de *H. pylori cagA* positivas y negativas en un mismo cultivo primario (Figura 6). Sin embargo, parece ser que no es un evento raro, ya que van der Ender y cols. ¹⁵⁵ y Figura y cols. ¹⁵⁶ encontraron que aproximadamente dos tercios de los pacientes que estudiaron con UP y dispepsia no ulcerosa, respectivamente, presentan colonias tanto *cagA* positivas como negativas en los cultivos primarios. Una posible explicación de la presencia de cepas *cagA* positivas y negativas en los cultivos primarios es la inestabilidad de la PAI-*cag*, más que la infección con múltiples cepas. La pérdida de *cag* puede ser debida a una señal inductiva o una fuerza selectiva que contribuye a la readaptación del microorganismo en los diferentes estadios de la infección y esto tal vez explique la persistencia crónica del microorganismo en la mucosa gástrica ¹⁵⁷. Recientemente, van Doorn y cols. en el 2000 ¹⁵⁸, en un estudio hecho en Holanda con pacientes con UP y dispepsia funcional, han sugerido que las cepas de *H. pylori cagA* negativas tienen una gran implicación desde el punto de vista terapéutico, ya que éstas son más resistentes a la terapia antimicrobiana usada para la erradicación del microorganismo.

En cuanto a la presencia de anticuerpos séricos contra los diferentes antígenos de *H.*

pylori estudiados, se encontró una más alta prevalencia de IgA contra el antígeno de CagA en el grupo UP (Tabla 4). Los resultados de los anticuerpos contra ureasa, principalmente del isotipo IgG presentaron una distribución diferencial, con menor prevalencia en el grupo NoUP y una más alta prevalencia en el grupo UPH. Anticuerpos IgG contra la ureasa podrían tener un potencial uso diferencial en el diagnóstico de pacientes ulcero pépticos sangrantes o no sangrantes, de otras patologías. Mientras tanto, anticuerpos IgA contra la proteína CagA podrían ser usados para diferenciar pacientes UP de pacientes NoUP y UPH (Tabla 4).

La diferencia encontrada en la detección del gen *cagA* con los iniciadores *cagA1-cagA2* y F1-B1 en las cepas de *H. pylori*, aisladas de pacientes mexicanos nos hizo pensar que posiblemente pudiera existir variación alélica en el gen *cagA* como ha sido reportado por Miehle y cols.¹⁰⁸, ellos compararon 60 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes coreanos con UP y cáncer gástrico, contra 41 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con UP y gastritis en Houston, encontrando diferencias en la detección del gen *cagA* al amplificar un fragmento de 1.4 kb (1.7% para las cepas coreanas y 88% para las de Houston), comparado con la amplificación de un fragmento de 297 pb (98% para las Coreanas y 88% para las de Houston). Resultados similares fueron observados por Pan y cols.¹⁰⁹ al amplificar un fragmento de 570 pb del gen *cagA* de cepas chinas y holandesas (52% para las cepas chinas y 95% para las holandesas, contra 95% y 91% para un fragmento de 324 pb, respectivamente).

Esto nos llevó a examinar la variabilidad en el gen *cagA* utilizando la amplificación por PCR con diferentes iniciadores que cubrían diferentes regiones del gen, principalmente del extremo 5' y de la región media (Figura 8 y Tabla 5). El extremo 3' no fue ampliamente estudiado, ya que es sabido que es una región variable y ha sido ampliamente estudiada. El

criterio que empleamos fue basado en la presencia y ausencia del producto amplificado, obteniendo 34 patrones diferentes de amplificación de las 57 cepas de *H. pylori* estudiadas con los siete pares de iniciadores. Lo que más llamó la atención fue la obtención de productos de PCR de cepas negativas a la hibridación con las sondas CAG4 y CAG25 (Tabla 5). Cabe aclarar que todos y cada uno de los diferentes ensayos de amplificación por PCR fueron estandarizados en cuanto a la temperatura de alineamiento de los iniciadores y concentración de $MgCl_2$, y con el uso de DNA de cepas tipo de *H. pylori* positiva y negativas a la presencia del gen. Sin embargo, esto no descartó la amplificación de productos inespecíficos con las cepas estudiadas (datos no mostrados). Chizhikov y cols. en 2001¹⁵⁹, han sugerido que algunas de estas bandas inespecíficas producidas en los ensayos de PCR, pueden quedar localizadas en el gel de agarosa de forma similar a las posiciones de las bandas producidas en los controles positivos, lo que indica que el poder de resolución de los geles de agarosa es pobre.

Cuando se analizó la detección del gen *cagA* por PCR usando los siete pares de iniciadores y cuadro clínico, se encontró una asociación significativa con los iniciadores F1-B1 y limítrofe con F1-B7629 (Figura 10). Cuando se emplean los iniciadores F1-B1 parecen diferenciar las cepas UP y UPH de las cepas NoUP; sin embargo, cuando se emplean los iniciadores F1-B7629 parece que estos pueden discriminar entre las cepas UP de NoUP y UPH. Una posible explicación de esto es que las cepas provenientes de los pacientes UPH presenten polimorfismo en el sitio complementario al iniciador B7629. Sin embargo, esto no fue posible analizarlo a partir de los productos secuenciados, ya que se requiere amplificar y secuenciar un fragmento del gen *cagA* que incluya los sitios complementarios de estos iniciadores. Por otro lado, cuando se analizaron los iniciadores mediante una gráfica ROC se observó que los iniciadores F1-B7629 eran los mejores en sensibilidad y especificidad, para la detección del gen

cagA (Figura 9). De acuerdo a estos hallazgos, es posible que este par de iniciadores sean útiles para diferenciar cepas patógenas (provenientes de pacientes con UP) de no patógenas, por lo que se requieren de un mayor número de aislamientos clínicos de *H. pylori*.

Cuando se analizaron las secuencias de nucleótidos de los diferentes fragmentos amplificados, seleccionados por patrón de amplificación con los diferentes iniciadores, se encontró por un lado la amplificación de un producto inespecífico con los iniciadores CagA5-CagA2 para las cepas IC1N, 46A6N, 21aC3 y 48C7, el cual corresponde al gen de la proteína asociada a virulencia (*vapD*), que es un importante factor de virulencia en *Dichelobacter nodosus*¹⁶⁰ y que ha sido descrito también en *A. actinomycetemcomitans*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae* y en *H. pylori*. Cao y cols.¹⁶¹ encontraron el gen *vapD* en 19 de 31 (61.3%) cepas de *H. pylori* probadas por hibridación. Por otro lado, el análisis de las secuencias de nucleótidos en los sitios complementarios a los iniciadores reveló la presencia de sustituciones de nucleótidos hacia el extremo 3', lo que posiblemente ocasionó la pérdida de amplificación del fragmento (Figura 11). Estos cambios pueden ser debido a mutaciones; las cuales podemos clasificar en silenciosas, las cuales no cambian a un aminoácido en particular, o mutaciones que resultan en el cambio de un aminoácido y que pueden o no afectar la función de la proteína. Wang y cols.¹⁶² han sugerido que las mutaciones *de novo* son frecuentemente usadas por *H. pylori* para su adaptación a cambios de condiciones ambientales, como los manifestados en el desarrollo de resistencia a los antibióticos y en la variación de los antígenos de superficie. Sin embargo, Suerbaum y cols.¹⁶³ sugieren que la gran diversidad genética que presenta *H. pylori* sea debida a los eventos de recombinación, mutaciones o una combinación de ambos eventos y que la recombinación por sí sola no crea los sitios polimórficos, pero puede incrementar el número de secuencias únicas cuando están presentes nucleótidos polimórficos.

Por otro lado, todas las secuencias de los diferentes fragmentos secuenciados fueron analizadas en base a las tasas de sustituciones nucleotídicas. Las sustituciones no sinónimas (d_N) resultan en el cambio de un aminoácido en la secuencia, por lo cual la secuencia de aminoácidos es no conservada. Las sustituciones sinónimas (d_S) no dan como resultado en un cambio de aminoácido. La relación de las sustituciones d_N/d_S es un importante indicador de presión selectiva a nivel de proteínas. Una alta proporción de d_N/d_S indica que el gen o segmento del gen está bajo presión selectiva para variación; contrariamente, una proporción baja de d_N/d_S indica que el gen o el fragmento está bajo presión selectiva para conservación ¹⁶⁴. La proporción de d_N/d_S para los fragmentos de 324 y 750 pb fue de 0.3 (Tabla 7), valor típico para *H. pylori* y sugiere selección para una secuencia de aminoácidos conservada ¹⁶⁵. El fragmento de 570 pb presenta una proporción de 10 veces de d_S por arriba a las d_N , lo que indica que es un fragmento conservado, como se observa para genes bacterianos ¹⁶⁶. En el caso del fragmento de 400 pb, se encontró una proporción de d_N/d_S de 0.6 sugiriendo que este fragmento está bajo presión selectiva de variación ¹⁶⁶. Cuando las proporciones de d_N y d_S de este fragmento fueron comparadas por usar una ventana de 30 aminoácidos (Gráfica 1), dos regiones fueron identificadas: la región A (residuos de aminoácidos 60 al 200) presenta únicamente d_N , sugiriendo que esta porción del producto del gen puede estar expuesta a selección del huésped (por ejemplo a la respuesta inmune) ¹¹¹. La región B presenta una alta proporción de sustituciones sinónimas (Gráfica 1), sugiriendo que esta región del fragmento de 400 pb tiene una divergencia nucleotídica atribuible a selección natural ^{162, 165}.

Al comparar las secuencias del fragmento de 243 pb con las secuencias disponibles en el banco de genes de aislados holandeses y chinos, sorprendentemente, encontramos que los aislados mexicanos se agrupan con los aislados holandeses y no con las cepas chinas (Figuras 12

y 14). En un estudio reciente, Ghose y cols. 2002¹⁶⁷, encontraron evidencias de que *H. pylori* ha estado presente en los humanos al menos desde los ancestros amerindios que migraron de Asia hace más de 11,000 años. Estos datos son consistentes con los encontrados por Yamaoka y cols.¹⁶⁸ estudiando aislados de amerindios de Colombia. Una posible explicación de estos hallazgos es que las cepas de *H. pylori* del viejo mundo sean más eficientes colonizadores de la mucosa gástrica que las cepas de los nativos amerindios^{168, 169}.

El análisis de la secuencia completa del gen *cagA* de la cepa 53CSN mostró un tamaño de 3,522 nucleótidos, el cual está dentro del intervalo de 3,444 a 3,753 nucleótidos descrito por Covacci y cols.⁸¹. Al comparar la secuencia del gen con secuencias reportadas en el banco de genes se encontró una homología en identidad a nivel de secuencia nucleotídica que va del 85 al 94%. Se observaron altas homologías (92 a 94%) para secuencias de aislados no asiáticos comparadas con secuencias de aislados asiáticos (85%). Si bien las secuencias presentan una divergencia nucleotídica, esto no debe sorprendernos ya que *H. pylori* ha sido considerado un microorganismo con una alta divergencia genética, la cual es debida principalmente a las sustituciones sinónimas^{162, 165}. Sin embargo, la región variable en el extremo 3' del gen es la región con mayor heterogeneidad en el gen *cagA* por el número de repeticiones del fragmento de 102 pb y en donde se han encontrado diferencias nucleotídicas sustanciales entre las cepas aisladas de occidente y las asiáticas^{89, 89a, 170}. Las cepas occidentales presentan una secuencia específica denominada WSS (FPLKRHDKV DDL SKVGRSVSPEPIYATIDDLGGP) y para los aislados asiáticos ESS (AINRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAGRSASPEPIYATIDFDEANQA G). El análisis de la secuencia completa del gen *cagA* de la cepa 53CSN mostró una secuencia WSS (Figura 15).

Backert y cols en 2001 ¹⁰⁴, demostraron que el sitio de fosforilación de tirosina localizado en las secuencias WSS y ESS es esencial para la formación del pedestal. Recientemente, Higashi y cols. En 2002 ¹⁷⁰, mostraron que en estos sitios de fosforilación es donde se lleva a cabo la unión de la proteína SHP-2 y que dependiendo del número y secuencias de fosforilación de tirosina, el efecto citopático que presentan las células es mayor. Además, observaron que la proteína SHP-2 tiene una mayor afinidad a la secuencia ESS que la de WSS. Estas diferencias estructurales en la proteína CagA podrían estar involucradas en el incremento del riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico en personas que estén infectadas con cepas de *H. pylori* que expresan la proteína CagA con alta afinidad a SHP-2.

CONCLUSIONES.

La prevalencia de *Helicobacter pylori* en la úlcera péptica hemorrágica fue menor que en la úlcera péptica.

La seroprevalencia de IgG contra antígeno bacteriano total, no distingue entre los tres grupos de estudio.

La detección de IgA contra la proteína del gen asociado a la citotoxina (CagA) fue mayor en pacientes con úlcera péptica.

Helicobacter pylori no es un factor de riesgo para que la úlcera péptica sangre.

La prevalencia global en este estudio de *Helicobacter pylori cagA* positivo fue del 92%.

La amplificación del fragmento de 750 pb (F1-B7629) mostró la mejor sensibilidad y especificidad en la detección del gen *cagA*.

La pérdida de amplificación del gen *cagA* se debió al polimorfismo en los sitios complementarios a los iniciadores.

La región 5' del gen *cagA* de *H. pylori* es conservada.

La secuencia parcial del gen *cagA* de las cepas mexicanas presentó un alto grado de homología con las secuencias del gen *cagA* de cepas holandesas, no así con las cepas chinas.

Existen dos sitios de fosforilación de la tirosina en el gen *cagA* de *H. pylori* de un paciente con úlcera péptica hemorrágica que podrían participar en la formación del pedestal de las células epiteliales gástricas.

PERSPECTIVAS.

Numerosos estudios han mostrado que las cepas de *H. pylori cagA* positivas son más virulentas que las cepas *cagA* negativas. Sin embargo, la presencia del gen *cagA per se* no es un predictor de enfermedad en la infección por *H. pylori*, por lo que se deberá determinar si los iniciadores F1-B7629 pueden diferenciar las cepas de *H. pylori* ulcerogénicas de las no ulcerogénicas, utilizando un mayor número de cepas de los diferentes cuadros clínicos estudiados, así como incluir cepas aisladas de gastritis crónica, úlcera gástrica y cáncer gástrico.

La proteína CagA es inyectada por *H. pylori* a las células epiteliales gástricas, en donde la tirosina es fosforilada. La proteína CagA-fosforilada se une a la fosfatasa SHP-2, activándose la actividad de fosfatasa y por lo tanto induciendo cambios morfológicos en las células. Por otro lado, la diversidad en la secuencia de aminoácidos en los sitios de fosforilación de tirosina de CagA, pueden proveer una de las más importantes variables en el resultado de la infección por *H. pylori*, por lo que deberá determinarse si las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con cáncer gástrico presentan una mayor fosforilación de tirosina en la proteína CagA, comparadas con cepas aisladas de gastritis crónica y úlcera péptica. Así como también, determinar si existe alguna relación con la diversidad de los motivos de fosforilación de tirosina en la proteína CagA.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Warren R. Discovery and Pathology of *Helicobacter pylori*. X th International Workshop on Gastrointestinal Pathology and *Helicobacter pylori*. 1997, Lisboa, Portugal.
- 2) Marshall BJ. The 1995 Albert Lasker Medical Research Award. *Helicobacter pylori*. The etiologic agent for peptic ulcer. JAMA 1995;274:1064-1066.
- 3) Helicobacter Foundation. 1995. *Helicobacter pylori*. World Congresses of Gastroenterology, October 1994.
- 4) Blaser MJ. *Helicobacter pylori* Phenotypes Associates with Peptic Ulceration. Scand J Gastroenterol 1994;205(Suppl):1-5.
- 5) Mobley HLT. Defining *Helicobacter pylori* as a Pathogen: Strain Heterogeneity and Virulence. Am J Med 1996;100:2s-11s.
- 6) Husson MO, F Gottrand, A Vachee, L Dhaenens, E Martin de la Salle, D Turck, M Houcke, H Leclerc. Importance in Diagnosis of Gastritis of Detection by PCR of the *cag A* Gene in *Helicobacter pylori* Strain Isolated from Children. J Clin Microb. 1995;33:3300-3303.
- 7) Kreiss C, AL Blum, P Malfertheiner. Peptic Ulcer Pathogenesis. Current Opinion in Gastroenterology. 1995;11(suppl 1):25-31.
- 8) Suerbaum S, T Wadstrom. Bacterial Pathogenic Factors. Current Opinion in Gastroenterology. 1995;11(suppl 1):11-15.
- 9) Jerris RC. *Helicobacter*. in: Patrick R. Murray, E. Jo Barron, Michael A. Pfaller, Fred C. Tenover, Robert H. Tenover. Manual of Clinical Microbiology. 6th Edition. ASM PRESS. Washington, D.C. 1995. pag. 492-498.
- 10) Group 2. Aerobic/Microaerophilic, Motile, Helical/Vibrioid Gram-Negative bacteria. Genus *Helicobacter*. In: John G. Holt, Noel R. Krieg, Peter H.A. Sneath, Jame T. Staley, Stanley T. Williams. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. 1994. pag. 42-43, 62.
- 11) Fox JG, P Correa, NS Taylor, N Thompson, E Fonham, F Janney, M Sobhan, B Ruiz, F Hunter. High prevalence and persistence of cytotoxin-positive *Helicobacter pylori* strains in a population with high prevalence of atrophic gastritis. Am J Gastroenterol. 1992;87:1554-1560.
- 12) Klein PD, DY Graham, A Gaillour, AR Opekun, EO Smith. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. Lancet. 1991;337:1503-1506.
- 13) Goodman KJ, P Correa. The transmission of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. Int J Epidemiol 1995;24:875.

- 14) Blaser JM. *Helicobacter pylori* : Its role in disease. Clin Infect Dis. 1992;15:386-393.
- 15) Cave DR. Transmission and Epidemiology of *Helicobacter pylori*. Am J Med 1996;100:12S-18S.
- 16) Cave DR. Epidemiology and Transmission of *Helicobacter pylori* Infection. Gastroenterol. 1997;113:S9-S14.
- 16a) Redlinger T, K O'Rourke, KJ Goodman. Age distribution of *Helicobacter pylori* seroprevalence among young children in a United States/Mexico border community: evidence for transitory infection. Am J Epidemiol. 1999;150:225-230.
- 17) Torres J, GI Perez-Perez, KJ Goodman, JC Atherton, BD Gold, PR Harris, A Madrazo-de la Garza, J Guarner, O Muñoz. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. Arch M Res 2000;31:431-469.
- 18) Torres J, Y Leal-Herrera, GI Perez-Perez, A Gomez, M Carmorlinga-Ponce, R Cedillo-Rivera, R Tapia-Conyer, O Muñoz. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. J Infect Dis. 1998;178:1089-1094.
- 19) González CA, N Sala, G Capella. Genetic Susceptibility and Gastric Cancer Risk. Int J Cancer. 2002;100:249-260.
- 20) Danesh J. Estimating the contribution of *Helicobacter pylori* to gastric cancer. Br J Cancer 2000;83:970.
- 21) Guarner J, A Mohar, J Parsonnet, D Halperin. The association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and preneoplastic gastric lesions in Chiapas, Mexico. Cancer. 1993;71:297-301.
- 22) Feldman RA. Epidemiologic observations and open question about disease and infection caused by *Helicobacter pylori*. In Achtman M and Suerbaum S. *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology. Horizon Scientific Press. 2001. Norfolk, England.
- 23) Goodman KJ, P Correa, AHJ Tengana, H Ramírez, JP DeLany, G Pepinosa, M Lopez-Quinones, T Collazos-Parra. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathway. Am J Epidemiol. 1996;144:290-299.
- 24) McKeown I, P Orr, S Macdonald, A Kabani, R Brown, G Coghlan, M Dawood, J Embil, M Sargent, G Smart, CN Bernstein. *Helicobacter pylori* in the Canadian arctic: seroprevalence and detection in community water samples. Am J Gastroenterol. 1999;94:1823-1829.
- 25) Thomas J, G Gibson, M Darboe, A Dale, L Weaver. Isolation of *Helicobacter pylori* from human feces. Lancet. 1992;340:1194-1195.
- 26) Sean MK, MCL Pitcher, SM Farmery, GR Gibson. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. Gastroenterol. 1994;107:1671-1674.

- 27) Mapstone NP, FA Lewis, DS Tompkins, DAF Lynch, ATR Axon, MF Dixon, P Quirke. PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. *Lancet*. 1993;341:447.
- 28) van Zwet AA, JC Thijs, AMD Kooistra-Smid, J Schirm, JAM Snijder. Use of PCR with feces for detection of *Helicobacter pylori* infection in patients. *J Clin Microbiol*. 1994;32:1346-1348.
- 28a) Coombs GW, NM Foster, JW Pearman, GM Forbes. Detection of *Helicobacter pylori* antigen in faeces by enzyme immunoassay. *Pathology*. 2001;33:496-497.
- 29) Kazuyuki I, T Miura, R Kimizuka, Y Ebihara, Y Mizuno, K Okuda. Oral bacteria inhibit *Helicobacter pylori* growth. *FEMS Microbiology Letter*. 1997;152:355-361.
- 30) Ghiara P, M. Marchetti, MJ Blaser, MKR Tummuru, TL Cover, ED Segal, LS Tompkins, R. Rappuoli. 1995. Role of the *Helicobacter pylori* Virulence Factors Vacuolating Cytotoxin, CagA and Urease in a Mouse Model of Disease. *Infect Immun*. 63:4154-4160.
- 31) Dunn BE, GP Campbell, GI Perez-Perez, MJ Blazer. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*. 1990;265:9464-9469.
- 32) Austin JW, P Doig, M Stewart, TJ Trust. Macromolecular structure and aggregation state of *Helicobacter pylori* urease. *J Bacteriol*. 1991;173:5663-5667.
- 33) Evans DJ, DG Evans, SS Kirkpatrick, DS Graham. Characterization of the *Helicobacter pylori* urease and purification of its subunits. *Microbial Path*. 1991;10:15-26.
- 34) Labigne A, V Cussac, P Courcoux. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol*. 1991;173: 1920-1931.
- 35) Mobley HLT, MD Island, RP Hausinger. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev*. 1995;59:451-480.
- 36) Ferrero RL, V Cussac, P Courcoux, A Labigne. Construction of isogenic urease-negative mutants of *Helicobacter pylori* by allelic exchange. *J Bacteriol*. 1992;174:4212-4217.
- 37) Tsuda M, M Karita, MG Morshed, K Okita, T Nakazawa. A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect Immun*. 1994;62:3586-3589.
- 38) Eaton KA, S Krakowka. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 1994;62:3604-3607.
- 39) Ricci V, P Sommi, R Fiocca, M Romano, E Solcia, U Ventura. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin accumulates within the endosomal-vacuolar compartment of cultured gastric cells and potentiates the vacuolating activity of ammonia. *J Pathol*. 1997;183:453-459.
- 40) Eaton KA, DR Morgan, S Krakowka. Motility as a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*. 1992;37:123-127.

- 41) Geis G, S Suerbaum, B Forsthoff, H Leying, W Opferkuch. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol. 1993;38:371-377.
- 42) Suerbaum S, C Josenhans, A Labigne. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flaB* flagellin genes and construction of *H. pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. J Bacteriol. 1993;175:3278-3288.
- 43) Josenhans C, A Labigne, S Suerbaum. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. J Bacteriol. 1995;177:3010-3020.
- 44) Eaton KA, S Suerbaum, C Josenhans, S Krakowka. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. Infect Immun. 1996;64:2445-2448.
- 45) Dubreuil JD, GD Giudice, R Rappuoli. *Helicobacter pylori* interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process. Microbiol Mol Biol Rev. 2002;66:617-629.
- 46) Kronvall G, K Jönson. Receptins: a novel term for an expanding spectrum of natural and engineered microbial proteins with binding properties for mammalian protein. J Mol Recognit. 1999;12:38-44.
- 47) Wadström T, S Hirno, T Boren. Biochemical aspects of *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric mucosa. Aliment Pharmacol Ther. 1996;(suppl 1):17-27.
- 48) Simoons-Smit IM, BJ Appelmek, T Verboom, R Negrini, JL Penner, GO Aspinall, AP Moran, SF Fei, BS Shi, W Rudnica. Typing of *Helicobacter pylori* with monoclonal antibodies against Lewis antigens in lipopolysaccharide. J Clin Microbiol. 1996;34:2196-2200.
- 49) Wirth HP, M Yang, M Karita, MJ Blaser. Expression of the human cell surface glycoconjugates Lewis x and Lewis y by *Helicobacter pylori* isolates is related to *cagA* status. Infect Immun. 1996;64:4598-4605.
- 50) Monteiro MA, KH Chan, DA Rasko, DE Taylor, PY Zheng, BJ Appelmek, HP Wirth, M Yang, MJ Blaser, SO Hynes, AP Moran, MB Perry. Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. J Biol Chem. 1998;273:11533-11543.
- 51) Monteiro MA, BJ Appelmek, DA Rasko, AP Moran, SO Hynes, LL MacLean, KH Chan, FS Michael, SM Logan, J O'Rourke, A Lee, DE Taylor, MB Perry. Lipopolysaccharide structure of *Helicobacter pylori* genomic strains 26695, J99, mouse model *H. pylori* Sydney strain, *H. pylori* P4666 carrying sialyl Lewis X and *H. pylori* UA915 expressing Lewis B: classification of *H. pylori* lipopolysaccharides into glyco-type families. Eur J Biochem. 2000;267:305-320.
- 52) Moran AP, MM Prendergast, BL Appelmek. Molecular mimicry of host structure by bacterial lipopolysaccharides and contribution to disease. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996;16:105-115.

- 53) Takata T, E El-Omar, M Camorlinga, SA Thompson, Y Minohara, PB Ernst, MJ Blaser. *Helicobacter pylori* does not require Lewis X or Lewis Y expression to colonize C3H/HeJ mice. *Infect Immun.* 2002;70:3073-3079.
- 54) Leunk RD, PT Johnson, David BC, WG Kraft, DR Morgan. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol.* 1988;26:93-99.
- 55) Cover TL, MJ Blaser. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 1992;267:10570-10575.
- 56) Cover TL, MK Tummuru, P Cao, SA Thompson, MJ Blaser. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem.* 1994;269:10566-10573.
- 57) Telford JL, P Ghiara, M Dell'Orco, M Comanducci, D Burroni, M Bugnoli, MF Tecce, S Censini, A Covacci, Z Xiang, E Papini, C Montecucco, L Parente, R Rappuoli. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med.* 1994;179:1653-1658.
- 58) Schmitt W, R Hass. Genetics analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol.* 1994;12:307-319.
- 59) Cover TL, PI Hanson, JE Heuser. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol.* 1997;138:759-769.
- 60) Lupetti P, JE Hauser, R Manetti, P Massari, S Lanzavecchia, PL Bellon, R Dallai, R Rappuoli, JL Telford. Oligomeric and subunits structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol.* 1996;133:801-807.
- 61) Nguyen VQ, RM Caprioli, TL Cover. Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect Immun.* 2001;69:543-546.
- 62) Lanzavecchia S, PL Bellon, P Lupetti, R Dallai, R Rappuoli, JL Telford. Three-dimensional reconstruction of metal replicas of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Struct Bio.* 1998;121:9-18.
- 63) Yahiro K, T Niidome, M Kimura, T Hatakeyama, H Aoyagi, H Kurazono, K Imagawa, A Wada, J Moss, T Hirayama. Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta. *J Biol Chem.* 1999;274:36693-36699.
- 64) McClain MS, W Schraw, V Ricci, P Boquet, TL Cover. Acid activation of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells. *Mol Microbiol.* 2000;37:433-442.

- 65) Atherton JC, P Cao, RM Peek, MK Tummuru, MJ Blaser, TL Cover. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995;270:17771-17777.
- 66) Forsyth MH, JC Atherton, MJ Blaser, TL Cover. Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun*. 1998;66:3088-3094.
- 67) Atherton JC, PM Sharp, TL Cover, G Gonzalez-Valencia, RM Peek, SA Thompson, CJ Hawkey, MJ Blaser. Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread type, m1 and m2, and have evolved through limited recombination. *Curr Microbiol*. 1999;39:211-218.
- 68) van Doorn LJ, C Figueiredo, R Sanna, S Pena, P Midolo, EK Ng, JC Atherton, MJ Blaser, WG Quint. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol*. 1998;36:2597-2603.
- 69) Gerhardt M, N Lehn, N Neumayer, T Boren, R Rad, W Schepp, S Mielhke, M Classen, C Prinz. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:12778-12783.
- 70) van Doorn LJ, C Figueiredo, R Sanna, A Plaisier, P Schneeberger, W de Boer, WG Quint. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 1998;115:58-66.
- 71) Papini E, M de Bernard, E Milia, M Bugnoli, M Zerial, R Rappuoli, C Montecucco. Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal compartments. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:9720-9724.
- 72) Molinari M, C Galli, N Norais, JL Telford, R Rappuoli, JP Luzio, C Montecucco. Vacuoles induced by *Helicobacter pylori* toxin contain both late endosomal and lysosomal markers. *J Biol Chem*. 1997;272:25339-25344.
- 73) de Bernard M, B Arico, E Papini, R Rizzuto, G Grandi, R Rappuoli, C Montecucco. *Helicobacter pylori* toxin VacA induces vacuole formation by acting in the cell cytosol. *Mol Microbiol*. 1997;26:665-674.
- 74) Galmiche A, J Rassow, A Doye, S Cagnol, JC Chambard, V de Thillot, I Just, V Ricci, E Solcia, E van Obberghen, P Boquet. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J*. 2000;19:6361-6370.
- 75) Garner JA, TL Cover. Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect Immun*. 1996;64:4197-4203.
- 76) Reyrat JM, S Lanzavecchia, P Lupetti, M de Bernard, C Pagiaccia, V Pelicic, M Charrel, C Olivieri, N Norais, X Ji, V Cabiaux, E Papini, R Rappuoli, JL Telford. 3D imaging of the 58 kDa cell binding subunit of the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *J Mol Biol*. 1999;290:459-470.

- 77) Tombola F, C Carlesso, I Szabo, M de Bernard, JM Reyrat, JL Telford, R Rappuoli, C Montecucco, E Papini, M Zoratti. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin form anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. *Biophys J.* 1999;76:1401-1419.
- 78) Tombola F, F Oregna, S Brutscher, I Szabo, G del Giudice, R Rappuoli, C Montecucco, E Papini, M Zoratti. Inhibition of the vacuolating and anion channels activities of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett.* 1999;460:221-225.
- 79) Szabo I, S Brutshe, F Tombola, M Moschioni, B Santin, JL Telford, R Rappuoli, C Montecucco, E Papini, M Zoratti. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J.* 1999;18:5517-5527.
- 80) Xiang Z, S Censini, PF Bayeli, JL Telford, N Figura, R Rappuoli, A Covacci. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two mayor types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating toxin. *Infect Immun.* 1995;63:94-98.
- 81) Covacci A, S Censini, M Bugnoli, R Petracca, D Burroni, G Macchia, A Massone, E Papini, Z Xiang, N Figura, R Rappuoli. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigens of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 1993;90:5791-5795.
- 82) Tummuru MKR, TL Cover, MJ Blaser. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun.* 1993;61:1799-1809.
- 83) Tummuru MKR, TL Cover, MJ Blaser. Mutation of the cytotoxin-associated *cagA* gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 1994;62:2609-2613.
- 84) Cover TL, CP Dooley, MJ Blaser. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun.* 1990;58:603-610.
- 85) Crabtree JE, N Figura, JD Taylor, M Bugnoli, D Armellini, DS Tompkins. Expression of 120 kilodalton protein and cytotoxicity in *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol.* 1992;45:733-734.
- 86) Telford JL, A Covacci, P Ghiara, C Montecucco, R Rappuoli. Unravelling the pathogenic role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer: potential new therapies and vaccines. *TIBTECH.* 1993;12:420-425.
- 87) Evans DJ, DMM Queiroz, EN Mendes, DG Evans. Diversity in the variable region of *Helicobacter pylori cagA* gene involves more than simple repetition of a 102-nucleotide sequence. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245:780-784.

- 88) Yamaoka Y, T Kodama, K Kashima, DY Graham, AR Sepulveda. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2258-2263.
- 89) Yamaoka Y, HMT El-Zimaity, O Gutierrez, N Figura, JK Kim, T Kodama, K Kashima, DY Graham. Relationship between the *cagA* 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and Susceptibility to Low pH. *Gastroenterol.* 1999;117:342-349.
- 89a) Azuma T, A Yamakama, S Yamazaki, K Fukuta, M Ohtani, Y Ito, M Dojo, Y Yamazaki, M Kuriyama. Correlation between variation of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* and disease outcome in Japan. *J Infect Dis.* 2002;186:1621-1630.
- 90) Censini S, C Lange, Z Xiang, JE Crabtree, P Ghiara, M Borodovsky, R Rappuoli, A Covacci. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:14648-14653.
- 91) Akopyants NS, SW Clifton, D Kersulyte, JE Crabtree, BE Youree, CA Reece, NO Bukanov, ES Drazek, BA Roc, DE Berg. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 1998;28:37-53.
- 92) Tomb JF, O White, AR Kerlavage, RA Clayton, GG Sutton, RD Fleischmann, KA Ketchum, HJP Klenk, S Gill, BA Dougherty, K Nelson, J Quackenbush, L Zhou, EF Kirkness, S Peterson, B Loftus, D Richardson, R Dodson, HG Khalak, A Glodek, K McKenney, LM Fitzgerald, N Lee, MD Adams, JC Venter, *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 1997;388:539-547.
- 93) Alm RA, LS Ling, DT Moir, BL King, ED Brown, PC Doig, DR Smith, B Noonan, BC Guild, BL deJonge, G Carmel, PJ Tummino, A Caruso, M Uria-Nickelsen, DM Mills, C Ives, R Gibson, D Merberg, SD Mills, Q Jiang, DE Taylor, GF Voivis, TJ Trust. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 1999;397:176-180.
- 94) Macda S, H Yoshida, T Ikenoue, K Ogura, F Kanai, N Kato, Y Shiratori, M Omata. Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut.* 1999;44:336-341.
- 95) Covacci A, JL Telford, GD Giudice, J Parsonnet, R Rappuoli. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science.* 1999;284:1328-1333.
- 96) Christie JP, JP Vogel. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* 2000;8:354-360.
- 97) Segal ED, S Falkow, LS Tompkins. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:1259-64.

- 98) Segal ED, J Cha, J Lo, S Falkow, LS Tompkins. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96:14559-14564.
- 99) Asahi M, T Azuma, S Ito, Y Ito, H Suto, Y Nagai, M Tsubokawa, Y Tohyama, S Maeda, M Omata, T Suzuki, C Sasakawa. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. J Exp Med. 2000;191:593-602.
- 100) Odenbreit S, J Puls, B Sedlmaier, E Gerland, W Fischer, R Haas. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science. 2000;287:1497-1500.
- 101) Stein M, R Rappuoli, A Covacci. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after *cag*-driven host cell translocation. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:1263-1268.
- 102) Dundon WG, M de Bernard, C Montecucco. Virulence factors of *Helicobacter pylori*. Int J Med Microbiol. 2001;290:647-658.
- 103) Covacci A, R Rappuoli. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. J Exp Med. 2000;191:587-592.
- 104) Backert S, S Moese, M Selbach, V Brinkmann, TF Meyer. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. Mol Microbiol. 2001;42:631-644.
- 105) Backert S, EC Muller, PR Jungblut, TF Meyer. Tyrosine phosphorylation patterns and size modification of the *Helicobacter pylori* CagA protein after translocation into gastric epithelial cells. Proteomics. 2001;1:608-617.
- 106) Selbach M, S Moese, CR Hauck, TF Meyer, S Backert. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein *in vitro* and *in vivo*. J Biol Chem. 2002;277:6775-6778.
- 107) Stein M, F Bagnoli, R Halenbeck, R Rappuoli, WJ Fantl, A Covacci. C-Src/Lyn kinase activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. Mol Microbiol. 2002;43:971-980.
- 108) Miehke S, K Kibler, JG Kim, N Figura, SM Small, DY Graham, MF Go. Allelic variation in the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* obtained from Korea compared to the United States. Am J Gastroenterol. 1996;91:1322-1325.
- 109) Pan ZJ, RW van der Hulst, M Feller, SD Xiao, GN Tytgat, J Dankert, A van der Ende. Equally high prevalences of infection with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. J Clin Microbiol. 1997;35:1344-1347.

- 110) Yang JC, TH Wang, HJ Wang, CH Kuo, JT Wang, WC Wang. Genetic analysis of the cytotoxin-associated gene and the vacuolating toxin gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from Taiwanese patients. *Am J Gastroenterol.* 1997;92:1316-1321.
- 111) van der Ende A, ZJ Pan, A Bart, RW van der Hulst, M Feller, SD Xiao, GN Tytgat, J Dankert. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* populations in China and the Netherlands are distinct. *Infect Immun.* 1998;66:1822-1826.
- 112) Kurata JH, GD Honda, H Frank. Hospitalization and mortality rates for peptic ulcers: a comparison of a large health maintenance organization and United States data. *Gastroenterology* 1992;83:1008-1016.
- 113) Améndola R, P Luna, R Farias, M Ianella, L Boerr, R Corti. No short-term recurrence of peptic ulcer bleeding after successful eradication of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997;112:A58.
- 114) Lai KC, WM Hui, WM Wong, BCY Wong, WHC Hu, SK Lam. Treatment of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer hemorrhage-a long-term randomized, controlled study. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2225-2232.
- 115) Graham DY, MD Lidsky, AM Cox, DJ Evans, DG Evans, L Alpert, PD Klein, SL Sessoms, PA Michaletz, and ZA Saeed. Long-term non-steroidal anti-inflammatory drug use and *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology.* 1991;100:1653-1657.
- 116) Rokkas T, A Karameris, A Mavrogeorgis, E Rallis, N Giannikos. Eradication of *Helicobacter pylori* reduces the possibility of re-bleeding in peptic ulcer disease. *Gastrointest Endosc.* 1995;41:1-4.
- 117) Jaspersen D, T Koerner, W Schorr, M Brennenstuhl, C Raschka, C-H Hammar. *Helicobacter pylori* eradication reduces the rate of re-bleeding in ulcer hemorrhage. *Gastrointest Endosc.* 1995;41:5-7.
- 118) Jaspersen D, T Koerner, W Schorr, M Brennenstuhl, C-H-Hammar. Omeprazole-amoxicillin therapy for eradication of *Helicobacter pylori* in duodenal ulcer bleeding: preliminary results of a pilot study. *J Gastroenterol.* 1995;30:319-321.
- 119) Tagaris A, D Kamberoglou, D Tzitzis, B Doulgeroglou, B Tzias, M Lagoudakis. *Helicobacter pylori* (HP), non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and other risk factors in upper gastrointestinal (GI) hemorrhage. *Gastroenterology* 1995;108:A230.
- 120) Lee JM, NP Breslin, C Fallon, CA O'Morain. Rapid urease tests lack sensitivity in *Helicobacter pylori* diagnosis when peptic ulcer disease presents with bleeding. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1166-1170.
- 121) Henz J, H Kohl, S Wolters. *Helicobacter pylori*, NSAIDs and the risk of peptic ulcer bleeding-A prospective case-control study with matched pairs. *Gastroenterology* 1996;110:A165.

- 122) Stack WA, JC Atherton, GM Hawkey, RF Logan, CJ Hawkey. Interactions between *Helicobacter pylori* and other risk factors for peptic ulcer bleeding. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16:497-506.
- 123) Glupczynski Y, AM Hirschl. Diagnosis. in: The European *Helicobacter pylori* Study Group. The Year in *Helicobacter pylori* 1994.
- 124) Forrest JAH, NDC Finlayson, DJV Shearman. Endoscopy in gastrointestinal bleeding. *Lancet* 1974; 2:394-397.
- 125) Ashley BP. The histological recognition of *Helicobacter pylori*. In: Lee A, Mégraud F. *Helicobacter pylori*: Techniques for clinical diagnosis and basic research. W.B. Saunders Company Ltd, 1996. pp 33-45.
- 126) Price AB. The Sydney system: histological division. *J Gastroenterol Hepatol* 1991;6:209-222.
- 127) Sheng-Ang Ho, JA Hoyle, FA Lewis, AD Secker, D Cross, NP Mapstone, MF Dixon, JI Wyatt, DS Tompkins, GR Taylor, P Quirke. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol.* 1991;29:2543-2549.
- 128) Pitcher DG, NA Saunders, RJ Owen. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidinium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 1989;8:151-156.
- 129) Lage AP, E Godfroid, A Fauconnier, A Burette, JP Butzler, A Bollen, Y Glupczynski. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 1995;33:2752-2756.
- 129a) GenBank. Acceso vía la pagina del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- 129b) BCM Search Launcher: Multiple Sequence Alignments. Baylor College of Medicine. Human Genome Sequencing Center, One Baylor Plaza, Houston, TX. 2002. (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>).
- 129c) The Receiver-Operating Characteristic (ROC). In Weinstein MC and HV Fineberg. *Clinical Decision Analysis*. 1980. Press of W. B. Saunders Company. Philadelphia, PA. pag. 114-126.
- 130) Altschul SF, W Gish , W Miller, EW Myers, DJ Lipman. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403-410.
- 131) Sudhir K, K Tamura, IB Jakobsen, M Nei. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* 2001 (submitted).
- 132) Pride DT. SWAAP-A tool for analyzing substitutions and similarity in multiple alignments. 2000. (<http://www.bacteriamuseum.org/SWAAP>).

- 133) Camorlinga-Ponce M, J Torres, G Perez-Perez, Y Leal-Herrera, B Gonzalez-Ortiz, A Madrazo de la Garza, A Gómez, O Muñoz. Validation of a serologic test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the immune response to urease and CagA in children. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1264-1270.
- 134) Schlesselman JJ. Case-control studies. Design, conduct, analysis. New York. Oxford University Press. 1982. pp 180.
- 135) Daly LE, GJ Bourke, JM Gilvray. Interpretation and uses of medical statistics. Oxford. Blackwell Scientific Publications. 1991. pp191-196.
- 136) Kramer MS, AR Feinstein. Clinical Biostatistics. LIV. The biostatistics of concordance. *Clin Pharmacol Ther* 1981;29:111-122.
- 137) Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. The etiologic agent for peptic ulcer. *JAMA* 1995;274:1064-1066.
- 138) Laine L. The long-term management of patients with bleeding ulcers: *Helicobacter pylori* eradication instead of maintenance antisecretory therapy. *Gastrointest Endosc* 1995;41:77-79.
- 139) Andersen IB, O Bonnevie, T Jorgensen, TJ Sorensen. Time trends for peptic ulcer disease in Denmark, 1981-1993. Analysis of hospitalization register and mortality data. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:260-6.
- 140) Tin-Tsan L, Y Chau-Ting, E Yang, C Pang-Chi. Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction assay using gastric biopsy specimens taken for CLOtest. *J Gastroenterol*. 1996;31:329-32.
- 141) Roosendaal R, EJ Kuipers, AS Peña, J de Graaff. Recovery of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens is not dependent on the transport medium used. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2798-2800.
- 142) van Doorn LJ, Y Henskens, N Nouhan, A Verschuuren, R Vreede, P Herbink, G Ponjee, K van Krimpen, R Blankenburg, J Scherpenisse, W Quint. The efficacy of laboratory diagnostic of *Helicobacter pylori* infections in gastric biopsy specimens is related to bacterial density and *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes. *J Clin Microbiol*. 2000;38:13-17.
- 143) Peura D. *Helicobacter pylori*: A diagnostic dilemma and a dilemma of diagnosis. *Gastroenterology* 1996;109:313-315.
- 144) Lin SY, YS Jeng, CK Wang, FT Ko, K Lin, JD Liu, PH Chen, JG Chang. Polymerase chain reaction diagnosis of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal diseases: comparison with culture and histopathological examinations. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:286-289.
- 145) Kim DY. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection using polymerase chain reaction in gastric biopsy specimens. *GUT* 1997;41(S):A84,08/308.

- 146) Malfertheiner P, A Hackelsberger, JE Dominguez-Muñoz, G Illies, A Roessner, M Nilius. Is the *Helicobacter pylori* negative bleeding duodenal ulcer a myth? *Gastroenterology* 1997;112:A208.
- 147) Cullen DJE, GM Hawkey, DC Greenwood, H Humphreys, V Shepherd, RFA Logan, CJ Hawkey. Peptic bleeding in the elderly: relative roles of *Helicobacter pylori* and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut* 1997;41:459-462.
- 148) Shilling D, G Haisde, R Jackobs. *Helicobacter pylori* infection: A risk factor for stress ulcer bleeding in cardiosurgical intensive care unit patients? A prospective evaluation in 3747 cardiosurgical patients. *Gastroenterol* 2000; 118:A509, 2669.
- 149) Weil J, MJ Langman, P Wainwright, DH Lawson, M Rawlins, RFA Logan, TP Brown, MP Vessey, M Murphy, DG Colin-Jones. Peptic ulcer bleeding: accessory risk factor and interactions with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut* 2000;46:27-31.
- 150) DeCross AJ, BJ Marshall. The role of *Helicobacter pylori* in Acid-Peptic Disease. *Am J Med Sci.* 1993;306:381-392.
- 151) Mégraud F, H Lamouliatte. *Helicobacter pylori* and Duodenal Ulcer: Evidence Suggesting Causation. *Dig Dis Sci.* 1992;37:769-772.
- 152) Moran AP. Pathogenic properties of *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol* 1996;31(Suppl 215):22-31.
- 153) Takata T, M Okada, T Shiroani, S Fujimoto, K Anzai, T Shiroani, M Okada, M Sawae, J Ono. Analysis of the expression of CagA and VacA and the vacuolating activity in 167 isolates from patients with either peptic ulcers or non-ulcer dyspepsia. *Am J Gastroenterol.* 1998;93:30-34.
- 154) Atherton JC, KT Tham, RM Peek, TL Cover, MJ Blaser. Density of *Helicobacter pylori* infection in vivo as assessed by quantitative culture and histology. *J Infect Dis.* 1996; 174:552-556.
- 155) van der Ender A, EAJ Rauws, M Feller, CJJ Mulder, GNJ Tytgat, J Dankert. Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from members of a family with a history of peptic ulcer disease. *Gastroenterol.* 1996;111:638-647.
- 156) Figura N, C Vindigni, A Covacci, L Presenti, D Burrioni, R Vernillo, T Banducci, F Roviello, D Marrelli, M Biscontri, S Kristodhullu, C Gennari, D Vaira. *cagA* positive and negative *Helicobacter pylori* strains are simultaneously present in the stomach of most patients with non-ulcer dyspepsia: relevance to histological damage. *Gut.* 1998;42:772-778.
- 157) Covacci A, S Falkow, DE Berg, R Rappuoli. Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*. *Trens Microbiol.* 1997;5:205-208.

158) van Doorn LJ, PM Schneeberger, N Nouhan, AP Plaisier, WGV Quint, WA de Boer. Importance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. *Gut*. 2000;46:321-326.

159) Chizhikov V, A Rasooly, K Chumakov, DD Levy. Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:3258-3263.

160) Bloomfield GA, G Whittle, MB McDonagh, ME Katz, BF Cheetham. Analysis of sequences flanking the *vap* regions of *Dichelobacter nodosus*: evidence for multiple integration events, a killer system, and a new genetic element. *Microbiol*. 1997;143:553-562.

161) Cao P, TL Cover. High-lever genetic diversity in *vapD* chromosomal region of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 1997;179:2852-2856.

162) Wang G, MZ Humayun, DE Taylor. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol*. 1999;7:488-493.

163) Suerbaum S. Genetic variability within *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol*. 2000;290:175-181.

164) Yang Z, R Nielsen, N Goldman, AMK Pedersen. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics*. 2000;155:431-449.

165) Achtman M, T Azuma, DE Berg, Y Ito, G Morelli, ZJ Pan, S Suerbaum, SA Thompson, A van der Ende, LJ van Doorn. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol*. 1999;32:459-470.

166) Stockbauer KE, D Grigsby, X Pan, YX Fu, LM Perea-Mejia, A Cravioto, JM Musser. Hypervariability generated by natural selection in an extracellular complement-inhibiting protein of serotype M1 strains of group A *Streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 1998;95:3128-3133.

167) Ghose Chandrabali, GI Perez-Perez, MG Domínguez-Bello, DT Pride, CM Bravi, MJ Blazer. East Asian genotypes of *Helicobacter pylori* strains in Amerindians provide evidence for its ancient human carriage. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 2002;99:15107-15111.

168) Yamaoka Y, E Orito, M Mizokami, O Gutierrez, N Saitou, T Kodama, MS Osato, JG Kim, FC Ramirez, V Mahachai, DY Graham. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Lett*. 2002;517:180-184.

169) Kersulyte D, AK Mukhopadhyay, B Velapatiño, W Su, ZJ Pan, C Garcia, V Hernandez, Y Valdez, R Mistry, RH Gilman, Y Yuan, H Gao, T Alarcon, M Lopez-Brea, GB Nair, A Chowdhury, S Datta, M Shirai, T Nakzawa, R Ally, I Segal, BCY Wong, SK Lam, FO Olfat, T Boren, L Engstrand, O Torres, R Schneider, JE Thomas, S Czinn, DE Berg. Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *J Bacteriol*. 2000;182:3210-3218.

170) Higashi H, R. Tsutsumi, A. Fujita, S. Yamazaki, M. Asaka, T. Azuma, M. Hatakeyama. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. Proc Natl Acad Sci, USA. 2002;99:14428-14433.

Bleeding peptic ulcers and presence of *Helicobacter pylori* by various tests: a case-control study

Gonzalo Castillo-Rojas^a, M. Arturo Ballesteros^b, Sergio Ponce de León^c, Rosario Morales-Espinosa^a, Alejandro Cravioto^a and Yolanda López-Vidal^a

Background Virulence factors of *Helicobacter pylori* are associated with peptic ulcer disease and may be also associated with bleeding peptic ulcers (BPU).

Aim To determine whether *H. pylori* and/or the cytotoxin-associated gene (*cagA*) can increase the risk of bleeding in peptic ulcers.

Patients Sixty-seven patients were studied. Thirty had BPU, 20 had non-bleeding peptic ulcers (NBPU), and 17 were control subjects (NPU).

Methods The prevalence of *H. pylori* was assessed by the urease fast test, histological examination, serology, and 16S ribosomal RNA and *cagA* gene amplification by polymerase chain reaction (PCR).

Results Histology and PCR showed greater sensitivity for diagnosis of *H. pylori* under bleeding circumstances when compared with other tests. Association of *H. pylori* was greater in the NBPU group (odds ratio [OR] 4.91, $P = 0.06$) than in the BPU group (OR 1.27, $P = NS$) when compared with the control group. When the BPU and NBPU groups were compared, *H. pylori* was found more often in the NBPU group (OR 0.26, $P < 0.10$). The *cagA*-positive gene showed a similar distribution in the three groups. The titres for anti-CagA immunoglobulin A (IgA) antibodies were higher in NBPU patients (83%) than in BPU or control

patients. Furthermore, anti-urease immunoglobulin G (IgG) was detected more frequently among BPU and NBPU patients.

Conclusions NBPU patients had the highest prevalence of *H. pylori* by PCR. It seems unlikely that either *H. pylori* or the *cagA*-positive gene act as significant risk factors for bleeding in peptic ulcers. The lower prevalence of the microorganism among patients who bleed cannot be explained as an artificial finding. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14:1113-1118 © 2002 Lippincott Williams & Wilkins

European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2002, 14: 1113-1118

Keywords: bleeding peptic ulcer, cytotoxin associated gene, *Helicobacter pylori*

^aUniversidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Programa de Inmunología Molecular Microbiana, ^bHospital Central Sur de Alta Especialidad de Petróleos Mexicanos, and ^cInstituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán", México DF, México

Correspondence to Yolanda López-Vidal PhD, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Edif. de Investigación, 4to piso, México DF, CP 04510, México
Tel/fax: +52 55 5616 0844; e-mail: lvidal@servidor.unam.mx

Sponsorship: This research was funded by grants DGPA IN218898 and PAEP 202307 from Universidad Nacional Autónoma de México and CONACyT 27857-M.

Received 5 December 2001 Revised 10 April 2002
Accepted 28 May 2002

Introduction

Today, as well as before the use of anti-secretory drugs, 15-20% of peptic ulcer patients develop bleeding and/or perforation or obstruction [1]. *Helicobacter pylori* is associated with peptic ulcer disease (PUD) and chronic gastritis. Eradication of *H. pylori* not only reduces recurrence of PUD, but also reduces the risk of bleeding in patients without other risk factors [2,3]. A lower prevalence of *H. pylori* has been reported, unexpectedly, in patients with bleeding peptic ulcers (BPU) compared with peptic ulcer patients without any complications. However, these results are controversial, since urease tests for determination of *H. pylori* have been questioned in the presence of blood residues. Urease tests have been used in most studies so far to determine *H. pylori* under these circumstances and, hence, may underestimate its actual presence. Therefore, underestimation of *H. pylori* has been used to

explain the lower prevalence of *H. pylori* in BPU patients [4]. Even more confusing has been the inclusion of patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), a well-recognized risk factor for bleeding in patients with PUD [5,6].

H. pylori has been classified into groups I and II according to its genotypic and phenotypic characteristics [7]. Both groups produce urease, adhesins and heat-shock proteins, among other components. Type I strains express vacuolating cytotoxin (VacA) and/or the cytotoxin-associated protein (CagA), which have been recognized as virulence markers in several studies. These studies have detected antibodies against such proteins in almost 100% of patients suffering from PUD but in only 60% of those diagnosed with gastritis [8].

The purpose of the present study was two-fold. First,



the aim was to determine the contribution of this microorganism in the bleeding of peptic ulcers by determining the prevalence of *H. pylori* in patients with non-bleeding peptic ulcers (NBPU), in patients with recent BPU, and in control subjects without a history of PUD. Several tests were used to determine the presence of *H. pylori*, such as the urease fast test, histological examination, serology and DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR) [9,10]. The second objective of the study was to determine the prevalence of the cytotoxin-associated gene (*cagA*) in *H. pylori* strains associated with peptic ulcers (bleeding or not bleeding).

Materials and methods

Study subjects

Patients with gastric or duodenal ulcers with ongoing or recent (< 24 h) bleeding (BPU) were recruited in a cross-sectional, prospective, observer-blinded study between November 1995 and August 1997. Two groups were included simultaneously in the study as controls: patients with NBPU and those in whom an endoscopy was performed because of non-ulcer dyspepsia and/or gastro-oesophageal reflux (NPU). These subjects were stratified according to age, smoking, gender and sporadic ingestion of NSAIDs. Patients were excluded if they were pregnant, were regular users of NSAIDs, were sporadic users of NSAIDs within the previous 2 weeks, were carriers of a chronic liver disease, had a history of bleeding portal hypertension, or were unable to make their own decisions. Patients were also excluded if they had received any kind of gastric anti-secretory drug within the previous 2 weeks. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Endoscopy and sampling

Upper-gastrointestinal tract panendoscopy was performed in all subjects. Patients with bleeding ulcers were studied within the first 24 h after admission; those with severe blood loss were stabilized, and samples were taken up to 48 h after the bleeding had been controlled. At least seven biopsies were taken from the gastric mucosa in each patient: four from the antrum and three from the corpus. One biopsy specimen of each region was tested by urease fast test (Hp FAST GL Supply, Camp Hill, Pennsylvania, USA). The remaining specimens were used for histological analysis and PCR amplification. Endoscopic findings were classified according to the criteria of Forrest *et al.* [11], size of the ulcer and location. After each study, endoscopes and biopsy forceps were cleaned thoroughly with detergent, disinfected by submersion in 2% glutaraldehyde for 20 min, and then rinsed with sterile solution.

Histology

Gastric biopsy specimens from the corpus and antrum

were embedded in paraffin and stained with haematoxylin and eosin to measure the severity of gastritis according to the Sydney system. Giemsa stain was used to detect *H. pylori* [12,13]. Two pathologists detected the presence of *H. pylori*.

DNA extraction and primers

Chromosomal DNA was extracted from each of the gastric biopsies [14]. Detection of *H. pylori* was carried out using a semi-nested PCR described by Sheng-Ang *et al.* [15]. For the detection of the *cagA* gene, two pairs of primers were used: one as described by Lage *et al.* [16] and the other as described by Tummuru *et al.* [17].

Detection of *H. pylori* from gastric biopsies by PCR

PCR was performed as described previously by Sheng-Ang *et al.* [15], Lage *et al.* [16] and Tummuru *et al.* [17]. The PCR-amplified products were examined by electrophoresis on 2% agarose gels and stained with ethidium bromide.

Detection of the *cagA* gene

For the detection and confirmation of the *cagA* gene, the PCR products from gastric samples were hybridized with the CAG4-Dig.

Seroprevalence of *H. pylori*

Immunoglobulin G (IgG) antibodies against whole-cell antigens, IgG and immunoglobulin A (IgA) antibodies against CagA, and urease recombinant proteins were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. These assays were made as described previously [18,19].

Statistical methods

For descriptive purposes, data were analysed using relative frequencies, arithmetic means (standard deviation; SD) and median (range) calculations, as deemed appropriate. Serum antibody levels were analysed as dichotomous (positive/negative) variables after defining the cut-off points. Simultaneous comparisons across the three groups were made with one-way analysis of variance for dimensional variables and chi-squared analysis for categorical variables. Regarding the association between *H. pylori* and the presence of bleeding, the odds ratio (OR) and its 95% confidence interval (CI) using the exact method [20] were calculated. Patients in the BPU group were taken as 'cases' and compared with the NPU and NBPU groups, being the 'controls'. For comparison of the NBPU group with the NPU group, the former were regarded as the 'cases' and the latter as the 'controls' [21]. Non-conditional logistic regression models were built to adjust for potential confounders, such as age, gender, sporadic NSAID intake, smoking and presence of the *cagA* gene [20]. Observer variability was measured as described by Kramer and Feinstein [22]. Statistical significance was estimated using Fish-

er's exact test. Detection consistency of *H. pylori* between the stomach antrum and corpus was tested using the McNemar's paired chi-squared analysis. The alpha level was set at 0.05. All the analyses were performed using Stata Package V6.0 (Stata Corporation, 1999; Stata statistical software, Release 6.0. College Station, Texas, USA).

Results

Study population

The demographic characteristics of the groups are shown in Table 1. Sixty-seven patients were included in the study (30 BPU, 20 NBPU, 17 NPU). There were no significant differences according to gender, smoking status or previous exposure to NSAIDs ($P = 0.6$), and the most frequent medications being taken were aspirin (250–500 mg), ibuprofen (400 mg), diclofenac (75 mg) and naproxen (275–750 mg). None of the subjects admitted to any NSAID ingestion in the 2 weeks before the study.

Endoscopic findings

In the BPU group, ten (33%) patients had gastric ulcers only, 16 (53%) patients had duodenal ulcers, and multiple ulcers (i.e. gastric and duodenal ulcers) were observed in the remaining four (14%) cases. For the NBPU group, the location distribution was nine (45%) stomach, nine (45%) duodenal, and two (10%) multiple ulcers. Although the size of the cohort was limited, there did not appear to be an association between ulcer location (duodenal/gastric) and the presence of *H. pylori*. Forrest's classification of bleeding activity in the BPU patients was as follows: Ia (2 cases), Ib (2 cases), IIa (5 cases), IIb (8 cases), IIc (7 cases) and III (6 cases). In these patients, the average haemoglobin level at admission was 9.7 g/dl (range 6.0–16), and 25 of them (83%) required blood transfusion. The average number of blood units required for stabilization was 2.1 units (range 0–8).

Detection of *H. pylori* by urease fast test and histology

The analysis of the urease fast test for the three groups showed a prevalence of 37%, 60% and 65% for BPU, NBPU and NPU, respectively. There was no statistical significance ($P = 0.11$) when comparing the three groups as a whole. The results of histology showed that concordance between observers for the presence of *H. pylori* was acceptable (78% global agreement, kappa 0.51, $P < 0.05$). Frequency of detection for *H. pylori* varied from 67% to 85% among groups and, again, no significant difference was found (Table 1).

Detection of the 16S rRNA gene by PCR

Frequency of *H. pylori* in the total group was 74.6% by PCR 16S rRNA, with a higher prevalence being found in the NBPU group (90%) and a lower prevalence in the BPU (70%) and NPU (65%) groups (Table 1). A significant difference was found ($P < 0.05$) when comparing the NPU and NBPU groups, but there was no significant difference when the BPU group was compared with the NPU group. The distribution of *H. pylori* by PCR 16S rRNA across the gastric antrum and/or body showed no significant difference, despite 12/67 cases being discordant (McNemar's $\chi^2 = 1.3$, $P = 0.25$).

Detection of the cagA gene by PCR hybridization

Prevalence of the cagA gene for PCR hybridization was 92% in the three groups. When analysed separately, this showed a variation in prevalence between 90.5% and 94.4%, without any statistical significance.

Association of *H. pylori* with bleeding peptic ulcers

Figure 1 depicts the association between the presence of *H. pylori*, as judged by the detection of the 16S rRNA by PCR tissue, with the different groups. As shown previously, *H. pylori* correlated strongly with NBPU. Relative risk, when compared with controls, was 4.91 (95% CI 0.68 to 55.51, $\chi^2 = 3.47$, $P = 0.06$). However, there was no association when the BPU group was compared with the control group (NPU) (OR

Table 1 Demographic characteristics of the three groups studied and prevalence of *Helicobacter pylori* using different methods of detection

Characteristics of patients	NPU (n = 17)	NBPU (n = 20)	BPU (n = 30)	P value
Mean age (years) (\pm SD)	48.9 (14.3)	58.5 (16.1)	60.5 (14.4)	0.06*
Gender (M/F)	5/12	13/7	20/10	NS
Smoker (n) (%)	5 (29)	9 (45)	18 (60)	NS
NSAID (n) (%)	3 (18)	4 (20)	9 (27)	NS
No. (%) positive for <i>H. pylori</i> as determined by				
Histology	12 (70)	17 (85)	20 (67)	
PCR-16S rRNA**	11 (65)	18 (90)	21 (70)	
IgG-WCA***	6/7 (85.7)	11/12 (91.6)	14/18 (87.75)	

BPU, bleeding peptic ulcer; NBPU, non-bleeding peptic ulcer; NPU, non-peptic ulcer; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; PCR, polymerase chain reaction.

*Analysis of variance (ANOVA) test. **Amplification of 16S ribosomal RNA gene by PCR.

***Immunoglobulin G (IgG) against whole-cell antigens (determined by enzyme-linked immunosorbent assay).

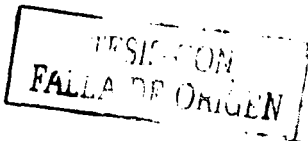
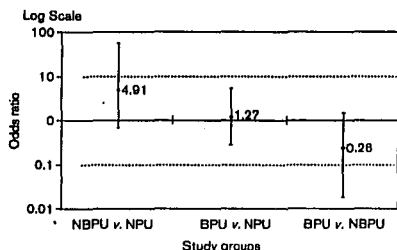


Fig. 1



Association of *Helicobacter pylori* with bleeding peptic ulcers. The presence of *H. pylori* was determined in gastric biopsy samples by polymerase chain reaction (PCR) 16S rRNA in patients with non-bleeding peptic ulcers (NBPu), bleeding peptic ulcers (BPU) and controls (NPU).

1.27, 95% CI 0.29 to 5.30, $\chi^2 = 0.14$, $P > 0.4$). Furthermore, when the BPU group was compared with the NBPu group, the association turned 'protective' (OR 0.26, 95% CI 0.02 to 1.53, $\chi^2 = 2.79$, $P < 0.10$), meaning that the greater the prevalence of *H. pylori*, the less likely the ulcer was to bleed.

Association of *H. pylori* or *cagA* gene with bleeding and non-bleeding peptic ulcer by multiple logistic regression analysis

Multivariate adjustment for age, sporadic NSAID intake, smoking and gender permitted a better estimation of the association between NBPu and *H. pylori*, from a crude (non-adjusted) OR of 5.54 (95% CI 0.98 to 31.25, $P = 0.05$) to an adjusted value of 19.54 (95% CI 1.11 to 343.97, $P = 0.04$). *cagA* gene testing replaced the explanatory role of *H. pylori* and became the most important predictor of NBPu. The association of BPU and *H. pylori* remained at a non-significant level despite adjustments for the same variables. The only variable that showed any significant association with BPU was age (OR 1.05, 95% CI 1.01 to 1.11, $P = 0.03$).

Seroprevalence of IgA and IgG antibodies

The presence of IgG antibodies against the whole-cell antigen of *H. pylori* was determined in the serum of 35 participants. No significant differences were observed among the three groups (Table 1). Moreover, IgA antibodies analysed for recombinant protein CagA showed higher frequencies in NBPu patients as compared with the BPU and NPU groups (Table 2), with a borderline statistical significance ($P = 0.06$). Also, IgG antibodies analysed for urease displayed a higher positive rate in the BPU group compared with the control

Table 2 Immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin A (IgA) antibodies against the recombinant proteins CagA and urease of *Helicobacter pylori* by enzyme-linked immunosorbent assay

Antibodies detection	NPU (n = 7)	NBPu (n = 12)	BPU (n = 17)
IgA-CagA (n) (%)	4 (57.1)	10 (83.3)	8 (47)
IgG-CagA (n) (%)	5 (71.4)	9 (75)	12 (70.6)
IgA-urease (n) (%)	3 (42.8)	8 (66.8)	13 (76.4)
IgG-urease (n) (%)	1 (14.3)	6 (50)	11 (64.7)

BPU, bleeding peptic ulcer; NBPu, non-bleeding peptic ulcer; NPU, non-peptic ulcer.

group ($P = 0.07$). The analysis of IgA antibodies for urease and IgG antibodies for CagA is also shown in Table 2, where the frequencies among the three groups are reasonably similar.

Discussion

As has been shown consistently, *H. pylori* is an important pathogenic agent for peptic ulcers. When *H. pylori* is eradicated, PUD recurrence is decreased greatly. More than 90% of duodenal ulcers are associated with *H. pylori* infection [23]. Bleeding is the most common complication of peptic ulcers and is the leading cause of hospitalization. The mortality rate from bleeding ulcers has remained largely unchanged, averaging between 6% and 10% during the last 30 years [24], even when therapeutic endoscopies have improved their evaluation parameters, such as transfusion and the need for surgery [25].

Prevalence of *H. pylori* has been claimed to be lower in bleeding peptic ulcers than in non-bleeding peptic ulcers. However, it appears that *H. pylori* eradication virtually prevents re-bleeding of peptic ulcers in most cases when the bleeding index has been controlled endoscopically [26], although the role of *H. pylori* as an important contributor to the risk of an ulcer bleeding has not been determined definitively. Lower *H. pylori* prevalence has been attributed to underestimation due to high false-negative results of the rapid urease test in the presence of blood [4].

In this study, seroprevalence of *H. pylori* was close to 90% in the population, as has been reported previously in developing countries [18,27]. However, a differential distribution of active infection in the groups (BPU, NBPu, controls) was observed. Although the BPU and control groups showed a high prevalence of *H. pylori* (65%), the highest prevalence (90%) was found in the NBPu group as confirmed by the presence of the PCR-amplified 16S rRNA gene. Results showed a similar trend when haematoxylin-eosin and Giemsa stains were used in the histopathological analysis, despite a 10–15% lower sensitivity than PCR tests. The lowest prevalence of *H. pylori* was in bleeding patients, which remained striking.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

The urease test showed poor sensitivity, particularly in BPU patients, of which only 37% were positive. This lack of sensitivity was consistent with previous studies [4,5].

Several reports have suggested that performing only one test for *H. pylori* presence, even in non-bleeding circumstances, is of poor diagnostic value, and some authors have proposed the use of at least two positive tests for reliable detection of active *H. pylori* infection [28,29]. Nevertheless, since PCR of gastric biopsies has shown high sensitivity and specificity [15,16,30], this test was used as the gold standard for this study.

These results are in line with a previous report by Lee et al. [4], who found similar *H. pylori* prevalence when using a combination of histopathology and culture techniques: 54.5% for BPU and 73% for NBPU. Furthermore, Malferteiner et al. [31] reported recently that PUD appears to have different clinical patterns depending on their association with *H. pylori*, having a higher likelihood to bleed in those patients without the infection. In addition, Tagaris et al. [6] found evidence suggesting that *H. pylori* had a protective role in bleeding, when *H. pylori* infection was correlated with severe upper-gastrointestinal haemorrhage. *H. pylori* was detected by histology and/or *Campylobacter*-Like organism test (CLOtest). The relative risk according to the prevalence of *H. pylori* calculated by Tagaris et al. was 0.11, and the *H. pylori*-negative patients had significantly more severe haemorrhage compared with the *H. pylori*-positive patients. Similar results were obtained by Cullen et al. [32]. In a recent preliminary report, Shilling et al. [33] demonstrated that *H. pylori* is not related to stress ulcer bleeding. The role of risk factors that may contribute to bleeding ulcers, such as age and NSAIDs, has been shown clearly as determinants in the natural history of PUD. In a study performed in England and Wales, Weil et al. [34] found that age (≥ 60 years) and NSAID intake are strong risk factors for ulcer bleeding. In the present study, the age of patients was an important risk factor for the development of bleeding peptic ulcers, and the occasional use (sporadic) of an NSAID in some of the patients included here may have played a key contributing role. However, the frequency of sporadic NSAID use in these patients was similar between the groups (18–27%), without any statistical significance, although no urine surveillance or platelet-aggregation studies were performed to completely rule out surreptitious NSAID ingestion.

Our study, although small, had enough subjects to identify as significant the association of *H. pylori* and its *cagA* gene with the NBPU group. Not so in the case of the bleeding patients. Given that the upper limit of the intervals for the *H. pylori* association goes from 5.2 (crude) to 7.1 (adjusted), we cannot exclude an associa-

tion. However, the magnitude of the estimated ORs would, at most, show from weak to moderate association, quite distinct from that relating *H. pylori* with peptic ulcer, which usually goes beyond 13 for the relative risk [35,36]. Thus, our findings clearly support that BPU is not related to *H. pylori* infection.

Over the past few years, *cagA* gene-producing strains, as well as vacuolating cytotoxin, have been associated with peptic ulcer, atrophic gastritis and gastric cancer, unlike other strains without these markers [37,38]. The difference in the detection rates of the *cagA* gene with the different sets of primers between *H. pylori* strains isolated from Mexican patients suggested that allelic variation in the *cagA* gene may exist, as has been reported previously [39].

The prevalence of the *cagA* gene in *H. pylori*-positive subjects was analysed according to disease group in order to identify its possible contribution to peptic ulcer complications. No difference was found between BPU and NBPU patients in which the *cagA* gene was expressed in 91% and 94% of the cases, respectively, as seen in previous studies [40], although the prevalence of *H. pylori cagA* gene-positive in NBPU remained significant when compared with BPU. *H. pylori cagA*-positive results were found predominantly in corpus biopsies, although Atherton et al. [41] showed no significant differences in the distribution of *H. pylori cagA* in antrum or corpus biopsies of dyspeptic patients.

Antibodies against *H. pylori* were found with a higher prevalence of the IgA anti-CagA antigen in the NBPU group. The data concerning antibody production against urease, mainly the IgG isotype, showed a differential distribution, with a lower prevalence in the NPU group and a higher prevalence in the BPU group. IgG antibodies against urease could have a potential diagnostic use in peptic ulcer patients (bleeding or not bleeding), separating them from other pathologies. Meanwhile, IgA antibodies against CagA could be used to differentiate NBPU patients from NPU and BPU patients.

In conclusion, this study reports the relationship between bleeding peptic ulcers and *H. pylori*. The presence of *H. pylori* was assessed by various tests, such as urease, histology, serology and *16S ribosomal RNA* and *cagA* gene amplification by PCR. It was found that non-bleeding peptic ulcers were most likely to be *H. pylori* positive, as revealed by PCR. *H. pylori* and *cagA* are unlikely to be significant risk factors for bleeding in peptic ulcer disease, although a large study to confirm these results should be performed.

Acknowledgements

Thanks to Javier Torres for antibody detection. Rosa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

93

Isabel Amieva Fernández is acknowledged for her technical support.

References

- Kurata JH, Honda GD, Frank H. Hospitalization and mortality rates for peptic ulcers: a comparison of a large health maintenance organization and United States data. *Gastroenterology* 1992; 83:1008-1016.
- Amendola R, Luna P, Fariñas R, Iannella M, Boers L, Cori R. No short-term recurrence of peptic ulcer bleeding after successful eradication of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997; 112:A58.
- Lai KC, Hui WM, Wong WM, Wong BCY, Hu WHC, Lam SK. Treatment of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer hemorrhage - a long-term randomized, controlled study. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2225-2232.
- Lee JM, Breslin NP, Fallon C, O'Morain CA. Rapid urease tests lack sensitivity in *Helicobacter pylori* diagnosis when peptic ulcer disease presents with bleeding. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:1166-1170.
- Henz J, Kohl H, Wolters S. *Helicobacter pylori*, NSAIDs and the risk of peptic ulcer bleeding: a prospective case-control study with matched pairs. *Gastroenterology* 1996; 110:A165.
- Tagaris A, Kamberoglu D, Tiriti D, Dougleroglou B, Tziis B, Lagoudakis M. *Helicobacter pylori* (HP), non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and other risk factors in upper gastrointestinal (GI) hemorrhage. *Gastroenterology* 1996; 110:A230.
- Chisari F, Marchetti M, Blaser MJ, Tummuru MKR, Cover TL, Segal ED, et al. Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA and urease in a mouse model of disease. *Infect Immun* 1995; 83:4184-4180.
- Suerbaum S, Wadstrom T. Bacterial pathogenic factors. *Curr Opin Gastroenterol* 1995; 11(suppl 1):11-15.
- López-Brea M, Alarcón T, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Curr Opin Gastroenterol* 1997; 13:13-19.
- Mégraud F. Advantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31(Suppl 216):57-62.
- Forrest JAH, Finlayson NDC, Shearman DJV. Endoscopy in gastrointestinal bleeding. *Lancet* 1974; 1:103-106.
- Price AB. The histological recognition of *Helicobacter pylori*. In: *Helicobacter pylori: techniques for clinical diagnosis and basic research*. Lee A, Mégraud F (editors). London, W.B. Saunders; 1996. pp.33-45.
- Price AB. The Sydney system: histological division. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6:209-222.
- Pitcher DC, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Let Appl Microbiol* 1989; 8:151-158.
- Sheng-Ang Ho, Hoyle JA, Lewis FA, Secker AD, Cross D, Mapstone NP, et al. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2543-2549.
- Laga AP, Godfrid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollan A, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2752-2756.
- Tummuru MKR, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 1993; 61:1799-1809.
- Torres J, Leal-Herrera Y, Pérez-Pérez GI, Gomez A, Camarero-Ponce M, Cedillo-Rivera R, et al. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis* 1998; 178: 1089-1094.
- Morales R, Castillo-Rojas G, Gonzalez G, Ponce de León S, Cravioto A, Atherton J, López-Vidal Y. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3001-3004.
- Schlesselman JJ. *Case-Control Studies: design, conduct, analysis*. New York: Oxford University Press; 1982. pp.180.
- Daly LE, Bourke GJ, Gilroy JM. *Interpretation and Uses of Medical Statistics*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1991. pp.191-198.
- Kramer MS, Feinstein AR. Clinical Biostatistics. LV. The biostatistics of concordance. *Clin Pharmacol Ther* 1981; 29:111-122.
- Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. The etiologic agent for peptic ulcer. *JAMA* 1995; 274:1064-1068.
- Loren A Laine. The long-term management of patients with bleeding ulcers: *Helicobacter pylori* eradication instead of maintenance antisecretory therapy. *Gastrointest Endosc* 1996; 41:75-79.
- Andersen IB, Bonnevie O, Jorgensen T, Sorensen TJ. Time trends for peptic ulcer disease in Denmark, 1981-1993. Analysis of hospitalization register and mortality data. *Scand J Gastroenterol* 1995; 33:280-286.
- Jespersen D, Koerner T, Schorr W, Brennonstahl M, Raasch C, Hammar CH. *Helicobacter pylori* eradication reduces the rate of re-bleeding in ulcer hemorrhage. *Gastrointest Endosc* 1998; 41:5-7.
- Marshall BJ. The 1995 Albert Leaker Medical Research Award. *Helicobacter pylori*. The etiologic agent for peptic ulcer. *JAMA* 1995; 274: 1064-1068.
- Peura DA. *Helicobacter pylori*: a diagnostic dilemma and a dilemma of diagnosis. *Gastroenterology* 1999; 109:313-315.
- Li SY, Jeng YS, Wang CK, Ko FT, Ky Lin, Liu JD, et al. Polymerase chain reaction diagnosis of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal diseases: comparison with culture and histopathological examinations. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11:285-289.
- Kim DY. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection using polymerase chain reaction in gastric biopsy specimens. *Gut* 1997; 41(S):A84.
- Maffei-thear P, Hackelsberger A, Dominguez-Muñoz JE, Illies G, Rossner A, Nilius M. Is the *Helicobacter pylori* negative bleeding duodenal ulcer a myth? *Gastroenterology* 1997; 112:A208.
- Cullen DJE, Hawkey GM, Greenwood DC, Humphreys H, Shepherd V, Logan RFA, et al. Peptic bleeding in the elderly: relative roles of *Helicobacter pylori* and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut* 1997; 41:459-462.
- Shilling D, Haide G, Jackoba R. *Helicobacter pylori* infection: a risk factor for stress ulcer bleeding in cardiovascular intensive care unit patients? A prospective evaluation in 3747 cardiovascular patients. *Gastroenterology* 2000; 118:A509, 2669.
- Wiel J, Langman MJ, Wainwright P, Lawson DH, Twinn M, Logan RFA, et al. Peptic ulcer bleeding: accessory risk factors - β -1 interactions with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut* 2000; 48:27-31.
- DeCross AJ, Marshall BJ. The role of *Helicobacter pylori* in acid-peptic disease. *Am J Surg* 1993; 306:381-392.
- Mégraud F, Lamoulet H. *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer: evidence suggesting causation. *Dig Dis Sci* 1992; 37:769-772.
- Moran AP. Pathogenic properties of *Helicobacter pylori*. *Semin J Gastroenterol* 1996; 31(Suppl 216):22-31.
- Takata T, Okada M, Shrotani T, Fujimoto S, Anzai K, Shizuta T, et al. Analysis of the expression of CagA and VacA and the vacuolating activity in 187 isolates from patients with either peptic ulcers or non-ulcer dyspepsia. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:30-34.
- Van der Ender A, Zhu Jun P, Aldert Bart, van der Hulst RWM, Feller M, Xiao SD, et al. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* populations in China and the Netherlands are distinct. *Infect Immun* 1998; 66:1822-1826.
- Jyh-Chin Y, Wang TH, Wang HJ, Kuo CH, Wang JT, Wang WC. Genetic analysis of the cytotoxin-associated gene and the vacuolating toxin gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from Taiwanese patients. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:1316-1321.
- Atherton JC, Tham KT, Peek RM, Cover TL, Blaser MJ. Denial of *Helicobacter pylori* infection in vivo as assessed by quantitative culture and histology. *J Infect Dis* 1998; 174:552-556.

94

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN