

BRUNA MARIA RÖESLER

**HELICOBACTER PYLORI EM PACIENTES COM
ÚLCERA PÉPTICA E GASTRITE CRÔNICA:**

Detecção pela Nested PCR e pela PCR e Genotipagem pelos
Genes Urease C e Urease B

CAMPINAS

2006

BRUNA MARIA RÖESLER

**HELICOBACTER PYLORI EM PACIENTES COM
ÚLCERA PÉPTICA E GASTRITE CRÔNICA:
Detecção pela Nested PCR e pela PCR e Genotipagem pelos
Genes Urease C e Urease B**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia*

ORIENTADORA: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa – FCM/UNICAMP

CAMPINAS

2006

*FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP*

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R629h

Röesler, Bruna Maria

Helicobacter pylori em pacientes com úlcera péptica e gastrite crônica: Detecção pela nested PCR e pela PCR e genotipagem pelos genes Urease C e Urease B / Bruna Maria Röesler. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Sandra Cecília Botelho Costa
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Úlcera péptica. 3. Gastrite. 4. Reação em cadeia de polimerase. I. Costa, Sandra Cecília Botelho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer and chronic gastritis : Detection by Nested PCR and by PCR and genotyping by genes Urease C and Urease B

Keywords: • *Helicobacter pylori*

- Peptic Ulcer
- Chronic Gastritis
- Nested PCR

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa
Prof. Dr. Rogério Antunes Pereira Filho
Prof. Dr. Alex Vianey Callado França

Data da defesa: 24-08-2006



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Membros:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Prof. Dr. Rogério Antunes Pereira Filho

Prof. Dr. Alex Vianey Callado França

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/08/2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ederley e Salete pelo amor, dedicação e oportunidades.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”
(Fernando Pessoa)

À minha irmã Flávia

“Lembre-se que se algum dia você precisar de ajuda, você encontrará uma mão no final do seu braço. À medida que você envelhecer, você descobrirá que tem duas mãos - uma para ajudar a si mesmo, e outra para ajudar aos outros.” (Audrey Hepburn)

À Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa, pela orientação, confiança e oportunidade...

Ao Prof. Dr. José Murilo Robilotta Zeitune, pela orientação, paciência e ensinamentos...

“Reparta o seu conhecimento. É uma forma de alcançar a imortalidade.” (Dalai Lama)

A Deus,

por estar presente em todos os dias de minha vida, me mostrar caminhos e olhar por mim. “A minha alma Te segue de perto; a Tua destra me sustenta.” (Salmo 63:8)

Aos meus pais Ederley e Salete e à minha irmã Flávia, pelo apoio em todos os momentos... pelo carinho... pelas oportunidades...

À professora e, principalmente, amiga, Ana Laura Remédio Zeni Beretta, por ter me ajudado em uma etapa tão importante da minha vida profissional.

À amiga Sandra Helena Alves Bonon, pelos ensinamentos, pela amizade e, em especial, pelo incentivo nos momentos mais difíceis.

Aos queridos amigos do Laboratório de Detecção de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia:

Daniela, pelo companheirismo, amizade, risadas e pelo auxílio com as tabelas, gráficos e demais problemas com o computador....

Telma, pela amizade, risadas, aulas às quais assistimos juntas e por me acompanhar com o *Helicobacter pylori*...

Cristiane e Juliana, pelo auxílio na coleta das amostras e ajuda em todos os momentos necessários...

Carla e Débora, pela amizade, ajuda e convivência diária...

Ana Maria, pela amizade....

Ronaldo, pelo auxílio, incentivo e companheirismo.

À minha avó Dina e às minhas tias Athélia e Gina, pela torcida e incentivos.

Aos meus tios Luiz Henrique e Ana Nilza, pelo incentivo e torcida.

A todas as pessoas da minha família e aos meus amigos que sempre incentivaram a realização deste projeto.

À minha amiga Eliane Cristina Magdalon, por estarmos sempre juntas tanto nos momentos de conquista quanto nos momentos difíceis.

Ao Sr. Hécio Hildebrandt, pela paciência de me acompanhar desde a época dos vestibulares.

À farmacêutica e estatística Ana Cristina Mazuqueli, pela amizade e pronta ajuda nos cálculos desse trabalho.

À farmacêutica Nancy Fusac Nishimura e às biólogas Natália Hifumi Hara e Elizabeth Rabelo Gonçalves, do Laboratório de Bacteriologia e Hepatologia do Gastrocentro, pela prontidão em ajudar e pelos incentivos.

À técnica administrativa do Laboratório de Anatomia Patológica do Gastrocentro, Judith Sandoval Magnussen, pela paciência e auxílio com os laudos histológicos dos pacientes.

Às secretárias do Gastrocentro, Esmeralda, Luciana e Maria Aparecida, principalmente pela eterna simpatia...

À secretária Ana Diva Correa, pela simpatia e alegria constantes, além da eficiência na ajuda de quaisquer problemas.

Aos médicos do Gastrocentro Dr. Leonardo Trevisan Monici e Dra. Cristiane Kibune Nagasako, pelo fornecimento das amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia dos pacientes incluídos no presente estudo.

À enfermeira chefe do Gastrocentro, Ana Lúcia Nunes Domingues, pelo auxílio na coleta das amostras de tecido usadas neste estudo.

Ao corpo de enfermagem do Gastrocentro, pelo trabalho imprescindível...

Aos professores da Faculdade de Farmácia do Centro Universitário Hermínio Ometto – Uniararas, pelos ensinamentos e exemplos, tornando a vontade de prosseguir na área acadêmica ainda maior.

Aos professores da Pós-Graduação em Farmacologia e da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, que contribuíram para a minha formação.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia Molecular em Doenças Transmissíveis e Fungos (FCM - Unicamp), principalmente Márcia e Rogério, e à Profa. Dra. Maria Luiza Moretti, por permitir a utilização de equipamentos nesta pesquisa.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico (SAM) do Hospital de Clínicas da Unicamp, pela disposição em ajudar.

Ao secretário do Departamento de Farmacologia da Unicamp, Wanderley, pelo auxílio. Aos secretários Roberto e Renata, da Secretaria Geral de Pós-Graduação, por todas as informações prestadas.

A todos os pacientes que participaram da elaboração deste trabalho, pessoas especiais, sem as quais esse projeto não teria razão.

Finalmente, ao Frederico, meu cãozinho, minha maior companhia durante a digitação deste trabalho...

Trabalho realizado no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com a colaboração do Serviço de Endoscopia Digestiva e Laboratórios de Anatomia Patológica e Bacteriologia do Centro de Diagnóstico de Doenças do Aparelho Digestivo (Gastrocentro) da UNICAMP.

“Os mistérios da vida estarão sob o controle das futuras gerações – dependendo da rapidez com que os segredos do DNA forem elucidados”.

(James Watson, década de 40)

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xlvi</i>
ABSTRACT	<i>li</i>
1- INTRODUÇÃO	55
1.1- Histórico	57
1.2- Genoma do <i>Helicobacter pylori</i>	58
1.3- Características microbiológicas	59
1.4- Patogênese	62
1.4.1- Considerações gerais.....	62
1.4.2- O papel da urease, dos flagelos e de outras proteínas.....	62
1.4.3- Marcadores de virulência.....	64
1.5- Epidemiologia	67
1.6- Transmissão	69
1.6.1- Dose infectante.....	69
1.6.2- Reservatório animal.....	70
1.6.3- Possíveis formas de transmissão.....	70
1.6.3.a- Transmissão pessoa a pessoa.....	70

1.6.3.b- Transmissão pela água.....	72
1.6.3.c- Transmissão por animais e insetos.....	73
1.6.3.d- Transmissão iatrogênica.....	74
1.7- Relação entre o <i>H. pylori</i> e as doenças humanas.....	75
1.7.1- Gastrites crônicas.....	76
1.7.2- Úlcera péptica.....	77
1.7.3- Câncer gástrico.....	77
1.7.4- Linfoma gástrico tipo MALT.....	78
1.7.5- Doenças extragástricas.....	79
1.8- Métodos diagnósticos.....	79
1.8.1- Métodos indiretos.....	80
1.8.1.a) Teste respiratório da uréia marcada.....	80
1.8.1.b) Sorologia.....	81
1.8.1.c) Pesquisa do antígeno nas fezes.....	81
1.8.2- Métodos diretos.....	82
1.8.2.a) Teste rápido da urease.....	82
1.8.2.b) Histologia.....	83
1.8.2.c) Cultura.....	84
1.8.2.d) Reação em cadeia da polimerase.....	84

1.9- Genotipagem.....	88
1.10- Tratamento e Profilaxia.....	89
1.11- Importância.....	91
2- OBJETIVOS.....	93
3- CASUÍSTICA.....	97
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	105
4.1- Critérios de diagnóstico.....	108
4.2- Extração de DNA de tecidos não fixados.....	108
4.3- Reação em Cadeia da Polimerase para detecção do gene da betaglobina humana para controle da reação.....	109
4.4- Detecção da bactéria <i>Helicobacter pylori</i> pela reação em cadeia da polimerase tipo nested.....	110
4.5- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase tipo nested para a região do gene Urease C.....	112
4.6- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase para a região do gene Urease B.....	113
4.7- Visualização do DNA dos fragmentos amplificados.....	114
4.8- Genotipagem para as regiões amplificadas dos genes da Urease C e da Urease B (RFLP)	115
4.9- Estatística.....	155
4.10- Normas de Biossegurança.....	116

5- RESULTADOS.....	117
5.1- Nested PCR para detecção do DNA da bactéria <i>Helicobacter pylori</i>.....	119
5.2- Nested PCR para amplificação da região do gene urease C do <i>H. pylori</i>.....	120
5.3- PCR para amplificação da região do gene urease B do <i>H. pylori</i>.....	121
5.4- Genotipagem dos fragmentos de 798 pares de bases obtidos na região do gene urease C.....	122
5.5- Genotipagem dos fragmentos de 759 pares de bases obtidos na região do gene urease B.....	129
6- DISCUSSÃO.....	137
7- CONCLUSÕES.....	145
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
9- ANEXOS.....	173
9.1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	175

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Nested PCR	Reação em Cadeia da Polimerase tipo nested
Cepa 26695	cepa do <i>H. pylori</i> (paciente com gastrite)
J99	cepa do <i>H. pylori</i> (paciente com úlcera duodenal)
HPAG1	cepa do <i>H. pylori</i> (paciente com gastrite atrófica)
mL	mililitros
mm	milímetros
M	Molar
NaCl	cloreto de sódio
Tris	tri (hidroximetil) aminometano
HCl	ácido clorídrico
SDS	dodecil sulfato de sódio
KCl	cloreto de potássio
mg/mL	miligramas/mililitros
µL	microlitros

rpm	rotações por minuto
MgCl₂	cloreto de magnésio
dntp	desoxinucleotídios trifosfato
A	adenina
T	timina
C	citossina
G	guanina
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
GCLO	gastric <i>Campylobacter</i> like organism
pH	potencial hidrogeniônico
NSAIDs	antiinflamatórios não esteroidais
PPIs	proton pump inhibitors (inibidores da bomba de prótons)
H₂RAs	antagonistas do receptor de histamina 2
IBP	inibidor da bomba de prótons
UBT	Urea Breath Test
¹³C	carbono marcado com fósforo 13
¹⁴C	carbono marcado com fósforo 14
O₂	gás oxigênio

CO₂	gás carbônico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
H & E	hematoxilina & eosina
Mb	megabases
μm	micrômetros
nm	nanômetros
pmol	picomol
μM	milimolar
<i>H. heilmannii</i>	<i>Helicobacter heilmannii</i>
KDa	Kilodaltons
H⁺	ânion hidrogênio
HLA	antígenos leucocitários humanos
<i>cagA</i>	<i>citotoxin antigen associated gene</i>
<i>Cag-PAI</i>	ilha de patogenicidade cag
<i>CagA</i>	proteína produzida pelo gene cagA
Kb	Kilobases
IL-8	interleucina 8
<i>vacA</i>	gene vacA
<i>VacA</i>	proteína produzida pelo gene vacA

s	região que codifica o sinal peptídico do gene <i>vacA</i>
M	região média do gene <i>vacA</i>
s1, s2	alelos da região s do gene <i>vacA</i>
s1a, s1b, s1c	subtipos do alelo s1 da região s do gene <i>vacA</i>
m1, m2	alelos da região média do gene <i>vacA</i>
<i>babA</i>	<i>blood group antigen adhesion gene</i>
<i>babA1, babA2</i>	alelos do gene <i>babA</i>
<i>SabA</i>	adesina com capacidade de ligação ao ácido siálico
<i>cagE</i>	gene <i>cagE</i>
<i>iceA</i>	<i>induced by contact with epithelium gene</i>
<i>iceA1, iceA2</i>	alelos do gene <i>iceA</i>
<i>picB</i>	gene homólogo das proteínas de secreção tipo III
HP NAP	gene <i>neutrophils-activating protein</i>
<i>dupA</i>	<i>duodenal ulcer promoting gene</i>
MALT	<i>Mucosa associated lymphoid tissue</i> (linfoma tipo MALT)
PCO3	primer da região da betaglobina humana
PCO4	primer da região da betaglobina humana
UreC	Região do gene <i>urease</i> – <i>urease C</i>
UreB	Região do gene <i>urease</i> – <i>urease B</i>

<i>glmM</i>	fosfoglicosamina mutase gene (urease C)
<i>Mbo I</i>	enzima purificada do <i>Moraxella bovis</i> M.
<i>Hae III</i>	enzima purificada do <i>Haemophilus aegyptius</i>
pb	pares de bases
M	marcador de peso molecular (Ladder)
C+	controle positivo
C-	controle negativo

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1- Métodos não-invasivos utilizados para o diagnóstico do <i>H. pylori</i>	86
Tabela 2- Métodos invasivos utilizados para o diagnóstico do <i>H. pylori</i>	87
Tabela 3- Esquemas preconizados no Brasil para o tratamento de adultos com infecção por <i>H. pylori</i>	90
Tabela 4- Estatística descritiva da idade dos pacientes.....	100
Tabela 5- Resultados da histopatologia dos pacientes estudados com diagnóstico endoscópico de gastrite crônica.....	101
Tabela 6- Laudos endoscópicos observados nos prontuários dos pacientes estudados com diagnóstico de úlcera.....	103
Tabela 7- Sequência de primers para gene da betaglobina humana.....	110
Tabela 8- Primers da primeira reação (PCR) para detecção do DNA do <i>Helicobacter pylori</i>	111
Tabela 9- Primers da nested PCR para detecção do DNA do <i>H. pylori</i>	112
Tabela 10- Primers da primeira reação (PCR) para urease C.....	113
Tabela 11- Primers da nested PCR para urease C.....	113
Tabela 12- Primers da PCR para urease B.....	114
Tabela 13- Resultado da detecção do DNA do <i>H. pylori</i> pela nested PCR.....	119

Tabela 14-	Resultado da genotipagem dos produtos obtidos pela nested PCR para a região do gene urease C do <i>H. pylori</i> após digestão com a enzima <i>Mbo I</i>	126
Tabela 15-	Resultado da genotipagem dos produtos obtidos pela PCR para a região do gene urease B do <i>H. pylori</i> após digestão com a enzima <i>Hae III</i>	130
Tabela 16-	Resultados obtidos para teste da urease, histologia, detecção do DNA da bactéria pela nested PCR, nested PCR para região do gene urease C e PCR para região do gene urease B nos pacientes com gastrite crônica.....	133
Tabela 17-	Resultados obtidos para teste da urease, histologia, detecção do DNA da bactéria pela nested PCR, nested PCR para região do gene urease C e PCR para região do gene urease B nos pacientes com úlcera péptica.....	135

	Pág.
Figura 1- <i>Helicobacter pylori</i>	60
Figura 2- Gram a partir de placa de Agar de <i>H. pylori</i>	61
Figura 3- Prevalência do <i>H. pylori</i> no mundo.....	68
Figura 4- Análise dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% para detecção do DNA do <i>H. pylori</i>	120
Figura 5- Análise dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% para amplificação de região do gene urease C do <i>H. pylori</i> (798 pb)	121
Figura 6- Análise dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% para amplificação da região do gene urease B do <i>H. pylori</i> (759 pb)	122
Figura 7- Padrões de digestão dos produtos da nested PCR para ureC com a enzima <i>Mbo I</i> . Genótipo prevalente para os casos de gastrite (G).....	123
Figura 8- Padrões de digestão dos produtos da nested PCR para ureC com a enzima <i>Mbo I</i> . Genótipo prevalente para os casos de úlcera péptica (E)	124
Figura 9- Padrões de digestão dos produtos da nested PCR para ureC com a enzima <i>Mbo I</i>	124
Figura 10- Padrões de digestão dos produtos da nested PCR para ureC com a enzima <i>Mbo I</i>	125

Figura 11-	Gráfico demonstrativo dos grupos de genótipos obtidos com a enzima <i>Mbo I</i> para ureC nos pacientes com gastrite.....	126
Figura 12-	Gráfico demonstrativo dos grupos de genótipos obtidos com a enzima <i>Mbo I</i> para ureC nos pacientes com úlcera péptica.....	127
Figura 13-	Padrões de digestão dos produtos da PCR para ureB com a enzima <i>Hae III</i> . Genótipo mais prevalente para gastrite e úlcera péptica (I).....	129
Figura 14-	Gráfico demonstrativo dos grupos de genótipos obtidos com a enzima <i>Hae III</i> para ureB nos pacientes com gastrite.....	130
Figura 15-	Gráfico demonstrativo dos grupos de genótipos obtidos com a enzima <i>Hae III</i> para ureB nos pacientes com úlcera péptica.....	131

	<i>Pág.</i>
Quadro 1- Padrões de digestão dos produtos obtidos pela nested PCR para a região do gene urease C com a enzima <i>Mbo I</i>	128
Quadro 2- Padrões de digestão dos produtos obtidos pela PCR para a região do gene urease B com a enzima <i>Hae III</i>	132



RESUMO

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria gram-negativa que está estritamente relacionada com o desenvolvimento de doenças gástricas, inclusive malignas, sendo classificada como carcinógeno do grupo I pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer. Apesar de grande parte da população mundial estar contaminada pela bactéria, a maioria dos indivíduos permanece assintomática.

Muitas abordagens são sugeridas para diferenciar os isolados de *H. pylori* e diversas técnicas de biologia molecular têm sido aplicadas para caracterizar as amostras clínicas de diferentes pacientes. A análise de restrição (RFLP) usada em conjunto com a PCR tem sido amplamente utilizada para a tipagem de isolados clínicos, utilizando vários genes do genoma do *H. pylori* como alvos para esse método.

Padrões de eletroforese da nested PCR e da PCR para as regiões dos genes urease C e urease B do *H. pylori* foram obtidos com enzimas de restrição e comparados entre pacientes com úlcera péptica e gastrite crônica. Os produtos da nested PCR para urease C foram digeridos com a enzima *Mbo I* e os produtos da PCR para urease B com a enzima *Hae III*, sendo os fragmentos obtidos analisados por eletroforese em gel de agarose. Foram encontrados 7 padrões de genotipagem para urease B e 17 padrões para urease C.

O grupo prevalente para gastrite crônica obtido com essa última genotipagem foi o denominado grupo ureC MboI G, com fragmentos de 110, 120, 250 e 310 pares de bases, ocorrendo em 13 pacientes (15,7% dos casos). Em relação aos casos de úlcera péptica, o grupo de genotipagem mais prevalente foi o denominado ureC MboI E, com 110, 180 e 500 pares de bases, ocorrendo em 11 pacientes (24,4% do total de casos).

O grupo prevalente obtido com a genotipagem para urease B foi o denominado ureB I, com um fragmento único de 750 pares de bases. Esse grupo foi o prevalente tanto para os casos de úlcera péptica (27), com 60,0%, quanto para os de gastrite crônica (53), com 63,9%. Não foram observadas diferenças significativas entre os padrões encontrados para ambas as doenças.

A nested PCR para detecção prévia do DNA do *H. pylori* também foi realizada, obtendo-se 100% de concordância.

Os métodos de tipagem dos produtos obtidos por nested PCR e PCR proporcionam um esquema funcional e de grande reprodutibilidade para estudos epidemiológicos e de caracterização de cepas.



ABSTRACT

Helicobacter pylori is a gram-negative bacterium that has been implicated as a major human gastric pathogen responsible for gastritis and peptic ulcer disease. It has been classified as a group I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer and is regarded as a primary factor for gastric cancer. A significant proportion of the world population is infected with *H. pylori*, even though most infections are asymptomatic.

To isolate *H. pylori*, many approaches have been presented and several molecular techniques have been applied to separate clinical isolates from different patients. PCR-RFLP analysis has been widely developed for the typing of clinical isolates, with several genes within *H. pylori* having been targeted by this method.

Eletroforesis patterns of nested PCR and PCR to urease C and urease B gene regions of *H. pylori* were obtained by restriction fragment length polymorphism and compared among patients with peptic ulcer and chronic gastritis. Nested PCR products for urease C were digested with *MboI* enzyme and PCR products for urease B with *Hae III* enzyme, and the obtained fragments were analyzed by eletroforesis in agarosis gel. We have encountered 7 genotyping patterns for urease B and 17 patterns for urease C.

The prevalent group for chronic gastritis which was obtained with this last genotyping was named ureC *MboI* G group, with fragments of 110, 120, 250 and 310 base pairs, occurring in 13 patients (15,7% of the cases). Regarding the peptic ulcer cases, the most prevalent genotyping group was named ureC *MboI* E group, with 110, 180 and 500 base pairs, occurring in 11 patients (24,4% of the cases).

The prevalent group obtained with the genotyping for urease B was named ureB I, with only one fragment of 750 base pairs. This group was the prevalent one both in peptic ulcer cases (27) with 60,0%, and in chronic gastritis case (53), with 63,9%. We haven't found meaningful differences among the encountered patterns for both diseases.

Nested PCR for previous detection of *H. pylori* DNA has also been performed, and we have obtained 100% of concordance.

The typing methods of the products obtained by nested PCR and PCR show a functional scheme and of great reproduction for epidemiologic studies and of *H. pylori* strains characterization.



1- INTRODUÇÃO

O isolamento da bactéria *Helicobacter pylori* em 1983 pelos pesquisadores Barry Marshall e Robin Warren (Marshall e Warren, 1983) foi o passo introdutório de uma nova era da microbiologia gástrica. Embora organismos espiralados tenham sido observados na camada de muco gástrico no século XIX, o isolamento do *Helicobacter pylori* e o crescente interesse no conhecimento da patogênese de doenças gastroduodenais, conduziram a importantes modificações no tratamento dessas doenças (Dunn *et al.*, 1997, Kodaira *et al.*, 2002).

1.1- Histórico

Um dos mais importantes avanços da gastroenterologia foi, indubitavelmente, a descoberta, em 1983, por Warren e Marshall, da bactéria *Helicobacter pylori*, que já vinha sendo observada por Warren, desde 1979, como uma bactéria curva em amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia e submetidas a exame histológico (Goodwin *et al.*, 1987; Dunn *et al.*, 1997; Blaser, 1993). Warren descobriu que organismos similares tinham sido descritos por patologistas europeus no século XIX, mas, por nunca terem sido isolados, foram ignorados e esquecidos por várias gerações de pesquisadores (Dunn *et al.*, 1997).

A princípio, os microorganismos isolados foram classificados como pertencentes ao gênero *Campylobacter*, gênero de bactérias gram-negativas em forma de vírgula, oxidase e catalase positivas, que se locomovem por meio de um flagelo polar. Assim, foram primeiramente denominados “gastric *Campylobacter* like organism” (GCLO), recebendo, depois, as denominações *Campylobacter pyloridis*, *Campylobacter pyloricus* e *Campylobacter pylori* (Murray *et al.*, 1998).

Finalmente, a partir de 1989, o microorganismo recebeu a denominação *Helicobacter pylori* (Goodwin *et al.*, 1989; Murray *et al.*, 1998), sendo que foram a análise da sequência de ácidos nucleicos e os estudos ultraestruturais da bactéria que permitiram sua diferenciação do gênero anteriormente denominado *Campylobacter* (bastão curvado), para o novo gênero, denominado *Helicobacter* (forma helicoidal). A espécie foi denominada *pylori* pelo fato de a bactéria ser mais comumente encontrada na mucosa do antro gástrico, próxima ao piloro (Goodwin *et al.*, 1989).

O isolamento do *H. pylori* permitiu que tivessem início investigações sobre a atuação desse patógeno no organismo humano, relacionando-o com o desenvolvimento da gastrite e das úlceras gástricas e duodenais, além de relacioná-lo ao surgimento da forma mais comum de câncer gástrico – o adenocarcinoma (Sullivan *et al.*, 1990; Parsonnet *et al.*, 1991; Dev *et al.*, 1998; Kodaira *et al.*, 2002).

A importância da descoberta da bactéria *Helicobacter pylori* foi tão grande que esse fato rendeu a seus pesquisadores – Barry Marshall e Robin Warren – o Prêmio Nobel de Medicina do ano de 2005.

1.2- Genoma do *Helicobacter pylori*

A bactéria *H. pylori* (cepa 26695) possui um genoma circular composto por 1.667.876 pares de bases (1,7 Mb), considerado pequeno se comparado com o de bactérias que podem viver em uma grande variedade de habitats, como a *Escherichia coli* (4,6 Mb) e a *Pseudomonas aeruginosa* (5,8 Mb) (Tomb *et al.*, 1997; Lee, 1998).

O *H. pylori* é um patógeno notavelmente bem adaptado. Persiste indefinidamente no hospedeiro, no ambiente do estômago, apesar da resposta imunológica humoral e celular formada contra ele. Características do genoma são compatíveis com a adaptação do organismo a um nicho ecológico muito especializado (Lee, 1998).

O estudo do genoma do *H. pylori* mostrou a evidência de que ele apresenta um número de mecanismos de variação antigênica que ocorrem em outros patógenos de mucosa, como as espécies de *Neisserias* (Lee, 1998). A presença de regiões hipervariáveis em genes codificantes para estruturas de superfície permite à bactéria evadir-se de respostas imunológicas pela alteração de seus antígenos de superfície (Tomb *et al.*, 1997). Também foram identificados no genoma vários genes codificadores para o metabolismo do ferro, indicando que deve haver uma regra crucial do uso do ferro na sobrevivência do *H. pylori* no estômago humano (Tomb *et al.* 1997; Lee, 1998).

Enfatizando seu significado nas doenças infecciosas globais, o *Helicobacter pylori* tem sido um importante alvo no estudo do genoma bacteriano como a primeira bactéria patogênica que teve seu genoma completamente seqüenciado em duas cepas diferentes: a cepa 26695, isolada de um paciente com gastrite no Reino Unido (Tomb *et al.*, 1997), e a cepa J99, isolada de um paciente com úlcera duodenal, nos Estados Unidos (Alm *et al.*, 1999). Mais recentemente, uma terceira cepa, denominada HPAG1, teve seu genoma seqüenciado, tendo sido obtida de um paciente sueco, com gastrite atrófica crônica (Oh *et al.*, 2006).

1.3- Características microbiológicas do *H. pylori*

O gênero *Helicobacter* foi definido por estudos de composição do RNA ribossômico (Romaniuk *et al.*, 1987) e de seqüenciamento e hibridação do DNA da bactéria (Goodwin *et al.*, 1989). Este gênero, juntamente com outros (*Campylobacter*, *Arcobacter* e *Wolinella*), constitui a superfamília VI de bactérias gram-negativas definida por Vandamme e col. (1991).

O *Helicobacter pylori* é um microorganismo de formato espiralado, microaerófilo e gram-negativo, que apresenta contornos esféricos em amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia (Goodwin *et al.*, 1996). Nestas, o *H. pylori* mede cerca de 2,5 a 5,0 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de largura, podendo apresentar um número de quatro a seis flagelos, essenciais para a motilidade bacteriana. Cada flagelo possui aproximadamente 30 nm de comprimento e 2,5 nm de espessura (Goodwin *et al.*, 1990; Geis *et al.*, 1993). (Figura 1).

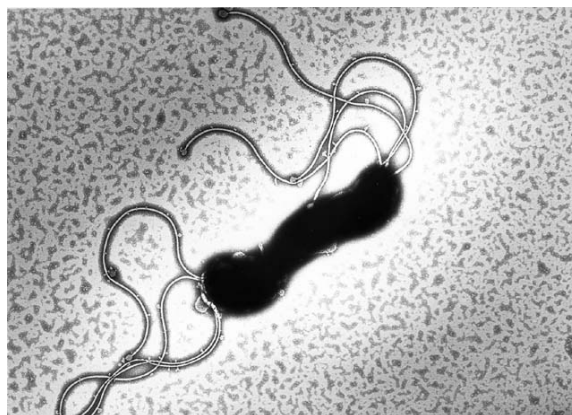


Figura 1 - *Helicobacter pylori* (fonte:www.helicobacter.com)

Quando cultivada em meio sólido, a bactéria assume o formato de bastão, sendo as formas espiraladas pouco freqüentes e até mesmo ausentes (Goodwin *et al.*, 1990). (Figura 2). Após cultura prolongada em meios sólidos ou líquidos, formas cocóides são tipicamente predominantes; porém, apesar de essas formas serem metabolicamente ativas, são dificilmente cultiváveis “*in vitro*” (Bode *et al.*, 1993; Nilus *et al.*, 1993). Um meio de cultura definitivo não é ainda disponível para o *H. pylori* (Hachem *et al.*, 1995; Henriksen *et al.*, 1995).

O *H. pylori* apresenta positividade para as reações de catalase e oxidase e negatividade para reações de indol, nitrato e hipurato. Além disso, possui alta atividade de urease (Goodwin *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 1998).

O microorganismo cresce bem em condições de microaerofilia, ou seja, com concentrações de O₂ que variam de 2 a 8% (Goodwin *et al.*, 1990; Hudson *et al.*, 1991). O crescimento em meios de cultura líquidos ocorre sob agitação e incubação em atmosfera rica em CO₂ (Coudron *et al.*, 1995). A temperatura ótima para o crescimento do *H. pylori* é a de 37° C (Goodwin *et al.*, 1990).

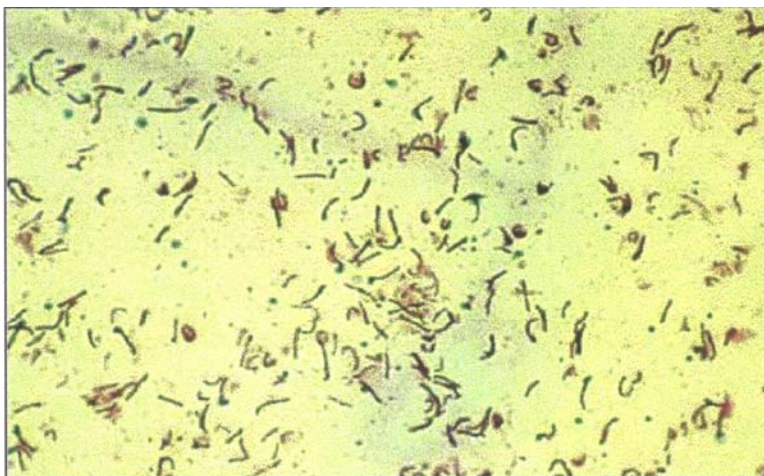


Figura 2 – Gram a partir de placa de agar de *H. pylori*.

(fonte: www.helicobacterspain.com)

O gênero *Helicobacter* é composto atualmente de, no mínimo, 27 espécies que compartilham propriedades comuns, especialmente aquelas relacionadas com a vida no estômago, onde podem localizar-se no fundo e no corpo, sendo principalmente no antro que as bactérias são encontradas em maior densidade (Blaser *et al.*, 2001). O *H. pylori* pode distribuir-se de maneira focal, segmentar ou difusa ao longo da mucosa gástrica (Warren *et al.*, 1984), localizando-se no interior ou sob a camada de muco que recobre o epitélio da superfície ou das fovéolas, em íntimo contato com a membrana luminal das células epiteliais que revestem a mucosa gástrica (Ladeira *et al.*, 2003).

O *H. pylori* possui uma capacidade excepcional de aderência (Thomsen *et al.*, 1990). É adaptado para colonizar somente a mucosa gástrica, sendo observado raramente em áreas de metaplasia intestinal, o que representa um fator de grande importância na patogênese da úlcera duodenal. (Marshall, 1985; Queiroz *et al.*, 1993; Ladeira *et al.*, 2003).

1.4- Patogênese da infecção pelo *H. pylori*

1.4.1- Considerações gerais

Assim como em muitas outras doenças infecciosas, apenas uma determinada fração de pessoas infectadas pelo *Helicobacter pylori* desenvolve os sinais clínicos da doença (Figueiredo *et al.*, 2005). Portanto, da mesma forma como ocorre na maioria das relações parasita-hospedeiro, na infecção pelo *H. pylori* devem ser considerados, além do fator etiológico (diversidade da sequência do DNA, ou seja, polimorfismo bacteriano, comprovadamente acentuado nessa bactéria), os componentes constitucionais do hospedeiro (características genéticas e imunológicas) e a inserção ambiental (Blaser e Berger, 2001). Além disso, os fatores de virulência bacterianos parecem ditar importantes regras em relação ao desenvolvimento e à gravidade das doenças gastroduodenais (Figueiredo *et al.*, 2005). Dentre esses fatores estão a produção de urease, a mobilidade permitida pelos flagelos, as adesinas, a citotoxina vacuolizante VacA e a proteína CagA (Kist *et al.*, 2005).

Portanto, o resultado clínico da infecção pelo *H. pylori* é determinado pela complexa interação entre fatores do hospedeiro e da bactéria.

1.4.2- O papel da urease, dos flagelos e de outras proteínas

A resistência ao ácido clorídrico é de vital importância na patogênese do *H. pylori*, visto que, sem este atributo biológico, a bactéria não teria condições de colonizar a mucosa gástrica.

A enzima urease, que é uma proteína de alto peso molecular (500 a 600 KDa), atua promovendo a hidrólise da uréia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando à produção de amônia (Weeks *et al.*, 2001). A urease compreende 6% do total de proteínas sintetizadas pela bactéria, o que representa grande investimento energético motivado pela sua ação essencial como fator de colonização (Jenks *et al.*, 2000).

A maior parte da urease sintetizada pela bactéria situa-se em seu citoplasma. A produção de amônia depende da entrada de uréia na bactéria, que é controlada por uma proteína de membrana sensível ao pH. Esta proteína é codificada por um gene da família urease, conhecido como ure I (Walsh, 2000; Weeks *et al.*, 2001). Cepas do *H. pylori* com deleção da família urease não sobrevivem em pH ácido. Weeks e col. (2000) demonstraram que a entrada de uréia na bactéria é acelerada em pH 5,0 e diminuída em pH 7,0. A entrada de uréia é altamente específica, não sendo facilmente saturada, e independe de temperatura e energia (Walsh, 2000; Weeks *et al.*, 2001).

A bactéria, na fase precoce de colonização, necessita atravessar a camada de muco que protege o epitélio gástrico. Tal camada é formada por um gel viscoelástico que confere proteção química e mecânica ao revestimento epitelial, inclusive contra bactérias (Jenks *et al.*, 2000). Lipases e proteases sintetizadas degradam a camada de muco, facilitando a progressão do microorganismo, que, além disso, move-se facilmente devido à morfologia em espiral e aos flagelos, encontrados em quantidade de quatro a seis (Hazell *et al.*, 1986), atravessando a camada de muco e estabelecendo íntimo contato com as células epiteliais de revestimento. Outras enzimas, como a superóxido dismutase, catalase e arginase, conferem proteção contra a atividade lítica de macrófagos e neutrófilos, impedindo uma resposta eficaz do hospedeiro (Hazell *et al.*, 1991) e permitindo, conseqüentemente, a sobrevivência da bactéria na mucosa inflamada. Outra enzima produzida pela bactéria é a mucinase, que tem atividade endopeptidásica e a capacidade de degradar a mucina gástrica, mecanismo pelo qual se favorece a produção da doença (Fernandez, 2004).

Finalmente, a adesão da bactéria ao epitélio também é de grande importância para a colonização do meio, o que é permitido através da produção de adesinas. Algumas proteínas de membrana externa têm sido reconhecidas com essa função, dentre elas, a proteína BabA, codificada pelo gene babA, que parece permitir a adesão do *H. pylori* ao antígeno do grupo sanguíneo Lewis, presente nas células gástricas. Outra destas adesinas é a proteína SabA, com capacidade de ligação com o ácido siálico, aderindo-se às células inflamadas, mas não à mucosa íntegra ou aos antígenos de Lewis (Barresi *et al.*, 2001; Fernandez *et al.*, 2004).

1.4.3- Marcadores de virulência da bactéria *H. pylori*

As cepas de *H. pylori* são altamente diversas quanto ao nível genético (Blaser, 1996; Logan *et al.*, 1996). A diversidade é a característica fundamental da bactéria e reflete mutações de ponto, rearranjos genômicos, genes não-conservados, variações alélicas em genes conservados, mutações no DNA incluindo inserção de seqüências e plasmídios. Há evidências de que a diversidade genotípica e/ou fenotípica apresente significado clínico (Dunn *et al.*, 1997).

1.4.3.a) Gene *cagA*

O *Citotoxin Antigen Associated* (*cagA*) foi o primeiro gene cepa-específico identificado no *H. pylori*, sendo fortemente associado ao risco de desenvolvimento de câncer gástrico (Peek *et al.*, 1999). As cepas *cagA* positivas tendem a ser mais virulentas e induzem níveis mais altos de expressão de citocinas, tais como as interleucinas 1b e 8 (Blaser *et al.*, 2001). Estudos como o realizado por Parsonnet e col. (1997) mostraram que pacientes infectados por cepas que expressam CagA têm probabilidade três vezes maior de desenvolver câncer gástrico do que aqueles infectados por cepas *cagA* negativas.

O gene *cagA* é considerado marcador da ilha de patogenicidade *cag* (*cag*-PAI), que possui de 35 a 40 Kb e comporta 31 genes (Blaser *et al.*, 2001), sendo encontrado em 60% das cepas ocidentais. A ilha *cag*-PAI é um componente do genoma do *H. pylori* que contém genes homólogos aos de outras bactérias que codificam componentes do sistema de secreção do tipo IV, que serve para injetar moléculas efetoras da bactéria na célula hospedeira, permitindo que a bactéria module vias do metabolismo dessa célula, incluindo a produção de proto-oncogenes (Covacci *et al.*, 1999). Entre estes genes homólogos aos de outras bactérias encontra-se o denominado pic B, um forte homólogo das proteínas de secreção tipo III, que são necessárias para induzir as células gástricas epiteliais a secretarem IL-8 (Censini *et al.*, 1996; Tummuru *et al.*, 1995).

Assim, a detecção específica da infecção por uma cepa *cagA* positiva está se tornando clinicamente relevante e pode ser realizada por meio da reação em cadeia da polimerase, técnica extremamente precisa para avaliar se um paciente está contaminado por uma cepa de *H. pylori* *cagA* positiva (Dunn *et al.*, 1997).

1.4.3.b) Gene *vacA*

O gene *vacA* é responsável pela produção da chamada citotoxina vacuolizante (VacA) e é um importante fator de virulência do *H. pylori* por induzir a vacuolização citoplasmática em células eucariontes.

Este gene está presente em todas as cepas do *H. pylori* e compreende duas partes variáveis, que são denominadas *s* e *m*. A região *s* codifica o sinal peptídico e está localizada no final da cadeia 5', possuindo dois alelos, *s1* e *s2*, sendo que para o alelo *s1* existem três subtipos: *s1a*, *s1b* e *s1c*; a região média (*m*) possui os alelos *m1* e *m2* (Atherton *et al.*, 1995; Dunn *et al.*, 1997). A combinação em mosaico dos alelos da região *s* com os alelos da região *m* determina a produção de citotoxinas, responsáveis pelo grau de virulência da bactéria. As cepas portadoras do genótipo *vacA s1/m1* produzem grande quantidade de toxina, enquanto as cepas *s1/m2* produzem quantidade moderada, e as cepas *s2/m2*, pouca ou nenhuma toxina. As cepas *vacA* do tipo *s1a* parecem ser mais patogênicas que as *s1b*, *s1c* ou *s2*, sendo mais relacionadas à úlcera péptica. As cepas do tipo *m1* estão associadas a maior risco de danos às células epiteliais do que as do tipo *m2* (Atherton *et al.*, 1999; Van-Doorn *et al.*, 1998).

A colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori* requer um complexo processo adaptativo. O fator-chave, que permite à bactéria sobreviver à acidez gástrica e atravessar o lúmen do estômago, é a enzima urease, que converte a uréia em amônia e bicarbonato (Tombola *et al.*, 2001). Para isso, é necessária a produção da citotoxina VacA, que induz a formação de canais seletivos de ânions nas células epiteliais, levando à exsudação de uréia para a luz da mucosa gástrica. A VacA é considerada importante fator de virulência, visto que contribui para a produção de alcalóides pela urease, que podem induzir danos no DNA (Debellis *et al.*, 2001).

1.4.3.c) Gene *babA*

O fator de aderência *babA* - *blood group antigen adhesin* - foi descoberto recentemente e pode exercer um importante papel de patogenicidade, ao permitir o contato entre a bactéria e o epitélio e ao permitir a facilitação da liberação de fatores de virulência como CagA e VacA.

O gene *babA* possui dois alelos distintos: *babA1* e *babA2*. Gerhard e col. (1999) demonstraram uma possível associação entre o alelo *babA2* e a presença de úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico.

1.4.3.d) Gene *cagE*

Assim como o gene *cagA*, o gene *cagE* também pertence à ilha de patogenicidade *cag* (*cag*-PAI). Estudos têm indicado que ele seja responsável pelo aumento da produção de IL-8 (Queiroz *et al.*, 1998), já que o gene *cagA* parece não atuar diretamente sobre essa produção, hipótese comprovada pelo fato de que cepas *cagA* negativas também induzem a produção de IL-8 (Naito *et al.*, 2002).

1.4.3.e) Gene *iceA*

O gene *iceA* – *induced by contact with epithelium* – apresenta dois alelos: *iceA1* e *iceA2*. O alelo *iceA1* apresenta forte homologia com a endonuclease de restrição do tipo II da *Neisseria lactamica*. Sua expressão é regulada pelo contato do *H. pylori* com as células epiteliais da mucosa gástrica e está relacionada à ocorrência de úlcera péptica e câncer gástrico (Peek *et al.*, 1999).

1.4.3.f) Gene HP-NAP

A gastrite induzida pelo *H. pylori* é caracterizada por infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos. A intensidade da inflamação correlaciona-se com a gravidade dos danos induzidos à mucosa e ao DNA (Ladeira *et al.*, 2003). Evans *et al.* (1995) descreveram o gene *neutrophils-activating protein* (HP-NAP) do *H. pylori* e relacionaram sua expressão ao potencial de indução de inflamação, mesmo em cepas *cagA* negativas. O produto do gene HP-NAP induz aderência de neutrófilos às células endoteliais e estimula a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos neutrófilos (Satin *et al.*, 2000).

1.4.3.g) Gene *dupA*

Gene localizado na chamada região de plasticidade (*plasticity region*) do genoma do *H. pylori*. Estudos indicam que este gene, denominado *duodenal ulcer promoting gene* parece estar associado a um risco aumentado do desenvolvimento de úlcera duodenal, mas diminuído para o surgimento de gastrite atrófica e câncer (Lu *et al.*, 2005).

1.5- Epidemiologia do *H. pylori*

O *H. pylori* é uma bactéria de distribuição universal que acomete mais da metade da população mundial, sendo considerada um importante problema de saúde pública. A infecção pelo *H. pylori* é adquirida principalmente na infância (Parente *et al.*, 2003) e se caracteriza pela cronicidade, fato que predispõe ao desenvolvimento de afecções, como carcinoma gástrico e úlcera péptica em adultos. Sua prevalência é significativamente maior nos países em desenvolvimento, em todas as faixas etárias (Kodaira *et al.*, 2002).

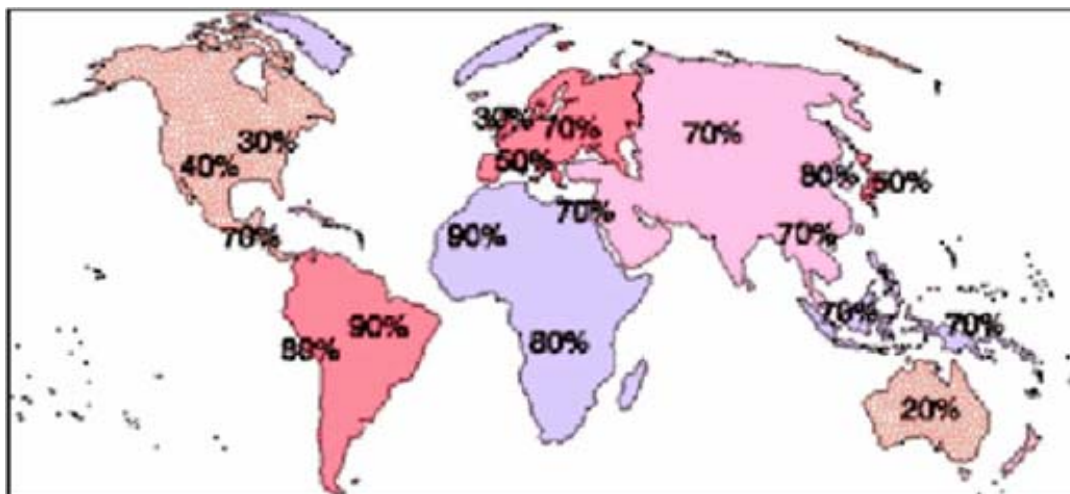


Figura 3 – Prevalência do *H. pylori* no mundo. (Fonte: <http://www.helico.com/>)

A prevalência do *H. pylori* varia de acordo com uma série de fatores, dentre os quais área geográfica, idade, raça e fatores sócio-econômicos. (Figura 3). Estudos epidemiológicos nas diferentes regiões geográficas são baseados em estudos de soroprevalência, já que é praticamente impossível identificar quando a contaminação ocorre (Brown, 2000).

A velocidade de contaminação pelo *H. pylori* parece ser mais rápida nos países em desenvolvimento do que nos países desenvolvidos (Pounder, 1995), além de haver diversas evidências de que a contaminação ocorra na primeira infância. A contaminação primária em adultos, ou a reinfecção após uma erradicação bem sucedida, também ocorre, mas é menos comum, com uma incidência anual que varia de 0,3 a 0,7% nos países desenvolvidos e de 6 a 14% nos países em desenvolvimento (Logan *et al.*, 2001).

As variações de contaminação pelo *H. pylori* referentes à raça / etnia e à nacionalidade, parecem refletir diferenças em fatores sociais e/ou de higiene ou mesmo ao uso descontrolado de antibióticos usados comumente para o tratamento de outras infecções, especialmente durante a infância. Essa variabilidade pode também ser explicada pelas diferenças de predisposição étnicas ou genéticas à infecções (Brown, 2000).

Dentre os fatores adicionais que podem estar associados à alta prevalência do *H. pylori* encontrada na população mundial, estão o fumo, o consumo de álcool, a dieta, exposições ocupacionais, práticas de higiene, densidade populacional, fatores sociais e histórico familiar de doenças gástricas (Brown, 2000).

Com relação à idade, estudos mostraram que o período de maior aquisição da infecção pelo *H. pylori* é na infância, particularmente nos cinco primeiros anos de vida. Quanto ao gênero, a infecção pela bactéria mostrou ser igual tanto em homens quanto em mulheres (Kodaira *et al.*, 2002).

Além disso, as descrições de surtos de infecção pelo *H. pylori* observados em famílias, causados por cepas geneticamente idênticas, confirmam o alto risco de infecção em pessoas que vivem agrupadas. Fenômeno semelhante pode ser observado em instituições, populações de submarino e militares em combate (Kodaira *et al.*, 2002).

1.6- Transmissão do *H. pylori*

1.6.1- Dose infectante

A dose infectante para aquisição natural da doença é desconhecida. Marshall e col. (1985), descreveram a infecção após ingestão voluntária de caldo de cultura pura contendo 10^9 organismos. O segundo relato de ingestão voluntária com sucesso foi descrito por Morris e col. (1987) empregando dose de 3×10^5 organismos. Esta é a dose infectante mínima relatada até hoje em adultos (Kodaira *et al.*, 2002).

Porém, a possibilidade de ocorrência de infecção pelo *H. pylori* pós-procedimento endoscópico sugere que uma dose do agente muito menor do que a descrita por Morris e col. (1987) possa ser capaz de estabelecer a infecção.

1.6.2- Reservatório animal

O ser humano é praticamente o único reservatório natural do *H. pylori* (Fox, 1995; Mendall *et al.*, 1995). Entretanto, recentes estudos demonstraram a colonização da bactéria em gatos domésticos, sugerindo que estes animais possam servir como reservatórios e vetores para o agente (Handt *et al.*, 1994). Além disso, outros autores sugerem que o *H. pylori* também possa ser encontrado em primatas e suínos (Fox *et al.*, 1995; Murray *et al.*, 1998). Grubel e col. (1997) também sugeriram como fonte de transmissão as moscas domésticas.

1.6.3- Possíveis Formas de Transmissão

O mecanismo exato de transmissão do *H. pylori* é desconhecido. O único fato universalmente aceito é que a bactéria só consegue alcançar a mucosa gástrica pela boca, pois se trata de um microrganismo não invasivo (Cave, 1997).

O organismo é frágil em condições laboratoriais, sugerindo limitada viabilidade fora do hospedeiro (Kodaira *et al.*, 2002).

As altas taxas de prevalência em indivíduos que vivem em condições de aglomeração humana sugerem que a transmissão pessoa-pessoa seja um mecanismo importante na transmissão do agente (Rothenbacher *et al.*, 1998). Entretanto, ainda não é possível determinar se a principal via de transmissão é oral-oral ou fecal-oral. É provável que ambas atuem simultaneamente em níveis populacionais.

1.6.3.a)- Transmissão pessoa a pessoa

1.6.3.a.1) Via oral-oral

Muitos pesquisadores propuseram a hipótese de que a via oral-oral de transmissão do *H. pylori* é a mais comum, especialmente nos países desenvolvidos. Uma prevalência elevada da bactéria entre indivíduos de uma mesma unidade familiar e entre indivíduos institucionalizados dá suporte a essa forma de transmissão (Brown, 2000).

A cavidade oral tem sido proposta como reservatório de infecção e reinfecção pelo *H. pylori*, pois a regurgitação do suco gástrico pode contaminar a boca, predispondo a colonização por essa bactéria por tempo não determinado (Desai *et al.*, 1991). Entretanto, não está claro se o *H. pylori* é um habitante constante ou intermitente da cavidade oral (Nguyen *et al.*, 1995; Madinier *et al.*, 1997). As mais prováveis fontes de infecção oral incluem a saliva, a placa dental, o conteúdo do refluxo gástrico e o vômito (Brown, 2000).

Recentes estudos realizados por diversos pesquisadores demonstraram a detecção do *H. pylori* em amostras de saliva em indivíduos sabidamente portadores da bactéria com o uso de técnicas de PCR (Leung *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996; Shimada *et al.*, 1994; Mapstone *et al.*, 1993).

Ferguson e col. (1993), Pytko-Polonczyk e col. (1996) e Parsonnet e col. (1999) tiveram sucesso no isolamento da bactéria da saliva. Porém, muitos outros pesquisadores não obtiveram esses mesmos resultados (Namavar *et al.*, 1995; Bhatia *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 1999; Oshono *et al.*, 1998).

Evidências primárias de que o *H. pylori* poderia ser transmitido pela saliva foram provenientes de estudos realizados por Albenque e col. (1990) e Mégraud (1995), que encontraram um risco elevado entre a contaminação pelo *H. pylori* e a ingestão, por crianças, de alimentos previamente mastigados pelas mães em países da África (como em Burkina Faso). O fato de as mães assoprarem o alimento antes de oferecê-lo aos filhos também parece representar papel significativo na transmissão do *H. pylori* para as crianças.

Goodman e col. (1996), na Colômbia, detectaram maior frequência da infecção entre indivíduos que bebem em copos previamente utilizados por outras pessoas e não lavados. Mecanismos de transmissão similares ocorrem na China, onde as pessoas têm o hábito de se alimentar no mesmo recipiente, favorecendo a transmissão do *H. pylori* por talheres (*chopsticks*) contaminados, e na Gâmbia, onde as famílias também fazem suas refeições usando igelas comuns, alimentando-se com as próprias mãos (Brown, 2000).

Entre outros exemplos, em Bangladesh, Clemens e col. (1996), observaram maior incidência da infecção pelo *H. pylori* em crianças hindus em relação às muçulmanas, considerando-se que esse fato poderia ocorrer devido ao hábito de as mães envolverem os mamilos com saliva antes do ato de amamentação.

Finalmente, Schutze e col. (1995) descreveram casos de pacientes reinfectados com cepas idênticas às de suas esposas assintomáticas, sugerindo que infecção e reinfecção podem acontecer por disseminação pessoa-pessoa.

1.6.3.a.2) Via fecal-oral

O DNA do *H. pylori* tem sido detectado nas fezes de indivíduos infectados (Namavar *et al.*, 1995; Shimada *et al.*, 1994; Gramley *et al.*, 1999). O isolamento do *H. pylori* por cultura fecal foi realizado por diversos pesquisadores em todo o mundo (Namavar *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 1994). Contudo, o isolamento da bactéria das fezes tem sido problemático para as pesquisas devido à necessidade de serem utilizadas fezes não armazenadas por longos períodos para a obtenção de melhores resultados (Brown, 2000).

1.6.3. b)- Transmissão pela água

Informações sobre a transmissão do *H. pylori* pela água têm sido fornecidas por estudos epidemiológicos realizados na Colômbia, nas áreas rurais da China e no Peru (Zhang *et al.*, 1996; Goodman *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 1991). O achado de amostras de água potável e de amostras obtidas de estações de tratamento positivas para *H. pylori* através de PCR no Peru e no Japão sustenta que a transmissão pela água deve ser importante, especialmente em áreas do mundo que apresentam altas taxas de infecção e menor qualidade no tratamento da água para consumo (Brown, 2000).

Westblom e col. (1993) detectaram a presença de *H. pylori* por PCR em água de esgoto tratada, na cidade de Lima, Peru. Hultner e col. (1996), em estudo realizado na mesma cidade, e Goodman e col. (1996), em Aldena, Colômbia, identificaram, por meio de PCR, o microrganismo na água consumida para beber.

Sasaki e col. (1999) constataram a presença de *H. pylori* por PCR em vários elementos presentes na natureza (água potável, de rios e de lagos, terra do solo, moscas e estrume de vaca), em uma região do Japão onde a incidência da infecção pelo *H. pylori* é elevada. Entretanto, apesar das evidências, ainda é necessário provar a viabilidade desse organismo na natureza (Sullivan *et al.*, 1990; West *et al.*, 1992).

Os estudos epidemiológicos realizados por Klein e col. (1990; 1991), em Lima, verificaram que crianças que consomem água fornecida por rede municipal apresentam risco três vezes maior de contrair a infecção pelo *H. pylori* do que aquelas cujas residências são supridas por fonte de água da comunidade. O estudo indica que, nessa cidade, a procedência da água está relacionada à infecção pelo *H. pylori* em crianças, independentemente de fatores socioeconômicos, representando um importante veículo para infecção por esta bactéria.

1.6.3 c)- Transmissão por animais e insetos

Apesar de os seres humanos serem os principais reservatórios do *H. pylori*, esse microrganismo foi também isolado em primatas e gatos domésticos (Dubois *et al.*, 1996; Fox, 1995; Handt *et al.*, 1994). Sob condições laboratoriais apropriadas, o *H. pylori* obtido de amostras humanas demonstrou ser capaz de infectar também macacos (Fox, 1995). Entretanto, mesmo se o *H. pylori* ocorrer naturalmente no organismo de macacos, ele não é capaz de representar uma rota importante de transmissão devido ao fato de o contato entre primatas e seres humanos não ser tão próximo na maior parte das regiões do mundo (Fox, 1995).

O isolamento do microorganismo também ocorreu em gatos domésticos, embora estudos realizados por Graham e col. (1991) e Staat e col. (1996) sugiram que a infecção pelo *H. pylori* nesses animais é provavelmente incomum e não deve ser considerada como problema de saúde para seus donos.

Os suínos utilizados para pesquisas são infectados pelo *H. pylori* com sucesso, porém não há evidências convincentes de que sejam reservatórios da bactéria, mesmo levando-se em consideração as semelhanças anatômicas e fisiológicas entre o estômago daqueles e o do ser humano (Fox, 1995).

O mais recente reservatório sugerido para a transmissão do *H. pylori* é a mosca doméstica. Em estudos experimentais de controle, Grubel e col. (1997) observaram que moscas domésticas infectadas com *H. pylori* em laboratório poderiam hospedar bactérias viáveis em seus intestinos. Outras investigações realizadas por estes mesmos pesquisadores através da coleta de moscas das áreas rurais, agrícolas e metropolitanas dos Estados Unidos, do Japão, da Polônia e do Egito encontraram valores de contaminação de 33% das moscas coletadas no Egito e 57% das coletadas na Polônia, áreas nas quais existe uma soroprevalência bastante alta em relação ao *H. pylori* em crianças (Grubel *et al.*, 1997). Porém, em um estudo experimental realizado por Osato e col. (1998) não foi possível encontrar o *H. pylori* em moscas que tiveram contato com fezes humanas contaminadas pela bactéria. Allen e col. (2004) também não encontraram resultados conclusivos sobre a transmissão do *H. pylori* por moscas domésticas. Assim, há controvérsias quanto à possibilidade de esses insetos atuarem como vetores para a transmissão do *H. pylori*.

1.6.3 d)- Transmissão iatrogênica ou gastro-gástrica

Apesar de o isolamento do *H. pylori* no suco gástrico de pacientes infectados variar de 0% a 58% das amostras estudadas, esse fluido é rico em bactérias, podendo servir como fonte de infecção, particularmente durante os procedimentos diagnósticos realizados por endoscopia (Vincent *et al.*, 1991).

Autores como Kodaira e col. (2002) sugerem que a infecção pelo *H. pylori* possa ser transmitida por instrumentos utilizados durante a realização de exame endoscópico, caso estes não sejam desinfetados de maneira adequada.

1.7- Relação entre o *H. pylori* e as doenças humanas

A infecção pelo *H. pylori* provoca grande desconforto em milhares de indivíduos e leva à morte pelo menos 1 milhão de pacientes anualmente, dada sua abrangência, fatos estes que muitas vezes são subestimados pelas autoridades de saúde pública e por especialistas em doenças infecciosas (Sullivan *et al.*, 1990; Tebbe *et al.*, 1996; Blaser, 2005).

A maior parte dos indivíduos com infecção pelo *H. pylori* não apresenta sintomas. Quando estes ocorrem, comumente incluem dispepsia, ou seja, desconforto abdominal acompanhado ou não de outros sintomas, tais como náusea, vômitos, flatulência e pirose (Bernersen *et al.*, 1992; Dev *et al.*, 1998).

A bactéria quase sempre está associada com gastrite crônica ativa e úlcera péptica (Cover *et al.* 1996), também estando envolvida nas mais graves doenças gástricas, incluindo gastrite atrófica, adenocarcinoma gástrico e linfoma gástrico tipo MALT (Parsonnet *et al.*, 1991; Parsonnet *et al.*, 1994).

Há suposições de que Infecções pelo *H. pylori* possam estar associadas, ainda, com diarreia persistente e com o aumento da suscetibilidade a outras doenças infecciosas (Clemens *et al.*, 1995).

Esforços para conhecer as implicações da diversidade genética do *H. pylori* levaram a várias descobertas interessantes relacionadas à sua evolução no organismo humano, na microevolução durante a infecção e no desenvolvimento da espécie. Uma possível relação simbiótica é discutida por inúmeros pesquisadores desde a descoberta do microrganismo e o debate vem se intensificando nos últimos anos devido à hipótese de que a presença da bactéria seja benéfica para alguns indivíduos (Ahmed, 2005; Ritcherl *et al.*, 2005).

Epidemiologistas acreditam que a prevalência do *H. pylori* vem diminuindo nos países desenvolvidos nos últimos anos em consequência do uso descontrolado de antibióticos e das melhorias nas condições de higiene, as quais parecem impedir a contaminação pela bactéria, apesar de as rotas de transmissão não estarem completamente esclarecidas. Quando o *Helicobacter pylori* é tratado tanto nas infecções primárias quanto nas reinfecções, os índices de casos de úlcera péptica e câncer de estômago começam a diminuir. Porém, ao mesmo tempo, doenças do esôfago, incluindo o refluxo gastroesofágico e o câncer esofágico, parecem aumentar, levando a questionamentos sobre uma possível relação entre essas doenças e o desaparecimento da bactéria (Blaser, 2005, Figueiredo *et al.*, 2005).

Assim, os tratamentos atuais com antibióticos que erradicam o *H. pylori* devem ser reconsiderados para se certificar de que os benefícios não serão menores do que qualquer malefício. Para entender completamente os efeitos do *H. pylori* na saúde humana, os pesquisadores devem investigar o complexo conjunto de interações entre o micróbio e seus hospedeiros. Em consequência, o estudo da bactéria pode auxiliar no entendimento do processo de outras bactérias que colonizam o corpo humano, assim como os processos evolucionários que permitem que humanos e bactérias desenvolvam relações estreitas um com o outro (Blaser, 2005).

1.7.1- Gastrites crônicas

A infecção produzida pelo *H. pylori* é considerada a principal causa de gastrite crônica (Ashorn, 1995; Kawaguchi, 1996, Cover *et al.*, 1996).

Com a infecção pelo *H. pylori*, ocorre invariavelmente um processo inflamatório no estômago, processo este caracterizado por um intenso infiltrado de neutrófilos e eosinófilos na lâmina própria, na camada de muco e na luz glandular. Há edema e congestão e as células epiteliais podem apresentar atipias. Este processo, caracterizado como gastrite aguda, ocorre no corpo e mais intensamente no antro gástrico. Pelo exame endoscópico pode-se verificar hiperemia, friabilidade da mucosa e erosões. Acredita-se que a maioria dos pacientes permanece assintomática durante esta fase aguda da infecção, mas alguns podem apresentar dor epigástrica e vômitos (Rocha *et al.*, 1991).

A persistência do agente agressor leva a um quadro de gastrite crônica, caracterizado pela presença de linfócitos e plasmócitos na lâmina própria. A relação causal entre a infecção e a gastrite crônica em atividade é muito consistente. A bactéria é encontrada em quase toda a totalidade destes casos, com redução do processo inflamatório em caso de erradicação do microrganismo. Além disso, há um paralelismo entre maior intensidade do processo e maior densidade de colonização (Johnston *et al.*, 1988; McNulty, *et al.*, 1986; Zeitune e Monici, 2000).

1.7.2- Úlcera péptica

A descoberta do *Helicobacter pylori* foi um evento definitivo para o entendimento da patogênese da úlcera péptica (Rauws, 1990; Dev *et al.*, 1998). Estimativas recentes dizem que mais de 15% dos indivíduos com infecção pelo *H. pylori* irão desenvolver úlcera gástrica ou duodenal. Além disso, essa infecção é associada com mais de 90% dos casos de úlcera duodenal e, na ausência do uso de antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs), com mais de 80% das úlceras gástricas (Walsh *et al.*, 1995; Dev *et al.*, 1998).

Após a constatação de que a erradicação do *H. pylori* acarreta a cicatrização da úlcera péptica, estabeleceu-se, em 1987, que todos os pacientes com essa doença relacionada ao microorganismo deveriam receber tratamento específico para o agente. Atualmente, esse é o único consenso a que se chegou quanto ao tratamento da infecção pelo *H. pylori* (Kodaira *et al.*, 2002; Blaser, 2005).

1.7.3- Câncer gástrico

Várias evidências apontam para o possível papel do *H. pylori* na patogênese do câncer gástrico, que pode ser considerado como resultado de um complexo processo, que evolui da mucosa normal, via gastrite crônica até gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e neoplasia (Correa, 1992; Ladeira *et al.*, 2003). Em 1994, a bactéria foi

classificada como carcinógeno do tipo I para câncer de estômago pela “*International Agency for Research on Cancer*”, órgão subordinado à Organização Mundial de Saúde (Dev *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 2001; Kodaira *et al.*, 2002).

Infecções crônicas pelo *H. pylori* podem levar ao desenvolvimento de gastrite atrófica e metaplasia intestinal, que são fatores de risco significantes para o desenvolvimento do câncer (Asaka *et al.*, 1995; Dev *et al.*, 1998). Evidentemente, o processo da doença é multifatorial e fatores de risco como mutações somáticas e ingestão de alimentos carcinogênicos são provavelmente importantes (Correa, 1995; Dev *et al.*, 1998). O aumento do risco para câncer gástrico pode estar relacionado a diferenças na expressão de produtos bacterianos específicos, a respostas desiguais dos hospedeiros ou a interações próprias entre a bactéria e o hospedeiro (Peek *et al.*, 1999).

O câncer gástrico é a segunda causa de morte no mundo, sendo que Eslick e col. (1999) determinaram que a infecção pelo *H. pylori* está associada a um risco duas a seis vezes maior para o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico. Diversos autores como Li e col. (1993), Nomura e col. (1993), Eslick e col. (1999) e Danesh e col. (1999) acreditam que um terço dos carcinomas gástricos seja atribuído à infecção pelo *H. pylori*.

1.7.4- Linfoma Gástrico tipo MALT (Mucosa – associated lymphoid tissue)

Resultados de estudos epidemiológicos sugerem que o linfoma gástrico tipo Malt (tecido linfóide associado à mucosa) esteja relacionado à infecção prévia pelo *H. pylori* (Parsonnet *et al.*, 1994; Erdman *et al.*, 1997), já que essa infecção é encontrada em mais de 90% dos pacientes com esse tipo de linfoma (Parsonnet *et al.*, 1994; Cammarota *et al.*, 1995). As lesões linfóides são geralmente confinadas na mucosa gástrica, mas envolvem os linfonodos regionais em aproximadamente 25% dos casos. Esses linfomas de baixo grau regredem dentro de 12 meses quando a infecção pelo *H. pylori* é eficazmente tratada. O prognóstico é, na maior parte das vezes, muito bom (Cammarota *et al.*, 1995; Dev *et al.*, 1998).

1.7.5- Doenças Extragástricas

Mais recentemente, o *H. pylori* está sendo supostamente relacionado à patogênese de algumas doenças extragástricas, incluindo a anemia por deficiência de ferro (Capurso *et al.*, 2001), algumas doenças autoimunes como a artrite reumatóide (Zentilin *et al.*, 2002) e as doenças de tireóide (de Luis *et al.*, 1998). A bactéria também tem sido investigada quanto à sua relação com a púrpura trombocitopênica idiopática, já que alguns estudos sugerem que a erradicação do microorganismo possa favorecer o prognóstico em uma certa porcentagem de pacientes (Di Campli *et al.*, 1998; Emilia *et al.*, 2001; Ando *et al.*, 2004). Além destas doenças extragástricas, a bactéria parece estar envolvida com alguns tipos de alergia, incluindo dificuldades respiratórias (Karel'skaia e Ignat'ev, 2005), urticária e dermatite atópica (Galadari e Sheriff, 2006) e doenças coronarianas (Murray *et al.*, 1995; Pieniazek *et al.*, 1999; Kowalski, 2001; Eskandarian *et al.*, 2006).

1.8- Métodos diagnósticos

A infecção pelo *Helicobacter pylori* pode ser diagnosticada através de vários métodos, que são classificados em indiretos ou não-invasivos, quando o teste é baseado na evidência indireta da presença da bactéria, e diretos ou invasivos, quando há necessidade de endoscopia digestiva alta e retirada de fragmentos da mucosa gástrica por biópsia (Mégraud, 1996; Thijs *et al.*, 1996; Czinn, 2005).

Os principais métodos diagnósticos não-invasivos são o teste respiratório da uréia marcada, a sorologia e a pesquisa de antígeno nas fezes. Dentre os métodos invasivos, que requerem amostras de fragmentos gástricos, encontram-se principalmente o teste rápido da urease, o exame histológico, a cultura e a reação em cadeia da polimerase.

A escolha do teste a ser usado para o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* depende, na maioria dos casos, das informações clínicas encontradas e da disponibilidade do local e do custo dos testes individuais (Dunn *et al.*, 1997).

1.8.1- Métodos Indiretos

Embora utilizados para a realização do diagnóstico em crianças, os testes não-invasivos fornecem resultados menos sensíveis e específicos do que os exames realizados com o uso de material gástrico obtido por biópsia, que são os métodos de escolha para um correto diagnóstico da infecção e da extensão do problema (Czinn, 2005).

1.8.1.a) Teste Respiratório da Uréia Marcada – Urea Breath Test (UBT)

É um teste amplamente utilizado em adultos para o diagnóstico da bactéria e para confirmar os resultados do tratamento antimicrobiano (Czinn, 2005). O teste respiratório da uréia consiste na ingestão pelo paciente de uma solução contendo uréia marcada com ^{13}C ou ^{14}C . Se a bactéria estiver presente no estômago, a urease, enzima produzida pelo *H. pylori*, irá hidrolisar a uréia em amônia e gás carbônico (CO_2). O átomo de carbono marcado (^{13}C ou ^{14}C) é então exalado na respiração e mensurado (Peterson *et al.*, 2001; Czinn, 2005).

Devido aos riscos provenientes da radioatividade, particularmente em crianças, há poucas informações sobre o uso da uréia marcada com ^{14}C em pacientes pediátricos (Malaty *et al.*, 2002; Niv *et al.*, 2003; de Carvalho *et al.*, 2003; Canete *et al.*, 2003).

Apesar de a especificidade deste teste ser alta, outras bactérias produtoras de urease podem estar presentes no estômago, como a *H. heilmannii*, o que pode levar a resultados falso – positivos. Testes realizados em seguida à coleta de fragmentos gástricos por biópsia também podem ser afetados devido ao sangramento, ocasionando resultados falso – positivos (Mégraud *et al.*, 1996). Além disso, assim como ocorre com o teste rápido da urease, existe alta probabilidade de resultados falso – negativos no teste respiratório da uréia em pacientes que estejam recebendo agentes anti-secretórios como inibidores de bomba de prótons (PPIs) ou doses elevadas de antagonistas do receptor da histamina 2 (H2RAs), agentes antimicrobianos ou compostos contendo bismuto, os quais reduzem a densidade do *H. pylori* (Perri *et al.*, 1995; Laine *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 2001).

1.8.1.b) Sorologia

A infecção pelo *H. pylori* estimula uma resposta imune humoral que persiste em consequência da exposição contínua às bactérias (Thijs *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 1998; Versalovic, 2003; Czinn, 2005).

As vantagens da sorologia, quando comparada a outros métodos diagnósticos, consistem em baixo custo, simplicidade e rapidez, além de não ser um método invasivo (Evans *et al.*, 1989; Kosunen *et al.*, 1992).

Porém, como os títulos de anticorpos persistem durante muitos anos, o teste não pode ser utilizado para distinguir entre infecção pregressa e atual (Murray *et al.*, 1998; Menezes Silva, 1999). Além disso, o título de anticorpos não se correlaciona com a gravidade da doença, nem com a resposta ao tratamento. Entretanto, os testes são úteis para documentar uma exposição às bactérias para estudos epidemiológicos ou para avaliação inicial do paciente sintomático (Perez-Perez *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 1998).

1.8.1.c) Pesquisa do antígeno nas fezes

O exame do antígeno nas fezes surgiu como um método não invasivo rápido para detectar o *H. pylori*. Em estudos realizados por Vaira e col. (1999) esse exame mostrou ser altamente sensível e específico na detecção do *H. pylori* em pacientes com dispepsia, além de ser útil para o acompanhamento de pacientes que completaram um esquema de erradicação da bactéria. Nesse mesmo estudo, no diagnóstico da infecção por *H. pylori*, o método de detecção de antígeno nas fezes foi altamente sensível (80 a 100%), comparável ao UBT - teste respiratório da uréia (84 a 100%). A detecção do antígeno nas fezes, feita quatro semanas depois de o paciente completar um esquema de erradicação de *H. pylori*, apresentou uma sensibilidade de 90%, uma especificidade de 95% e um valor prognóstico negativo de 98%, taxas comparáveis às obtidas com o UBT (Vaira *et al.*, 1999). Apesar disso, diversos outros pesquisadores descobriram uma taxa elevada de resultados falso – positivos em pacientes que fizeram o exame quatro semanas depois de completarem o tratamento anti *H. pylori* (Makristathis *et al.*, 1998; Trevisani *et al.*, 1999; Calvet *et al.*, 1999).

Uma grande vantagem da técnica é a possibilidade de permitir, em grande escala, estudos epidemiológicos da contaminação pelo *H. pylori* na infância (Logan *et al.*, 2001). Como principais desvantagens podem ser citados o alto custo do kit e a necessidade de serem usadas fezes não armazenadas por períodos prolongados, a fim de que não ocorra uma diminuição na sensibilidade da técnica.

1.8.2 – Métodos Diretos

1.8.2.a) Teste Rápido da Urease

A observação inicial de que o *H. pylori* produz grande atividade na produção de urease levou ao desenvolvimento de um método para identificação indireta do microrganismo em tecido gástrico obtido por biópsia no momento de realizada a endoscopia (Marshall *et al.*, 1987; Dunn *et al.*, 1997).

Esta prova pode ser positiva em mais de 60% dos casos nos primeiros 15 minutos, aumentando a positividade em até 90% após três horas de incubação (Marshall *et al.*, 1987).

Há vários kits comerciais disponíveis no mercado para o teste da urease, dentre os quais, os mais utilizados pelos pesquisadores são o “Hp Fast”, o “CLO test” (desenvolvido por Marshall, em 1987) e o “Pylori Tek”, este último um teste que utiliza uma fita com indicador de pH (Arvind *et al.*, 1988; Dunn *et al.*, 1997).

A principal vantagem dessa técnica é a sua rapidez (Marshall *et al.*, 1987; Thijs *et al.*, 1996). Como desvantagens podem ser considerados os fatos de a técnica ser invasiva e de haver a necessidade de um número relativamente alto (10^4) de microrganismos na amostra para se obter um resultado positivo (Arvind *et al.*, 1988; Bourguignon *et al.*, 1989). Além disso, outra limitação para o uso desse tipo de teste é para pacientes que estejam fazendo uso de medicamentos inibidores da bomba de prótons (PPIs) ou de doses elevadas de antagonistas do receptor de histamina (H2RAs), que podem diminuir a densidade do *H. pylori* e, conseqüentemente, a atividade da urease, produzindo, assim, resultados falso-

negativos (Peterson *et al.*, 2001). A presença de sinais de sangramento ocorrido durante a endoscopia também pode representar um fator condicionante para o decréscimo da sensibilidade do teste em questão (Fernández *et al.*, 2004).

Sensibilidades de 89 a 98% e especificidades de 93 a 100% foram encontradas para os testes da urease por Thijs e col. (1996), Peterson e col. (2001) e Versalovic (2003).

1.8.2.b) Histologia

Além de confirmar a presença da bactéria *H. pylori* nas amostras de tecido gástrico obtidas por endoscopia, o exame histológico tem importância na avaliação do processo inflamatório e na sua atividade, permitindo a análise da gravidade da gastrite assim como da presença de metaplasia intestinal e atrofia (Thijs *et al.*, 1996). O “Sistema Sydney” de classificação propõe que a coleta de duas amostras de tecido da mucosa gástrica seja suficiente para o diagnóstico histológico da infecção pelo *H. pylori* e das alterações histológicas produzidas (Price, 1991; Versalovic, 2003). Se duas ou mais amostras forem obtidas, a sensibilidade e a especificidade dos estudos histológicos poderão exceder a 95%. Ao contrário, amostras únicas podem resultar na diminuição da sensibilidade (Versalovic, 2003).

O *H. pylori* pode ser observado com o uso dos corantes hematoxilina - eosina (H & E), entretanto, essa coloração pode ser imperceptível quando poucas bactérias estiverem presentes, além de poderem ocorrer erros na identificação devido a restos de tecido da superfície do epitélio (Dunn *et al.*, 1997). Assim, a identificação histológica da bactéria é facilitada pelo uso de corantes especiais como os de “Warthin – Starry” e Giemsa modificado, embora estes apresentem um custo elevado (Thijs *et al.*, 1996; Dunn *et al.*, 1997; Versalovic, 2003).

A identificação histológica da bactéria com as características do *H. pylori* é, em parte, dependente do observador. Fatores que podem influenciar a habilidade para a correta identificação do *H. pylori* incluem a densidade bacteriana, o tipo de coloração utilizada e a experiência dos laboratoristas (Christensen *et al.*, 1992; Molyneux *et al.*, 1993; Andrew *et al.*, 1994; el-Zimaity *et al.*, 1996; Dunn *et al.*, 1997).

1.8.2.c) Cultura

A cultura para *H. pylori* apresenta duas vantagens principais. Primeiro, ela permite testes para suscetibilidade antimicrobiana; segundo, os isolados obtidos por cultura podem ser caracterizados em detalhe (Thijs *et al.*, 1996). Embora a sensibilidade para cultura em laboratórios experientes seja maior que 95%, outros métodos para o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* são mais simples, propensos a menor variabilidade e mais oportunos (Dunn *et al.*, 1997).

Uma variedade de meios seletivos e não - seletivos é disponível comercialmente para a cultura do *H. pylori* (Hachem *et al.*, 1995), sendo que o uso de múltiplos meios pode aumentar a sensibilidade. O *H. pylori* requer um ambiente microaerófilo, com alta umidade, e incubação à temperatura de 37° C por um período máximo de 7 a 10 dias. Culturas positivas são usualmente detectadas após três a cinco dias de incubação. O *H. pylori* é identificado com base na morfologia das colônias, que consistem em bastões Gram-negativos, curvados, que são urease, catalase e oxidase – positivos (Queiroz *et al.*, 1987; Dunn *et al.*, 1997; Oplustil *et al.*, 2000).

A cultura deve ser feita a partir do material obtido da mucosa gástrica por biópsia o mais rapidamente possível, a fim de se evitar a perda da viabilidade que poderia ocorrer pela dessecação ou pelo efeito nocivo do oxigênio sobre o microorganismo (Oplustil *et al.*, 2000).

Assim, o exame de cultura para o *H. pylori*, geralmente, não é usado para se estabelecer um diagnóstico inicial, devido ao potencial de resultados falso – negativos existente por erros na obtenção, na armazenagem ou no transporte da amostra, e à sua natureza demorada (Cohen *et al.*, 1997; Peterson *et al.*, 2001).

1.8.2.d) Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica rápida e extremamente sensível e específica para detecção de microrganismos. É um procedimento *in vitro* que permite a amplificação de uma região específica do ácido desoxirribonucléico (DNA) que se localiza entre duas regiões de uma sequência conhecida do DNA.

Uma maneira de se aumentar a sensibilidade e a especificidade desse método é a realização da nested PCR, na qual é feita uma segunda amplificação utilizando-se primers internos à primeira seqüência amplificada (Watanabe *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 1999).

Os primers da nested PCR são aqueles internos ao primeiro par usado. O fragmento maior produzido pelo primeiro ciclo de amplificação é usado como amostra para a segunda reação. A nested PCR pode também ser realizada com um dos primers do primeiro par e um único primer interno, recebendo a denominação de “semi-nested”. A sensibilidade e a especificidade de amplificações tanto do DNA quanto do RNA podem ser dramaticamente aumentadas pelo uso desse método. A especificidade é particularmente aumentada porque essa técnica quase sempre elimina qualquer amplificação de um produto impuro, não específico. Isso ocorre porque após o primeiro ciclo da reação quaisquer produtos não específicos são insuficientemente complementares aos primers internos para serem capazes de servir como uma amostra para amplificação, o que faz com que a seqüência alvo seja preferencialmente amplificada.

Diversos são os usos da reação em cadeia da polimerase, dentre eles, caracterização de genes defeituosos, diagnóstico pré-natal, tipagem de HLA, avaliação de genes e susceptibilidade à doenças, estudos retrospectivos e de necropsia, identificação de microrganismos, identificação de vírus, estudo do câncer (oncogenes ativados, translocações, linhagem celular e clonagem), antropologia, uso forense, pesquisas e diagnósticos de doenças, entre outros (Wright *et al.*, 1990).

As vantagens da PCR são inúmeras e, dentre estas, as principais são a simplicidade de execução, o tempo utilizado para a realização da reação e a possibilidade de genotipagem dos produtos obtidos, a fim de identificar cepas diferentes de uma determinada espécie, por exemplo, de microorganismo. Além disso, a PCR possibilita a utilização de materiais retrospectivos em pesquisas e mesmo o uso de amostras que contenham pequena quantidade de DNA, fornecendo resultados compatíveis com os esperados (Newton e Graham, 1998).

Em relação a desvantagens, estas se resumem no alto custo dos reagentes e na possibilidade de contaminação das amostras, o que pode ser facilmente evitado utilizando-se normas de biossegurança durante todas as fases do processo.

Deve-se considerar também que, após terapia, o número de bactérias diminui e os exames microbiológicos e histológicos podem produzir resultados falso-negativos. A PCR é um método sensível que permite a amplificação de pequenas quantidades de DNA bacteriano nas amostras (Simsek *et al.*, 2000).

Finalmente, a PCR ainda não é utilizada na rotina diagnóstica, fato este que vem se alterando com o decorrer do tempo, exatamente pelo fato da obtenção de resultados com padrões de 100% de sensibilidade e especificidade.

Todos os testes relatados anteriormente estão resumidos nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Métodos não-invasivos utilizados para o diagnóstico de *H. pylori*.

Método	Sensibilidade/ Especificidade (%)	Vantagens	Desvantagens
Teste respiratório de depuração da urease	> 90 / > 90	Realização rápida, acompanhamento precoce, avaliação de resposta terapêutica após 4 a 8 semanas.	Administração de radioisótopos, resultados falso-positivos, influência de medicamentos, baixa densidade bacteriana.
Testes sorológicos	>80 / > 90	Baixo custo, simplicidade, rapidez.	Não distinção entre infecção pregressa e atual; título de anticorpos não se correlaciona com a gravidade da doença nem com a resposta ao tratamento.
Pesquisa de antígeno nas fezes	> 90 / > 90	Estudos epidemiológicos na infância, avaliação da resposta ao tratamento erradicante após 6 a 8 semanas.	Alto custo; amostras não devem ser armazenadas por um longo período.

Tabela 2 - Métodos invasivos utilizados para o diagnóstico de *H. pylori*.

Método	Sensibilidade/ Especificidade (%)	Vantagens	Desvantagens
Teste rápido da urease	80 – 95 / 95 - 100	Simplicidade; resultados disponíveis em até duas horas; baixo custo.	Falso-negativos durante ou após tratamento com inibidores da bomba de prótons, antibióticos e medicamentos contendo bismuto; diminuição da sensibilidade 6 meses após tratamento erradicante; falso-positivos na presença de outras bactérias.
Exame histológico	80 – 90 / > 95	Fornecer informações sobre o tecido.	Resultado demorado e dependente do observador; baixa sensibilidade para detectar número pequeno de bactérias.
Cultura	Sensibilidade > 95 (somente em laboratórios especializados)	Avaliação da suscetibilidade microbiana; caracterização detalhada dos isolados bacterianos.	Exame demorado; alto custo; resultados falso-negativos (erros na obtenção, armazenagem ou transporte da amostra); contaminação.
Reação em cadeia da polimerase	100 / 100	Rápido, sensível e específico; simplicidade de execução; possibilidade de genotipagem dos produtos obtidos; identificação de diferentes cepas de uma determinada espécie; uso de materiais retrospectivos em pesquisas epidemiológicas. A nested PCR elimina produtos não específicos.	Alto custo dos reagentes; possibilidade de contaminação das amostras (facilmente evitável com normas de biossegurança).

1.9- Genotipagem – Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) – Análise de restrição

Métodos precisos para a caracterização de cepas do *H. pylori* são necessários para propósitos epidemiológicos e para monitorização de infecções como, por exemplo, transmissões familiares e nosocomiais, falhas em tratamentos antimicrobianos, re-colonização, entre outros aspectos (Colding *et al.*, 2003). Diversas técnicas de tipagem molecular têm sido estudadas a fim de avaliar seu potencial na diferenciação de isolados clínicos de *H. pylori*, o que pode produzir alterações no tipo de tratamento a ser utilizado.

Como descrito por Hunter e Gaston (1988), um método de tipagem deve ter um alto índice discriminatório a fim de identificar as diferentes cepas bacterianas.

Uma grande atividade da urease é um fator determinante na patogenicidade do *H. pylori* e, na região genômica da urease, a primeira a ser seqüenciada, os genes são altamente conservados. Devido ao fato de a análise por digestão enzimática do DNA de diferentes pacientes indicar um alto índice de diversidade intragênica, as pesquisas têm se voltado amplamente para a genotipagem (Owen *et al.*, 1998).

Além disso, estudos indicam que a mucosa gástrica pode ser colonizada, ao mesmo tempo, por cepas de *H. pylori* com diferentes padrões genômicos, o que é um aspecto também importante em estudos epidemiológicos (Cellini *et al.*, 1996).

O gene urease C, atualmente denominado *glmM* (Foxall *et al.*, 1992), é específico do *H. pylori* e pode ser usado para a identificação primária do microorganismo, fato comprovado por vários pesquisadores, dentre os quais, Moore e col. (1993), em cujo estudo não foi possível obter um produto de amplificação para a região do gene urease C quando os DNAs genômicos de várias outras bactérias gram-negativas e urease-positivas foram usados como amostras sob condições idênticas àsquelas usadas para as amostras do DNA do *H. pylori*.

A região do gene urease C foi primeiramente identificada como componente do grupo de genes que codificam a expressão da proteína urease (Robertson, 1995; Labigne, 1995). Após isso, demonstrou-se que esse gene codifica a enzima fosfoglicosamina mutase,

que é essencial para a biossíntese de lipopolissacarídeos e peptidoglicanas, sendo essencial para a sobrevivência da bactéria. Atualmente o gene urease C é conhecido por *glmM* gene. (Kansau *et al.*, 1996).

A proteína urease B, codificada pela região do gene urease B, é uma proteína estrutural que atua como um forte antígeno (Matsui *et al.*, 2000). Assim como o gene urease C, o gene urease B é altamente conservado e específico do *H. pylori*, podendo ser utilizado nas amplificações de PCR para estudos epidemiológicos (Mobley *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 2000).

1.10- Tratamento e Profilaxia

Considerando os diversos e numerosos esquemas terapêuticos e a diversidade dos índices de erradicação entre os diferentes países e mesmo entre regiões de um único país, é fundamental que se utilizem medicamentos comprovadamente eficazes e testados na população-alvo.

O Consenso de Maastricht (Malfertheiner *et al.*, 1997) considera os esquemas com três medicamentos como de primeira linha e os com quatro, de segunda linha. Com o surgimento de cepas de *Helicobacter pylori* resistentes ao metronidazol e à claritromicina, o que levou a um aumento significativo da frequência de falhas terapêuticas, tornaram-se necessários a avaliação e o uso de novos medicamentos (dentre os quais a levofloxacina, a furazolidona e a rifabutina), além de novos esquemas terapêuticos, como os citados por Perri e col. (2003). Esses autores adotaram a estratégia da realização sucessiva de dois tratamentos, o primeiro com três medicamentos (entre os quais estão incluídos a claritromicina e a amoxicilina), seguido, não havendo cura, de emprego de terapêutica quádrupla. Ainda não foram encontradas cepas de *H. pylori* resistentes aos sais de bismuto e às tetraciclina.

A indicação do tratamento para erradicação da bactéria não se baseia na simples existência da infecção. Segundo o Consenso de Maastricht (Malfertheiner *et al.*, 1997), a terapêutica é recomendada eletivamente para os casos de úlcera péptica gástrica, duodenal

ou gastroduodenal (ativa ou não), úlcera péptica hemorrágica e linfoma gástrico tipo MALT, podendo ser cogitada em outras situações, como as seguintes: pacientes com gastrite acompanhada de alterações intensas, pacientes após ressecção de adenocarcinoma gástrico e de cirurgia de úlcera péptica.

O Consenso de Maastricht não recomenda a realização da terapêutica para erradicação de *H. pylori* em pessoas assintomáticas, nos casos de dispepsia funcional (depois de ampla investigação), história familiar de câncer gástrico e uso prolongado de antiinflamatórios não-esteroidais. No Brasil (Coelho *et al.*, 2005), o tratamento é utilizado para essas duas últimas situações, e também em casos de duodenite erosiva.

Em relação à dispepsia funcional, ainda não há consenso sobre a necessidade de realizar o tratamento da infecção. Quanto à gastrite crônica ativa, habitualmente presente em indivíduos infectados (geralmente assintomática), pode haver dúvida quanto à indicação do tratamento para a erradicação da bactéria. No entanto, quando o indivíduo apresenta sintomatologia significativa, alterações endoscópicas pronunciadas e estudo histopatológico que demonstra a presença de alterações morfológicas graves da mucosa gástrica, a terapêutica anti-*Helicobacter pylori* deve ser preconizada (Magalhães *et al.*, 1996; Magalhães e Zeitune, 1997). (Tabela 3).

Tabela 3 - Esquemas preconizados no Brasil para o tratamento de adultos com infecção por *Helicobacter pylori*.

Tempo de tratamento (dias)	Esquemas preconizados (medicamentos administrados via oral)
7	Inibidor de bomba protônica (IBP) em dose padrão + 1g de amoxicilina + 500 mg de claritromicina, 2 vezes/ dia
7	IBP em dose padrão, 1 vez/dia + 500 mg de claritromicina, 2 vezes/dia + 200 mg de furazolidona, 2 vezes/dia
7	IBP em dose padrão, 1 vez/dia + 200 mg de furazolidona, 2 vezes/dia + 500 mg de cloridrato de tetraciclina, 4 vezes/dia

Quanto à profilaxia, embora não se conheça com pormenor a epidemiologia da infecção por *Helicobacter pylori*, admite-se, na atualidade, que as medidas de prevenção devem relacionar-se com a melhoria das condições sanitárias da população, principalmente no que diz respeito ao tratamento de água, em especial nos países em desenvolvimento

Teoricamente, a imunização ativa constitui uma alternativa para a profilaxia da infecção pela bactéria. O ceticismo inicial quanto ao preparo de uma vacina eficiente anti - *Helicobacter pylori* foi substituído nos últimos anos por perspectiva otimista, fundamentada nos resultados de estudos efetuados em animais, particularmente em camundongos, com vários tipos de antígenos bacterianos específicos (Eisenberg *et al.*, 2003; del Giudice e Michetti, 2004).

1.11- Importância

Devido à importância do *H. pylori* no desenvolvimento das doenças gástricas, a determinação das cepas responsáveis pelas diferentes doenças e das cepas prevalentes em uma determinada região é de vital importância para o correto tratamento da infecção. As regiões dos genes urease C e urease B do genoma dessa bactéria são extremamente conservadas e podem servir como base para um programa de genotipagem (RFLP) das cepas encontradas em amostras de mucosa gástrica obtidas por biópsia no momento em que os indivíduos submetem-se a exame endoscópico.



2- OBJETIVOS

Apesar de a PCR e a nested PCR não serem ainda utilizadas na rotina diagnóstica, essas técnicas demonstram grande reprodutibilidade para a detecção de microorganismos, como o *H. pylori*, além de serem altamente sensíveis e específicas. Conseqüentemente, permitem a pesquisa e o estudo utilizando amostras biológicas armazenadas e mesmo com pequena quantidade de DNA. Outra vantagem é a possibilidade de genotipagem dos produtos obtidos, o que permite a identificação de cepas diversas de um determinado agente etiológico, objetivando uma melhor compreensão do desenvolvimento das diferentes doenças provocadas por um mesmo agente.

Assim, os objetivos do presente trabalho foram:

- 1- Extrair o DNA de fragmentos da mucosa gástrica obtidos por biópsia de pacientes com gastrite crônica ou úlcera péptica submetidos à endoscopia digestiva alta no Gastrocentro da UNICAMP.
- 2- Padronizar e utilizar a técnica da reação em cadeia da polimerase tipo nested para detecção do *Helicobacter pylori* nas amostras de DNA obtidas desses fragmentos de mucosa gástrica para avaliação da presença do DNA da bactéria.
- 3- Padronizar e utilizar as técnicas da reação em cadeia da polimerase tipo nested para a região do gene urease C e da reação em cadeia da polimerase para a região do gene urease B do *H. pylori* para as amostras de DNA detalhadas acima.
- 4- Genotipar os produtos obtidos para as regiões dos genes urease C e urease B do *H. pylori* através da utilização de endonucleases de restrição: *Mbo I* para urease C e *Hae III* para urease B.
- 5- Comparar os resultados obtidos com a genotipagem, separando-os para os pacientes com úlcera e com gastrite, a fim de identificar se há, nos pacientes enquadrados no estudo, diferenças essenciais entre as cepas que produzem essas doenças.



3- CASUÍSTICA

O presente estudo foi aprovado e acompanhado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

Foram considerados como fatores de inclusão de pacientes a presença de gastrite crônica ou úlcera péptica e resultados prévios positivos para o teste da urease e/ou para a histologia, exames estes realizados na rotina do Gastrocentro da Unicamp para pacientes submetidos à endoscopia digestiva alta. Todos esses pacientes concordaram, através da assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, conforme disposição do comitê de ética, em participar do estudo.

Pacientes que apresentaram resultados negativos para o teste da urease e para histologia, quando estes dois exames foram realizados, ou que apresentaram resultado negativo para o teste da urease quando somente este foi feito, ou negativo para histologia quando apenas esta foi realizada, foram excluídos do estudo.

Um total de 128 pacientes e, portanto, 128 amostras de fragmentos de tecido gástrico obtidos por biópsia foi utilizado no presente estudo. Destas amostras, 84 haviam sido coletadas nos anos de 1998 e 1999, sendo o DNA extraído e armazenado à temperatura de - 80° C em refrigerador próprio, no “Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia”, do Departamento de Clínica Médica, localizado no Hospital das Clínicas da UNICAMP. As demais amostras de tecido gástrico, num total de 44, foram coletadas no período do final do ano de 2003 ao final do ano de 2005. O mesmo procedimento de extração do DNA foi feito, sendo o produto obtido também armazenado nas condições descritas anteriormente.

Das 128 amostras, 83 foram obtidas de pacientes com gastrite crônica (56 amostras retrospectivas e 27 amostras prospectivas) e 45 obtidas de pacientes com úlcera péptica (28 amostras retrospectivas e 17 amostras prospectivas).

Dos 128 pacientes incluídos no estudo, 73 (57%) eram do sexo masculino e 55 (43%) do sexo feminino.

A estatística descritiva da idade dos pacientes encontra-se na tabela 4.

Tabela 4 - Estatística descritiva da idade dos pacientes.

Estatística Descritiva			
n = 128			
	Média ± D.P	Mínimo - Máximo	Mediana
Idade (anos)	49,6 ± 15,4	4 - 81	49

As tabelas 5 e 6 demonstram e especificam a casuística do presente estudo, separando os pacientes de acordo com a doença apresentada (gastrite crônica ou úlcera péptica).

Tabela 5- Resultados da histopatologia dos pacientes estudados com diagnóstico endoscópico de gastrite crônica. Também encontram-se especificados número da amostra, HC data da coleta do material e idade dos pacientes.

AMOSTRA	PACIENTE	HC	DATA DA COLETA	IDADE (anos)	DIAGNÓSTICO
R 08	A. D. A.	405475-0	18/03/1999	76	Gastrite crônica
R 09	J. L. F.	674884-2	25/03/1999	23	Gastrite crônica
R 10	S. C. R.	515914-3	31/03/1999	57	Gastrite crônica
R 12	J. D. A.	690997-3	16/09/1999	43	Gastrite crônica
R 14	J. P. R.	028501-6	30/03/1999	57	Gastrite crônica
R 16	D. A. F. L.	672579-5	26/03/1999	4	Gastrite crônica
R 20	S. L. C.	674563-0	24/03/1999	45	Gastrite crônica
R 51	W. S. C.	687873-2	16/07/1999	37	Gastrite crônica
R 52	J. A. S.	674734-1	29/03/1999	58	Gastrite crônica
R 53	M. L. R. L.	660554-3	28/06/1999	50	Gastrite crônica
R 55	V. M. S.	359202-0	07/08/1998	81	Gastrite crônica
R 58	M. A. S.	610249-0	30/06/1999	23	Gastrite crônica
R 60	O. G.	63250-5	06/04/1998	48	Gastrite crônica
R 65	A. G. R.	21034	05/03/1998	46	Gastrite crônica
R 69	J. B. P.	664228-4	20/07/1999	40	Gastrite crônica
R 73	L. C. C.	601709-9	21/06/1999	72	Gastrite crônica
R 74	V. C. N. S.	626455-1	31/03/1999	30	Gastrite crônica
R 81	K. C. P. S.	550694-2	26/03/1999	26	Gastrite crônica
R 86	A. T. T. T.	657843-3	24/03/1999	75	Gastrite crônica
R 87	M. F. L. S.	673168-9	12/03/1999	39	Gastrite crônica
R 88	F. B. S.	375403-4	16/03/1999	76	Gastrite crônica
R 90	A. D. A.	674092-1	19/03/1999	41	Gastrite crônica
R 92	S. B.	350230-4	18/03/1999	71	Gastrite crônica
R 95	C. B. R.	675503-7	30/03/1999	38	Gastrite crônica
R 97	W. V. O. P.	578066-1	30/03/1999	52	Gastrite crônica
R 98	C. M. R.	657087-1	16/03/1999	74	Gastrite crônica
R 99	O. G.	649229-7	17/03/1999	55	Gastrite crônica
R 100	E. S. S. P.	668063-0	18/03/1999	34	Gastrite crônica
R 101	R. M. S. R.	462773-7	19/03/1999	49	Gastrite crônica
R 103	M. G.	14032	24/03/1999	50	Gastrite crônica
R 104	L. G. S.	648340-0	17/03/1999	42	Gastrite crônica
R 105	N. F. H.	189286-2	29/03/1999	52	Gastrite crônica
R 107	N. B. B.	262610-1	03/02/1999	49	Gastrite crônica
R 111	F. P. M. N.	601891-8	16/03/1999	50	Gastrite crônica
R 112	M. A. T. G.	300409-7	30/03/1999	30	Gastrite crônica
R 113	S. C. G. F.	327432-9	23/03/1999	42	Gastrite crônica
R 114	J. C. F.	389304-8	05/07/1999	39	Gastrite crônica
R 115	M. B.	649630-0	17/03/1999	31	Gastrite crônica
R 116	R. L. S.	675013-2	26/03/1999	15	Gastrite crônica

R 117	A. T.	671449-7	28/06/1999	72	Gastrite crônica
R 118	E. O. J.	256060-0	30/06/1999	30	Gastrite crônica
R 119	J. O.	110326-9	17/12/1998	52	Gastrite crônica
R 121	I. P.	503184-8	30/06/1999	54	Gastrite crônica
R 123	J. F. C.	566967-7	05/07/1999	40	Gastrite crônica
R 125	R. N. A. S.	907334-0	28/06/1999	29	Gastrite crônica
R 126	P. A. O.	6721519	05/03/1999	15	Gastrite crônica
R 127	V. L. A.	668599-9	08/03/1999	39	Gastrite crônica
R 129	N. C. P. C.	460985-8	19/03/1999	50	Gastrite crônica
R 130	V. M. F.	660317-3	18/11/1998	71	Gastrite crônica
R 131	E. L.	607136-8	02/03/1999	38	Gastrite crônica
R 132	M. S.	531710-3	08/03/1999	39	Gastrite crônica
R 133	O. O.	634866-8	19/03/1999	54	Gastrite crônica
R 136	A. R.	665714-0	16/07/1999	55	Gastrite crônica
R 137	M. I. P.	684970-5	20/07/1999	41	Gastrite crônica
R 138	F. I. F.	218905-6	22/12/1998	41	Gastrite crônica
R 139	A. L. S.	284121-0	16/07/1999	52	Gastrite crônica
N 01	T. A. L.	647132-4	12/09/2003	72	Gastrite crônica
N 02	T. P. D. P.	735213-1	12/09/2003	17	Gastrite crônica
N 03	A. A. D.	127321-6	12/09/2003	41	Gastrite crônica
N 06	J. O. S.	387071-9	23/03/2004	73	Gastrite crônica
N 12	I. M. A.	740116-0	13/04/2004	47	Gastrite crônica
N 16	M. G. M. S.	037351-0	05/05/2004	57	Gastrite crônica
N 17	M. A. C.	770907-1	11/05/2004	26	Gastrite crônica
N 18	I. M.	701595-5	18/05/2004	47	Gastrite crônica
N 20	J. V. V.	867381-1	01/06/2004	56	Gastrite crônica
N 21	A. A. P.	638958-5	08/06/2004	75	Gastrite crônica
N 23	J. A. O.	253060-9	15/06/2004	60	Gastrite crônica
N 24	H. A. A.	038735-7	22/06/2004	45	Gastrite crônica
N 25	C. A. F. O.	794194-0	29/06/2004	37	Gastrite crônica
N 27	C. A. L. D.	848726-6	29/06/2004	38	Gastrite crônica
N 28	W. B.	860252-5	06/07/2004	46	Gastrite crônica
N 29	L. E. A.	888472-9	10/08/2004	76	Gastrite crônica
N 30	A. P. L.	747674-1	17/08/2004	66	Gastrite crônica
N 32	L. M.	755171-3	21/09/2004	51	Gastrite crônica
N 34	O. M.	654255-9	21/09/2004	54	Gastrite crônica
N 35	H. N. K.	892329-2	29/11/2004	43	Gastrite crônica
N 39	N. M.	235266-3	06/12/2004	60	Gastrite crônica
N 40	C. R. F.	897119-0	31/01/2005	28	Gastrite crônica
N 41	R. L. N.	626774-5	21/02/2005	33	Gastrite crônica
N 44	C. L. S.	619289-3	21/03/2005	55	Gastrite crônica
N 45	M. H. C. P.	166292-4	28/03/2005	36	Gastrite crônica
N 49	C. G. L.	914771-8	27/06/2005	44	Gastrite crônica
N 50	P. S. S.	919362-8	11/07/2005	39	Gastrite crônica

Tabela 6- Laudos endoscópicos observados nos prontuários dos pacientes estudados com diagnóstico de úlcera. Também encontram-se especificados número da amostra, HC data da coleta do material e idade dos pacientes.

AMOSTRA	PACIENTE	HC	DATA DA COLETA	IDADE (anos)	DIAGNÓSTICO
R 21	R. A. C.	673008-3	16/03/1999	19	Úlcera duodenal
R 46	S. F.	297200-1	28/06/1999	71	Úlceras gástricas
R 50	B. C. O.	315896-7	03/03/1999	31	Úlceras gástrica/duodenal
R 59	A. S.	555291-6	08/04/1998	65	Úlcera péptica
R 64	M. M. R.	473565-3	27/03/1998	45	Úlcera gástrica
R 66	A. P.	628127-0	14/07/1998	53	Úlcera gástrica
R 75	S. M. M.	674686-8	30/06/1999	51	Úlcera gástrica
R 76	J. A. S. I.	668502-6	31/03/1999	51	Úlcera gástrica
R 77	E. J. M.	394774-0	15/03/1999	60	Úlcera gástrica
R 78	L. I. F.	334789-7	28/06/1999	46	Úlcera gástrica
R 80	J. A. R.	429896-2	29/03/1999	54	Úlcera gástrica
R 82	E. S. F.	644612-3	21/06/1999	39	Úlcera gástrica
R 83	M. L. L.	60048-0	12/03/1999	76	Úlcera duodenal
R 84	M. E. P.	9074139-6	28/06/1999	47	Úlcera gástrica
R 85	N. M. B. S.	035867-5	26/06/1999	45	Úlcera gástrica
R 89	V. S.	968334-8	29/03/1999	69	Úlceras gástricas
R 93	A. P. S. F.	620633-3	28/06/1999	38	Úlceras duodenais
R 94	J. A.	751011	30/03/1999	60	Úlcera gástrica
R 96	L. F. D.	628618-9	30/03/1999	49	Úlcera gástrica
R 102	M. T.	661949-9	17/03/1999	73	Úlceras gástricas
R 109	R. F. S.	324077-4	26/06/1999	49	Úlcera duodenal
R 110	N. B. S.	633743-3	16/03/1999	50	Úlcera gástrica
R 120	J. V. C.	66836-5	21/06/1999	54	Úlcera gástrica
R 122	J. D. A.	618704-6	29/06/1999	47	Úlcera duodenal
R 124	A. W. S.	4663370-9	24/03/1999	41	Úlcera duodenal
R 128	N. P. P.	164217-0	03/02/1999	47	Úlcera gástrica
R 135	C. A. C.	661303-9	03/02/1999	50	Úlcera gástrica
R 140	M. I. S.	528878-2	18/11/1998	73	Úlcera gástrica
N 07	R. L. O.	860712-5	30/03/2004	38	Úlcera duodenal
N 09	F. F. C.	855431-0	30/03/2004	58	Úlcera gástrica/duodenal
N 10	D. L. B. G.	841727-1	06/04/2004	57	Úlcera duodenal
N 11	F. G.	764002-7	06/04/2004	61	Úlcera duodenal
N 13	M. A. G.	800700-4	13/04/2004	45	Úlcera gástrica
N 14	L. C. S.	862945-8	27/04/2004	75	Úlcera gástrica
N 15	G. C. S.	874404-6	27/04/2004	70	Úlcera gástrica
N 26	A. B. S. N.	356075-4	29/06/2004	44	Úlcera gástrica
N 31	M. S. P. P.	601442-3	17/08/2004	45	Úlcera duodenal
N 33	L. P. O.	079559-0	21/09/2004	47	Úlcera duodenal
N 36	A. J. E.	502278-8	29/11/2004	78	Úlcera duodenal
N 37	A. A.	846964-6	06/12/2004	57	Úlcera duodenal
N 38	T. A. B.	467023-5	06/12/2004	53	Úlcera gástrica
N 42	N. M. B. R.	838240-4	21/02/2005	52	Úlcera duodenal
N 43	F. L. S. A.	4914-3	28/02/2005	72	Úlcera duodenal
N 46	A. C. P.	928077-0	04/04/2005	60	Úlcera gástrica
N 48	M. J. S. V.	851847-5	16/05/2005	66	Úlcera gástrica



4- MATERIAIS E MÉTODOS

Os métodos utilizados no presente estudo para a caracterização das amostras de DNA em relação ao patógeno *Helicobacter pylori* foram:

- 1- extração do DNA das amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia;
- 2- reação de betaglobina para confirmação da extração do DNA;
- 3- amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase tipo nested para detecção do DNA da bactéria;
- 4- amplificação gênica específica para a região do gene da urease C pela reação em cadeia da polimerase tipo nested;
- 5- amplificação gênica específica para a região do gene da urease B pela reação em cadeia da polimerase simples;
- 6- finalmente, genotipagem com as enzimas de restrição *Mbo I* para a região amplificada do gene urease C e *Hae III* para a região amplificada do gene urease B.

Para o desenvolvimento do presente estudo utilizaram-se tanto amostras de DNA extraídas de fragmentos da mucosa gástrica obtidos por biópsia e coletadas durante os anos de 1998 e 1999, as quais estavam conservadas à temperatura de - 80° C em um banco de amostras do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia, quanto amostras de DNA extraídas de tecido gástrico, obtidas por biópsia, coletadas durante os anos de 2003 a 2005 e que foram também mantidas nas mesmas condições de armazenamento, todas coletadas com a concordância dos pacientes do Gastrocentro da Unicamp.

As amostras de tecido foram coletadas durante os exames endoscópicos de rotina realizados nas salas de endoscopia do Gastrocentro da Unicamp e foram, portanto, obtidas de pacientes que já iriam passar pela coleta de material gástrico para análise. Após a coleta, as amostras foram conservadas em tubos eppendorf de 1,5 mL contendo solução fisiológica (NaCl a 0,9%) e mantidas à temperatura de - 80° C, sendo o DNA dessas amostras extraído logo em seguida à coleta.

Todos os pacientes que concordaram em participar do estudo apresentaram gastrite crônica ou úlcera péptica e, para tanto, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, conforme disposição do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

4.1- Critérios de diagnóstico

Foram considerados como pacientes positivos para *Helicobacter pylori* e, portanto, incluídos no estudo, todos aqueles que apresentaram resultados positivos para o teste da urease e/ou para a histologia e que apresentavam gastrite crônica ou úlcera péptica.

Pacientes que apresentaram resultados negativos para os dois exames, histologia e teste da urease, e pacientes que tiveram apenas um destes exames realizados, obtendo-se resultado negativo, foram excluídos do estudo.

Os resultados de exames e as pastas de acompanhamento de todos os pacientes incluídos nesta pesquisa foram avaliados no Serviço de Arquivo Médico (SAM) do Hospital das Clínicas da Unicamp.

4.2- Extração de DNA de tecidos não fixados

O método utilizado para a extração do DNA de tecidos não fixados foi descrito por Latchman e col. (1995).

Uma secção de 3 a 7 mm de tecido não fixado foi mantida em tubo eppendorf de 1,5 mL e conservada em solução fisiológica à temperatura de – 80° C.

Vinte e quatro horas antes da extração, foi retirado o volume máximo possível da solução fisiológica do eppendorf, mantendo-se apenas o tecido, sendo o tubo colocado à temperatura de - 80° C. Após isso, o tecido foi macerado em um vidro de relógio com o auxílio de um bastão de vidro e então transferido para outro eppendorf de 1,5 mL, sendo centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos.

O excesso de solução fisiológica foi retirado e, ao tecido, foram acrescentados 190 µL de uma solução contendo 0,1 M de Tris HCl (pH 7,5) e 1% de SDS. A essa mistura foram acrescentados 10 µL de uma solução de proteinase K (10 mg/mL de uma solução estoque). O tubo foi, após isso, passado no vórtex e incubado “overnight” à temperatura de 55° C.

Em seguida, à amostra foram adicionados 200 µL de fenol e 200 µL de uma solução contendo clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1. A amostra foi passada no vórtex e centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm.

O sobrenadante foi removido e colocado em outro tubo eppendorf de 1,5 mL, sendo adicionados a ele 200 µL de uma solução contendo clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 1:1. A amostra foi passada no vórtex e centrifugada durante 10 minutos a 1500 rpm.

Novamente o sobrenadante foi removido e colocado em outro tubo eppendorf de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 25 µL de uma solução de acetato de sódio 3 M, sendo o eppendorf completado com álcool etílico absoluto mantido à temperatura de - 20° C, invertendo-se o eppendorf gentilmente por repetidas vezes.

Finalmente, a amostra foi incubada à temperatura de - 70° C durante 30 minutos e, após esse período, centrifugada durante 15 minutos a 1500 rpm. Decantou-se a solução e deixou-se o pellet para secar. Em seguida, este foi ressuspenso com uma solução tampão (Tris – EDTA) em um volume de 30 µL e colocado em banho-maria a 37° C durante uma hora. A amostra foi então armazenada à temperatura de - 20° C.

4.3- Reação em cadeia da polimerase utilizando primers para detecção do gene da betaglobina humana para controle interno da reação

A reação em cadeia da polimerase para detecção do gene da beta globina humana seguiu o método descrito por Saiki e col. (1988).

Essa amplificação teve como objetivo principal analisar a presença e a qualidade do DNA extraído das amostras de tecido gástrico, garantindo-se um controle interno de qualidade do experimento, o que foi indispensável para a segurança dos resultados obtidos.

Foram realizados 40 ciclos de amplificação para cada amostra em termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA), obedecendo-se às seguintes temperaturas e seus respectivos tempos: desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos, desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 55° C por 1 minuto, extensão a 72° C por 2 minutos e, para finalizar, extensão final a 72° C por 8 minutos.

Foram utilizados os primers PCO3 e PCO4, obtendo-se um produto final de amplificação de 110 pares de bases.

Demonstra-se em seguida a seqüência de primers utilizados, que flanqueiam uma região conservada do gene da betaglobina humana. (tabela 7).

Tabela 7 – Primers para gene da betaglobina humana

Primer	Seqüência (5' → 3')	Sentido
PCO3	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC	Sense
PCO4	CAA CTT CAT CCA CGT TTC ACC	Antisense

4.4- Detecção da bactéria *Helicobacter pylori* pela reação em cadeia da polimerase tipo nested

A reação em cadeia da polimerase tipo nested para detecção do DNA do *Helicobacter pylori* seguiu o método descrito por Victória e col. (2003), com algumas modificações.

Para a primeira reação de amplificação foram utilizados 2 µL do DNA extraído em um volume total de 25 µL para cada reação, contendo 2,4 µL de PCR buffer (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,4), 0,8 µL (1,5 mM) de MgCl₂, 4,0 µL de Dntp, 0,4 µL (20 pmol) de cada primer e 0,25 µL de Taq polimerase, completando-se o volume com água destilada.

Trinta ciclos de amplificação foram realizados automaticamente em um termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer / Cetus, Norwalk, Conn, EUA). As amostras foram submetidas primeiramente a 94° C por 3 minutos. Em seguida, foram utilizados as seguintes temperaturas e os respectivos tempos: 94° C por um minuto (para separação das hélices do DNA por aquecimento), 57° C por um minuto (para ligação complementar entre os primers e a região específica do DNA, ou seja, para o anelamento) e 72° C por um minuto (para síntese do DNA pela Taq polimerase). A extensão final foi realizada à temperatura de 72° C por 7 minutos.

Os primers utilizados para a primeira reação de amplificação foram os seguintes: (tabela 8).

Tabela 8 – primers da primeira reação (PCR) de detecção do DNA do *H. pylori*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Sentido
1	CAG TTA TTT GGT GGC TAC AAC CG	Sense
2	CCC ATC AAT AGA CGC TTA ATC C	Antisense

Para a nested PCR (segunda reação de amplificação), uma alíquota de 4 µL do produto da primeira amplificação foi submetida ao mesmo procedimento descrito acima, com utilização de primers internos aos anteriormente usados, sendo esses primers os seguintes: (tabela 9).

Tabela 9 – primers da nested PCR para detecção do DNA do *H. pylori*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Sentido
3	GCT GTA ATT TAA GGG TGG GGG TTG	sense
4	TGC CGT AAT TCA AAC TGC AAG CG	antisense

A primeira reação resultou na amplificação de um produto final de 956 pares de bases e a nested PCR em um produto de 345 pares de bases.

4.5- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase tipo nested para a região do gene da urease C

A amplificação gênica da região do gene urease C seguiu o método descrito por Suzuki e col. (1999), com algumas modificações, sendo que os primers utilizados para a primeira reação de amplificação já haviam sido anteriormente descritos por Fujimoto e col. (1994).

O volume total para cada reação na primeira amplificação foi de 25 µL, contendo 1 µL do DNA extraído, 2,7 µL de PCR buffer, 0,8 µL de MgCl₂, 4,0 µL de Dntp, 0,4 µL de cada primer (ureC1 e ureC2) e 0,25 µL de Taq polimerase, completando-se o volume com água destilada. Os primers foram diluídos na proporção de 1:5 com água destilada.

Foram realizados 40 ciclos em termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer / Cetus, Norwalk, Conn., EUA), submetendo as amostras a 94° C por 5 minutos, 94° C por 30 segundos (desnaturação), 56° C por 1 minuto (anelamento), 72° C por 1 minuto e 30 segundos e 72° C por 7 minutos (extensão final).

Os primers utilizados na primeira reação de amplificação foram os seguintes: (tabela 10).

Tabela 10 – primers da primeira reação (PCR) para urease C

Primer	Seqüência (5' → 3')	Sentido
Ure C 1	TGG GAC TGA TGG CGT GAG GG	sense
Ure C 2	AAG GGC GTT TTT AGA TTT TT	antisense

Em seguida, foi realizada a nested PCR, utilizando-se 2 µL do produto amplificado na primeira reação, com as mesmas condições descritas acima para o volume total de cada reação e para os ciclos.

Os primers utilizados para a nested PCR foram os seguintes: (tabela 11).

Tabela 11 – primers da nested PCR para urease C

Primer	Seqüência (5' → 3')	Sentido
Ure C 3	AAA GCA GGG GTG AAA CTC AC	Sense
Ure C 2	AAG GGC GTT TTT AGA TTT TT	Antisense

A primeira reação resultou em um fragmento de 820 pares de bases e a nested PCR em um fragmento final de 798 pares de bases.

4.6- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase para a região do gene urease B

A amplificação por PCR para a região do gene urease B seguiu também o método descrito por Suzuki e col. (1994), excluindo-se a nested PCR.

O volume total para cada reação foi de 25 µL, utilizando-se 1 µL do DNA extraído das amostras de biópsias, 2,7 µL de PCR buffer, 1,5 µL de MgCl₂, 2,0 µL de Dntp, 0,4 µL de cada primer (ure B 1 e ure B 2) e 0,2 µL de Taq polimerase, completando-se o volume com água destilada. Os primers foram diluídos na proporção 1:5 com água destilada.

Foram realizados 40 ciclos em termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer / Cetus, Norwalk, Conn., EUA), com as seguintes temperaturas e ciclos: 94° C por 5 minutos, 94° C por 30 segundos, 58° C por um minuto, 72° C por um minuto e trinta segundos e 72° C por 7 minutos.

Os primers utilizados para a região da urease B foram os seguintes: (tabela 12).

Tabela 12 – primers da PCR para urease B

Primer	Seqüência (5' → 3')	Sentido
Ure B 1	AGC AAT AGC AGC CAT AGT GT	sense
Ure B 2	GGT CCT ACT ACA GGC GAT AA	antisense

A reação resultou em um fragmento final de 759 pares de bases.

4.7- Visualização do DNA nos fragmentos amplificados

Para avaliação da positividade do DNA do *Helicobacter pylori* nos fragmentos amplificados, após as três reações de amplificação realizadas para cada amostra (detecção, gene urease C e gene urease B), os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em cuba horizontal, contendo gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Após a eletroforese, cada gel foi observado sob luz ultravioleta.

Nas amostras positivas foram observados, comparando-se ao ladder (marcador molecular), fragmentos de 345 pares de bases na reação de detecção, 798 pares de bases na região do gene urease C e 759 pares de bases na região do gene urease B.

Cada gel foi fotografado utilizando-se o sistema Polaroid®.

4.8- Genotipagem para as regiões amplificadas dos genes da urease C e da urease B – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

Análises de fragmentos dos genes urease C e urease B obtidos por nested PCR e PCR, respectivamente, demonstram que a estrutura genômica do *H. pylori* é altamente diversa quando se utilizam as enzimas de restrição *Mbo I* e *Hae III* (Colding *et al.*, 1999).

Portanto, após a realização da amplificação do DNA da bactéria nas regiões do gene urease C e urease B, os produtos obtidos foram submetidos à digestão enzimática. Foi usada a enzima *Mbo I* para os produtos obtidos na amplificação da região do gene urease C, e a enzima *Hae III*, para os produtos amplificados da região do gene urease B.

O volume total para cada reação, independentemente da região amplificada e da enzima utilizada, foi de 20,0 µL, sendo 7,0 µL do produto da nested PCR (no caso do gene urease C) ou PCR (no caso do gene urease B), 2,0 µL do tampão específico de cada enzima, 0,5 µL da enzima (*Mbo I* para o produto da amplificação do gene urease C e *Hae III* para o produto da amplificação do gene urease B) e 11,5 µL de água destilada.

Em seguida, as amostras foram passadas no vórtex e colocadas no banho à temperatura de 37° C, onde foram deixadas por 18 horas, afim de possibilitar a digestão dos produtos da nested PCR e da PCR.

Após esse período, os fragmentos obtidos com a digestão foram visualizados sob luz ultravioleta em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e fotografado em sistema Polaroid®.

4.9- Estatística

Para a avaliação dos resultados obtidos no presente estudo foi utilizado o Teste Exato de Fischer, teste estatístico que avalia diferenças entre dois grupos independentes em relação a uma variável qualquer que só admita duas alternativas como resposta (sim/não, positivo/negativo). O teste exato de Fischer permite calcular a probabilidade de associação das características que estão em análise, ou seja, a probabilidade de elas serem independentes. Esse teste deve ser usado, portanto, para os casos em que o número total de dados é pequeno, já que produz menos erros do que o teste do qui-quadrado.

4.10- Normas de biossegurança utilizadas para evitar a contaminação nas amostras

Durante todos os procedimentos e técnicas utilizados para o desenvolvimento da presente pesquisa foram tomados diversos cuidados a fim de evitar qualquer tipo de contaminação das amostras e mesmo dos pesquisadores e alunos do laboratório. Abaixo encontram-se relacionados os principais cuidados que foram tomados:

- a-) manipulação em locais diferentes para extração do DNA, preparo das amostras para amplificação e amplificação propriamente dita;
- b-) reagentes e materiais preparados e utilizados em ambientes diferentes daquele destinado à amplificação da sequência alvo;
- c-) uso de bancadas com fluxo laminar para manipulação das amostras a serem amplificadas;
- d-) antes da abertura dos tubos “eppendorf” contendo as amostras, estes foram passados no vórtex e centrifugados a fim de se evitar a dispersão de aerossóis;
- e-) todos os materiais plásticos utilizados no preparo das amostras para amplificação, incluindo as ponteiros e os tubos “eppendorf”, eram novos e estéreis;
- f-) trocas constantes de luva durante todo o processo de manipulação;
- g-) uso de hipoclorito a 10% e etanol a 70% nos períodos anteriores e posteriores ao uso das bancadas;
- h-) uso de ponteiros com filtro;
- i-) uso de jogos de pipetas diferentes para cada local;
- j-) uso de luvas, máscara, avental, óculos e capacete de proteção.
- k-) prática laboratorial meticulosa.



5- RESULTADOS

5.1- Nested PCR para detecção do DNA da bactéria *H. pylori*

A padronização da reação em cadeia da polimerase tipo nested para detecção do DNA do *H. pylori* foi realizada sem complicações, apenas havendo a necessidade de se adequarem as quantidades dos reagentes utilizados a fim de que não fossem amplificadas bandas inespecíficas. Para confirmação dos resultados, a reação tipo nested foi feita em duplicata para todas as amostras, utilizando-se um controle positivo e um controle negativo do DNA bacteriano.

O programa de amplificação, com as temperaturas, ciclos de reação e concentrações dos reagentes, encontra-se descrito no item “Métodos”.

A amplificação ocorreu nas 128 amostras de DNA extraído dos fragmentos da mucosa gástrica obtidos por biópsia do total de pacientes presentes neste estudo. Destas amostras, como já citado, 45 eram provenientes de pacientes com diagnóstico de úlcera e 83 de pacientes com gastrite. (tabela 13 e figura 9).

Tabela 13 - Resultado da detecção da bactéria *Helicobacter pylori* pela nested PCR (amplificação do produto final de 345 pb).

	<i>N</i>	<i>%</i>
<i>Gastrite</i>	83	100
<i>Úlcera</i>	45	100
<i>Total de amostras</i>	128	100

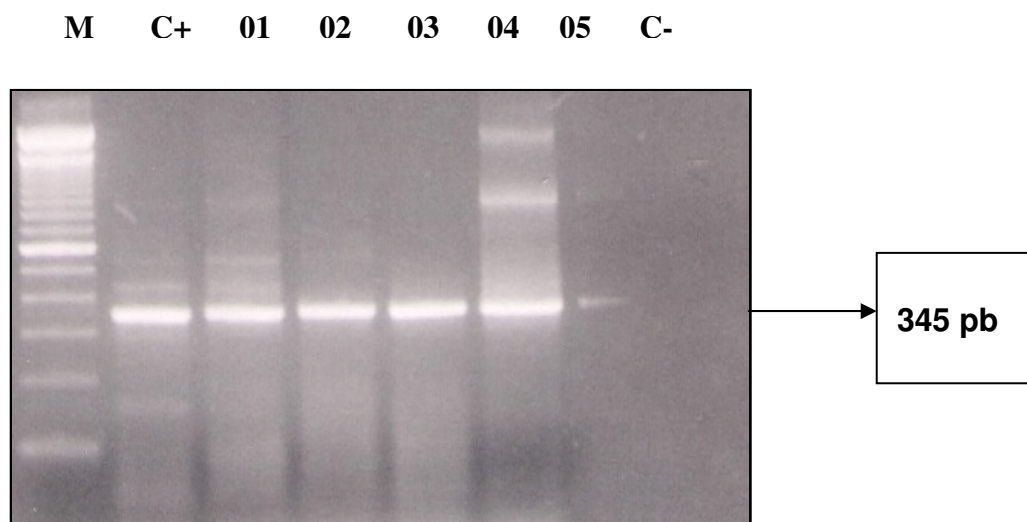


Figura 4 - Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Detecção do *H. pylori* (345 pb).

M – marcador de peso molecular ladder 100 pb. C + controle positivo.

1 a 5 – pacientes positivos. C - controle negativo

5.2- Nested PCR para amplificação da região do gene urease C do *H. pylori*

A amplificação da região do gene urease C do *H. pylori* foi realizada para as 128 amostras de DNA, porém com algumas dificuldades, havendo a necessidade de serem feitas repetidas reações, pois a amplificação final demonstrava fragmentos de intensidade baixa, proporcionando uma genotipagem final muitas vezes inadequada. Apesar disso, a padronização foi realizada com sucesso, conforme descrição no item “Métodos” do presente trabalho, sendo possível, conseqüentemente, a tipagem dos produtos obtidos. Os melhores resultados foram obtidos com a diluição 1:5 dos primers (ureC 1, ureC 2 e ureC 3). (figura 5).

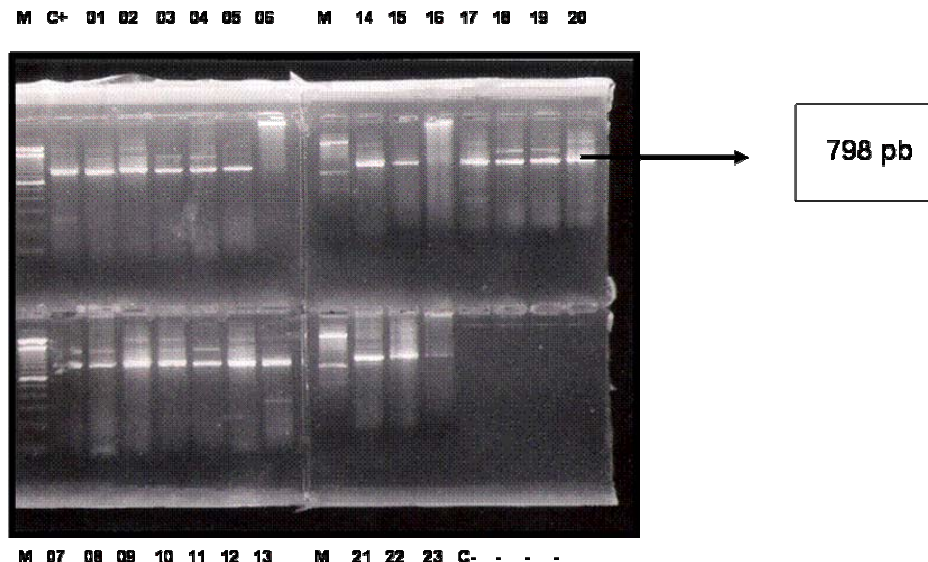
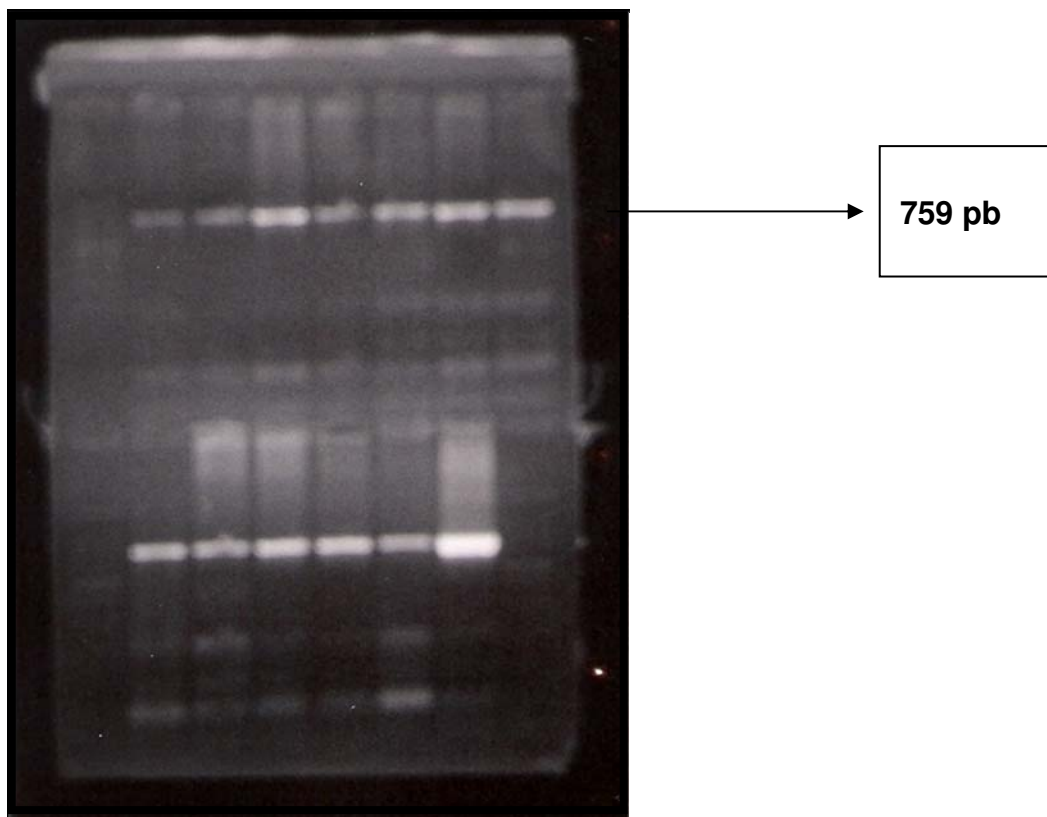


Figura 5 – Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Amplificação da região do gene urease C do *H. pylori* (798 pb). M – marcador de peso molecular Ladder 100 pb. C+ controle positivo. 1 a 23 – amostras positivas. C- controle negativo.

5.3- PCR para a amplificação da região do gene urease B do *H. pylori*

A amplificação da região do gene urease B do *H. pylori* também ocorreu em todas as 128 amostras de DNA, sendo a padronização da reação realizada de acordo com os esquemas já descritos no item “Métodos”. Os melhores resultados foram obtidos com a diluição 1:5 dos primers (ureB 1 e ureB 2). (figura 6).

M C+ 01 02 03 04 05 06



M 07 08 09 10 11 12 C-

Figura 6 – Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Amplificação da região do gene urease B do *H. pylori* (759 pb). M – marcador de peso molecular Ladder 100 pb. C+ controle positivo. 01 a 12 – amostras positivas. C- controle negativo.

5.4- Genotipagem dos fragmentos de 798 pares de bases obtidos na região do gene urease C

A genotipagem dos fragmentos obtidos pela nested PCR para a região do gene urease C do *H. pylori* foi realizada nas 128 amostras de DNA utilizando-se a enzima de restrição *Mbo I*. (figuras 7, 8, 9 e 10).

O grupo prevalente para gastrite crônica obtido com essa genotipagem foi o denominado grupo ureC MboI G, com fragmentos de 110, 120, 250 e 310 pares de bases, ocorrendo em 13 pacientes (15,7% dos casos). (figura 7).

Em relação aos casos de úlcera péptica, o grupo de genotipagem mais prevalente foi o denominado ureC MboI E, com 110, 180 e 500 pares de bases ocorrendo em 11 pacientes (24,4% do total de casos). (figura 8).

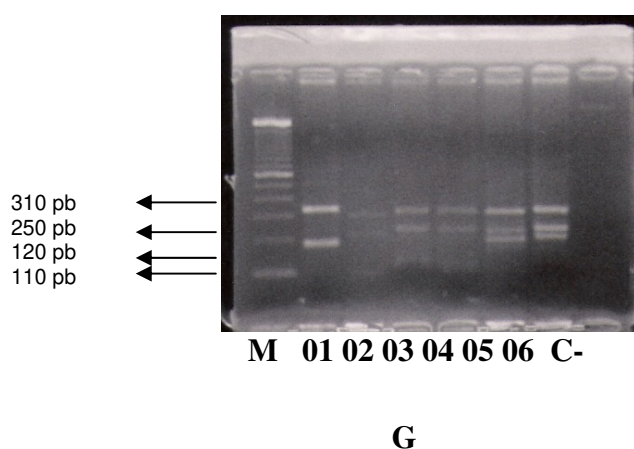


Figura 7 – Padrões de digestão dos produtos da nested PCR para ureC com a enzima MboI. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M – marcador de peso molecular Ladder 100 pb.

01 a 06 – amostras; C- controle negativo.

G – genótipo prevalente para os casos de gastrite (110, 120, 250, 310 pb).

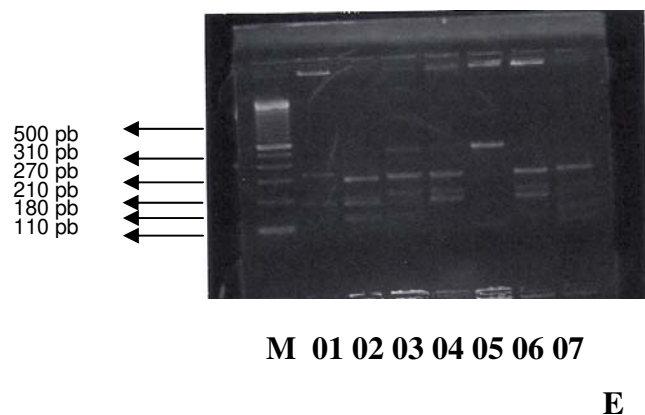


Figura 8 – Padrões de digestão dos produtos da nested PCR para ureC com a enzima *Mbo I*. Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. M – marcador de peso molecular Ladder 100 pb.

01 a 07 – amostras.

E – genótipo prevalente para os casos de úlcera péptica (110, 180, 500 pb).

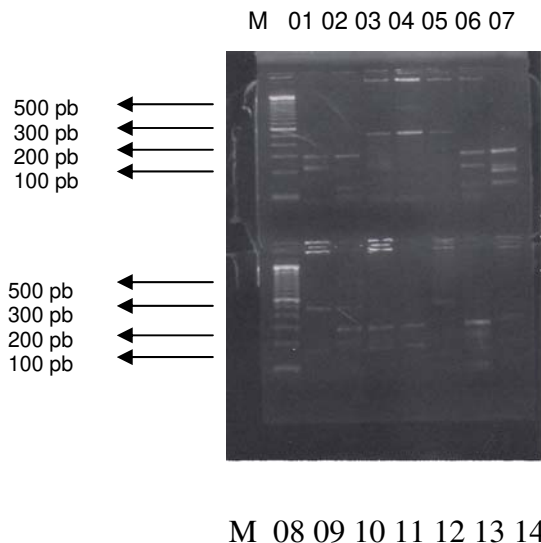


Figura 9 - Padrões de digestão dos produtos da nested PCR para ureC com a enzima *Mbo I*. Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. M – marcador de peso molecular Ladder 100 pb.

01 a 14 – amostras.

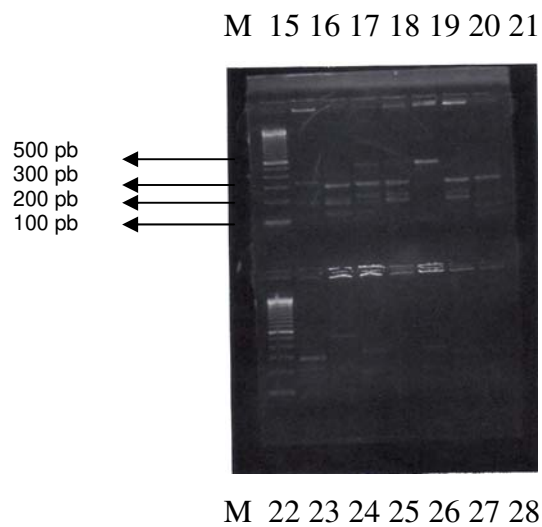


Figura 10 – padrões de digestão dos produtos da nested PCR para ureC com a enzima *Mbo* I. Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. M – marcador de peso molecular Ladder 100 pb.

15 a 28 – amostras.

Tabela 14 - Resultado da genotipagem dos produtos obtidos pela nested PCR para a região do gene urease C do *H. pylori* após digestão com enzima *Mbo I*.

n = 128								
Grupos de Genotipagem (Urease C)								
	A	B	C	D	E	F	G	H
Gastrite	7(8,4%)	3 (3,6%)	0 (0,0%)	8 (9,6%)	10 (12,0%)	0 (0,0%)	13 (15,7%)	7 (8,4%)
Úlcera	2 (4,4%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)	3 (6,7%)	11 (24,4%)	2 (4,4%)	4 (8,9%)	4 (8,9%)

n = 128										
Grupos de Genotipagem (Urease C)										
	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	p-valor
Gastrite	2 (2,4%)	1 (1,2%)	6 (7,2%)	7 (8,4%)	6 (7,2%)	1 (1,2%)	0 (0,0%)	4 (4,8%)	8 (9,6%)	0,147*
Úlcera	0 (0,0%)	2 (4,4%)	6 (13,3%)	4 (8,9%)	2 (4,4%)	0 (0,0%)	1 (1,2%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)	

* Generalização do Teste Exato de Fisher

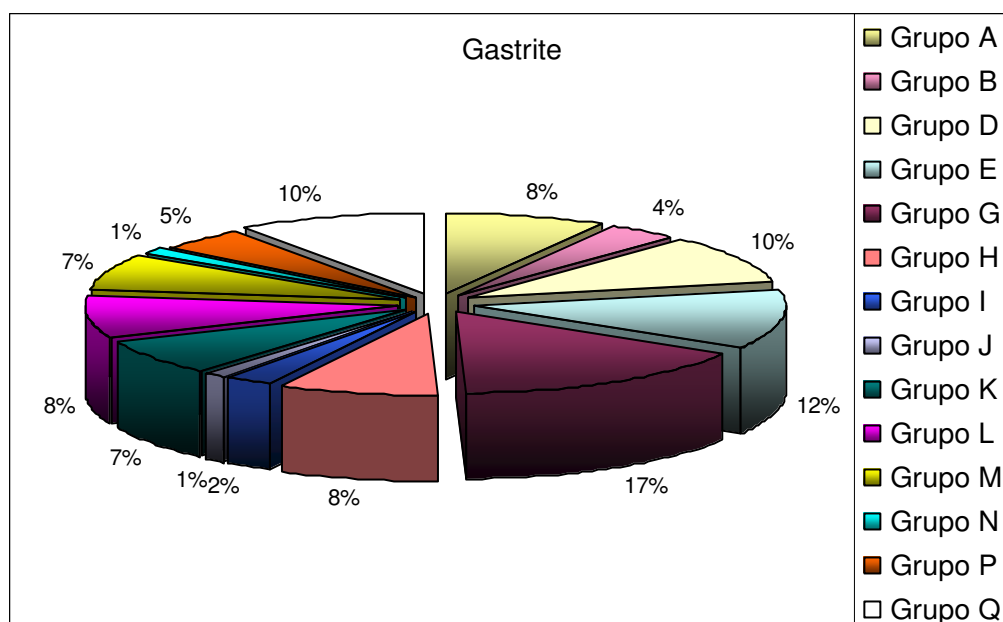


Figura 11 – gráfico demonstrativo dos grupos de genótipos obtidos com a enzima *Mbo I* para ureC nos pacientes com gastrite.

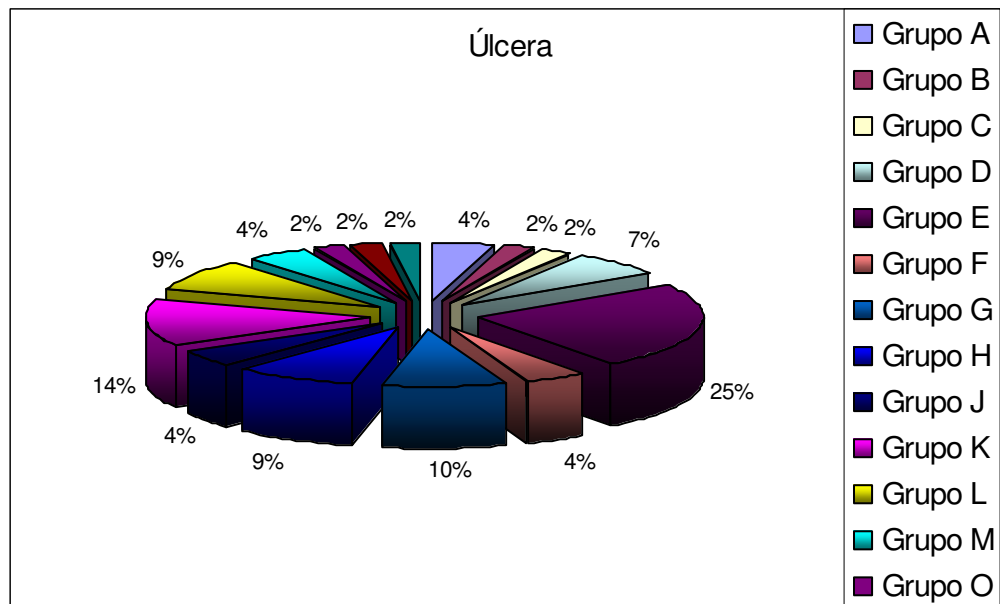


Figura 12 – gráfico demonstrativo dos grupos de genótipos obtidos com a enzima *Mbo I* para ureC nos pacientes com úlcera péptica.

5.5- Genotipagem dos fragmentos de 759 pares de bases obtidos na região do gene urease B

A genotipagem dos fragmentos obtidos pela PCR para a região do gene urease B do *H. pylori* foi realizada nas 128 amostras de DNA utilizando-se a enzima de restrição *Hae III*.

O grupo prevalente obtido com essa genotipagem foi o denominado grupo ureB I, com um fragmento único de 750 pares de bases. Esse grupo foi o prevalente tanto para os casos de úlcera péptica (27), com 60,0 % quanto para os de gastrite crônica (53), com 63,9 %. (figura 13).

O segundo grupo mais prevalente foi denominado ureB II, com fragmentos de aproximadamente 310 e 440 pares de bases, ocorrendo em 9 (20,0 %) dos casos de úlcera péptica e em 17 (20,5 %) dos casos de gastrite crônica. (figura 13).

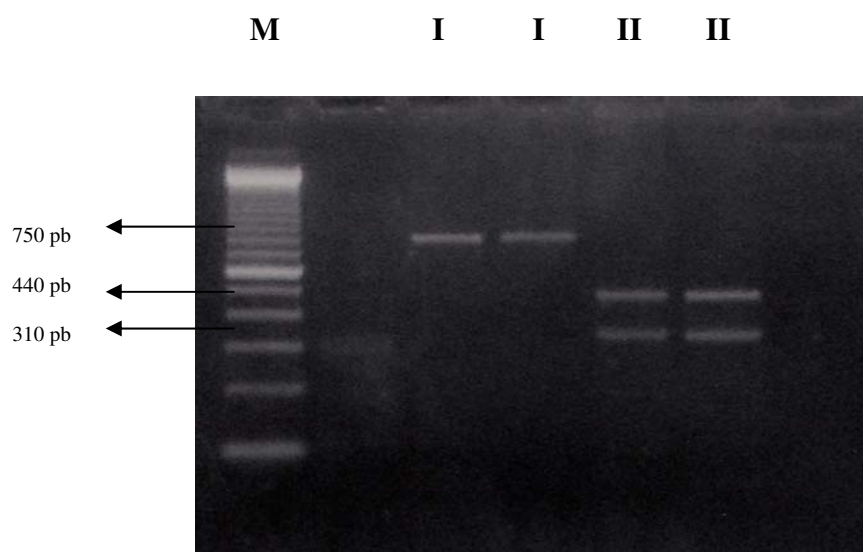


Figura 13 – Padrões de digestão dos produtos da PCR para ureB com a enzima *Hae III*. Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. M- marcador de peso molecular Ladder 100 pb. I – genótipo prevalente tanto

para gastrite quanto para úlcera péptica (750 pb). II – segundo genótipo mais prevalente (310, 440 pb).

Tabela 15 - Resultado da genotipagem dos produtos obtidos pela PCR para a região do gene urease B do *H. pylori* após digestão com enzima *Hae III*.

N = 128								
Grupos de Genotipagem								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	p valor
Gastrite	53 (63,9%)	17 (20,5%)	2 (2,4%)	2 (2,4%)	3 (3,6%)	2 (2,4%)	4 (4,8%)	0,171*
Úlcera	27 (60,0%)	9 (20,0%)	0 (0,0%)	4 (8,9%)	2 (4,4%)	3 (6,7%)	0 (0,0%)	

* Generalização do Teste Exato de Fisher

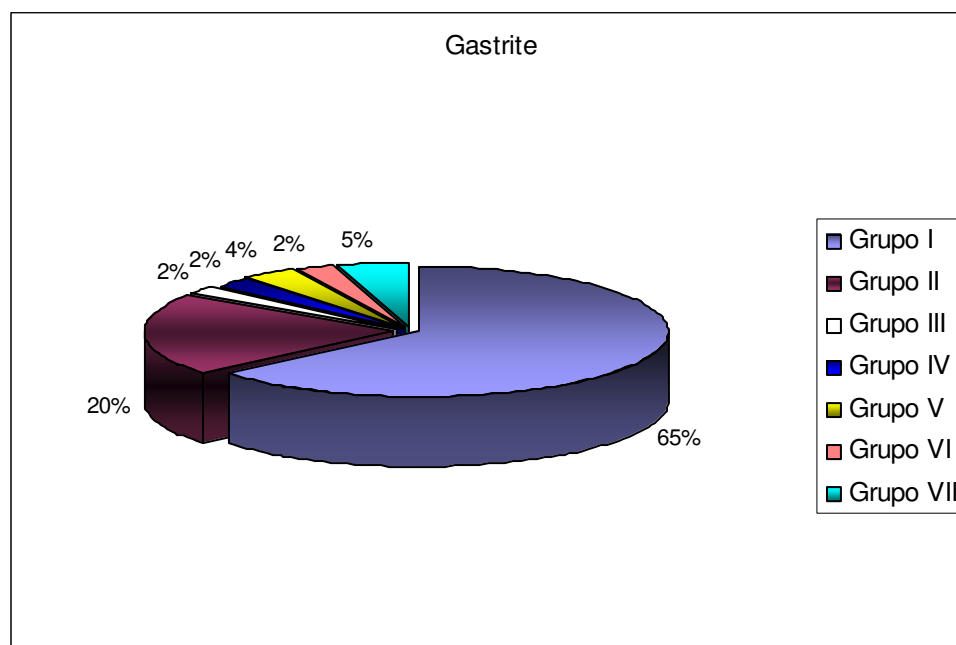


Figura 14 - gráfico demonstrativo dos grupos de genótipos obtidos com a enzima *Hae III* para ureB nos pacientes com gastrite.

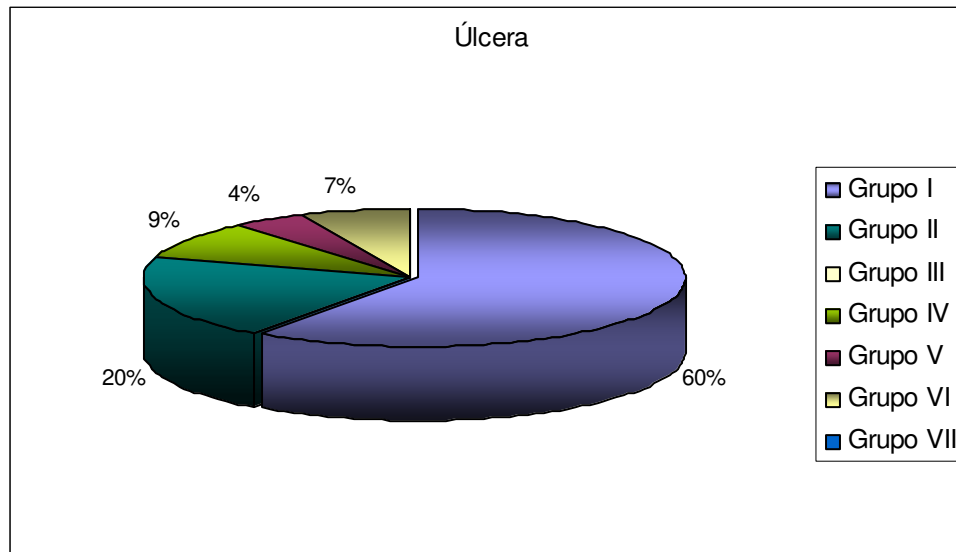


Figura 15 - gráfico demonstrativo dos grupos de genótipos obtidos com a enzima *Hae III* para ureB nos pacientes com úlcera péptica.

Quadro 2 - padrão da digestão dos produtos obtidos pela PCR para região do gene urease

B com a enzima *Hae III*

Ladder	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII
800pb	750pb						
700pb							
600pb				600pb			
500pb			480pb				
					470pb		
400pb		440pb				440pb	400pb
							350pb
300pb		310pb					
			270pb				
200pb						200pb	
					180pb		
				150pb			
100pb						110pb	
					100pb		

Tabela 16 - Resultados obtidos para os testes da urease, histologia, detecção do DNA da bactéria pela nested PCR, nested PCR para a região do gene urease C e PCR para a região do gene urease B nos pacientes estudados com diagnóstico de gastrite.

Amostra	Paciente	Teste da Urease	Histologia	Deteccção	Urease C	Urease B
R 08	A. D. A.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 09	J. L. F.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 10	S. C. R.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 12	J. D. A.	NR	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 14	J. P. R.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 16	D. A. F. L.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 20	S. L. C.	positivo	NR	positivo	positivo	positivo
R 51	W. S. C.	NR	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 52	J. A. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 53	M. L. R. L.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 55	V. M. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 58	M. A. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 60	O. G.	NR	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 65	A. G. R.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 69	J. B. P.	NR	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 73	L. C. C.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 74	V. C. N. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 81	K. C. P. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 86	A. T. T. T.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 87	M. F. L. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 88	F. B. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 90	A. D. A.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 92	S. B.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 95	C. B. R.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 97	W. V. O. P.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 98	C. M. R.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 99	O. G.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 100	E. S. S. P.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 101	R. M. S. R.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 103	M. G.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 104	L. G. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 105	N. F. H.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 107	N. B. B.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 111	F. P. M. N.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 112	M. A. T. G.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 113	S. C. G. F.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 114	J. C. F.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 115	M. B.	NR	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 116	R. L. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 117	A. T.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 118	E. O. J.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 119	J. O.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 121	I. P.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo

R 123	J. F. C.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 125	R. N. A. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 126	P. A. O.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 127	V. L. A.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 129	N. C. P. C.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 130	V. M. F.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 131	E. L.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 132	M. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 133	O. O.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 136	A. R.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 137	M. I. P.	NR	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 138	F. I. F.	NR	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 139	A. L. S.	NR	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 01	T. A. L.	positivo	NR	positivo	positivo	positivo
N 02	T. P. D. P.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 03	A. A. D.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 06	J. O. S.	negativo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 12	I. M. A.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 16	M. G. M. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 17	M. A. C.	positivo	NR	positivo	positivo	positivo
N 18	I. M.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 20	J. V. V.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 21	A. A. P.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 23	J. A. O.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 24	H. A. A.	positivo	NR	positivo	positivo	positivo
N 25	C. A. F. O.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 27	C. A. L. D.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 28	W. B.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 29	L. E. A.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 30	A. P. L.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 32	L. M.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 34	O. M.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 35	H. N. K.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 39	N. M.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 40	C. R. F.	negativo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 41	R. L. N.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 44	C. L. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 45	M. H. C. P.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 49	C. G. L.	inconclusivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 50	P. S. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo

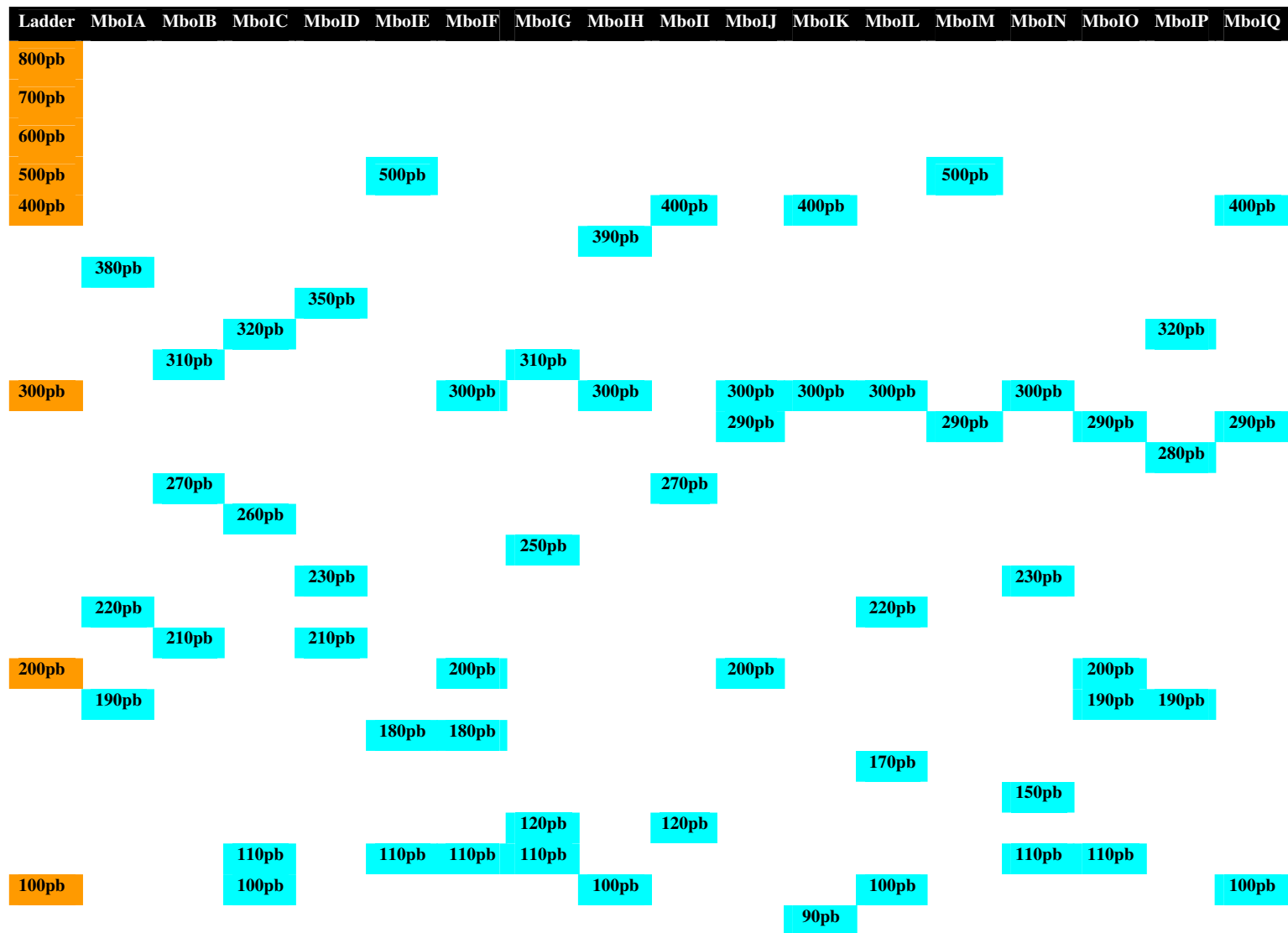
NR = não realizado

Tabela 17- Resultados obtidos para os testes da urease, histologia, detecção do DNA da bactéria pela nested PCR, nested PCR para a região do gene urease C e PCR para a região do gene urease B nos pacientes estudados com diagnóstico de úlcera.

AMOSTRA	PACIENTE	Teste da Urease	Histologia	Deteccção	Urease C	Urease B
R 21	R. A. C.	positivo	NR	positivo	positivo	positivo
R 46	S. F.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 50	B. C. O.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 59	A. S.	NR	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 64	M. M. R.	NR	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 66	A. P.	NR	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 75	S. M. M.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 76	J. A. S. I.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 77	E. J. M.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 78	L. I. F.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 80	J. A. R.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 82	E. S. F.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 83	M. L. L.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 84	M. E. P.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 85	N. M. B. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 89	V. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 93	A. P. S. F.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 94	J. A.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 96	L. F. D.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 102	M. T.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 109	R. F. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 110	N. B. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 120	J. V. C.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 122	J. D. A.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 124	A. W. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 128	N. P. P.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 135	C. A. C.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
R 140	M. I. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 07	R. L. O.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 09	F. F. C.	negativo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 10	D. L. B. G.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 11	F. G.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 13	M. A. G.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 14	L. C. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 15	G. C. S.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 26	A. B. S. N.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 31	M. S. P. P.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 33	L. P. O.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 36	A. J. E.	negativo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 37	A. A.	negativo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 38	T. A. B.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 42	N. M. B. R.	negativo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 43	F. L. S. A.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 46	A. C. P.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo
N 48	M. J. S. V.	positivo	Positivo	positivo	positivo	positivo

NR = não realizado

Quadro 1 – padrões de digestão dos produtos obtidos pela nested PCR para a região do gene urease C com a enzima Mbo I





6- DISCUSSÃO

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria de distribuição universal que acomete mais de 50% da população humana (Vandenplas *et al.* 2000). A presença do *H. pylori* é a causa principal de várias doenças gastrintestinais, incluindo gastrite crônica (Ashorn 1995; Kawaguchi 1996, Cover *et al.* 1996), úlcera péptica (Walsh *et al.* 1995, Dev *et al.* 1998, Testino *et al.* 2002; Bulent *et al.* 2003), câncer gástrico (Correa 1992, Ladeira *et al.* 2003) e linfoma gástrico MALT (Wotherspoon *et al.* 1993), sendo a bactéria classificada como carcinógeno tipo I pela Organização Mundial de Saúde (Dev *et al.* 1998, Ernst *et al.* 2000, Peterson *et al.* 2001, Kodaira *et al.* 2002, Blaser 2005).

Apesar de os mecanismos de transmissão não estarem completamente estabelecidos, sabe-se que esta ocorre principalmente na infância, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (Dunn *et al.* 1997, Malaty *et al.* 1999, Tindberg *et al.* 2001). Porém, há evidências de que nos países desenvolvidos os índices de contaminação pelo *H. pylori* estejam diminuindo, provocando um decréscimo nos índices de casos de úlcera péptica e até mesmo de câncer gástrico (Blaser 2005) embora pareça ocorrer um aumento das taxas de casos de doença do refluxo gástrico e de câncer esofágico. Essas informações levaram alguns pesquisadores, como de Martel e col. (2005) e Blaser (2005) à hipótese de que a presença da bactéria no trato gástrico possa proteger alguns indivíduos contra o desenvolvimento de determinadas doenças.

A infecção pelo *H. pylori* é de distribuição universal e apresenta um alto índice de prevalência. Conseqüentemente, um diagnóstico preciso, confiável e que possa ser utilizado rotineiramente para a identificação e diferenciação das cepas do *H. pylori* é muito importante. Também é fundamental a disponibilidade desses métodos para a monitorização do tratamento específico. Nesse diagnóstico, a determinação da cepa da bactéria presente em cada indivíduo é de extrema importância, não só para a identificação das cepas mais prevalentes em uma determinada região e em um determinado grupo de pacientes como também para a avaliação de pacientes que foram tratados para erradicação do microorganismo e que, posteriormente, foram reinfetados. Além disso, um mesmo indivíduo pode estar contaminado por mais de uma cepa, sendo uma delas mais virulenta e, portanto, responsável pelo desenvolvimento até mesmo de câncer gástrico.

Dessa maneira, o presente trabalho traz uma análise molecular sobre a relação e a prevalência de diferentes cepas do *H. pylori* obtidas de amostras de tecido gástrico por biópsia de pacientes com úlcera péptica ou com gastrite.

Em primeiro lugar, foi utilizada a nested PCR com primers de uma região inespecífica, mas conservada em todas as diferentes cepas, do genoma do *H. pylori* a fim de identificar a presença do DNA bacteriano em amostras de fragmentos da mucosa gástrica obtidas por biópsia. Essas amostras foram submetidas previamente a dois métodos diagnósticos rotineiros usados pelo Gastrocentro: a histologia e o teste da urease. Todas as amostras inseridas no nosso estudo apresentaram resultados positivos para estes testes, confirmando a presença da bactéria. Os primers descritos para essa região foram descritos por Victória e col. (2003).

Após isso, foi realizada a nested PCR com primers específicos para a amplificação da região do gene urease C do *H. pylori*, primers estes previamente descritos por Suzuki e col. (1999) e por Fujimoto e col. (1994). O produto final de amplificação foi de 798 pares de bases, sendo este submetido, posteriormente, à digestão com a enzima *Mbo I*, a fim de se identificarem diferentes cepas da bactéria.

Além disso, foi realizada a amplificação por PCR com primers específicos da região do gene urease B da bactéria, obtendo-se um produto final de 759 pares de bases, conforme descrito por Suzuki e col. (1999). Esse produto final foi, então, submetido à digestão com a enzima *Hae III*.

Os padrões genômicos de isolados de *H. pylori* têm demonstrado ser extremamente diversos quando se utilizam técnicas de biologia molecular para identificação de cepas dessa bactéria (Colding 1999).

Embora o *H. pylori* inicialmente induza a uma gastrite inflamatória aguda, a resposta imunológica conferida pelo hospedeiro é geralmente não suficiente para eliminar a infecção, que pode persistir por toda a vida. Além disso, a infecção com cepas múltiplas é comum e ocorre com maior frequência nos países em desenvolvimento (Logan 2001).

Diversos pesquisadores que utilizaram protocolos de biologia molecular para tipagem das cepas de *H. pylori* demonstraram que essa bactéria possui um grau notável de diversidade genética, o qual é intimamente relacionado com as características epidemiológicas e patológicas e com a dinâmica de transmissão (Tanahashi *et al.* 2000). A variabilidade genética é, inclusive, o fator responsável para a disseminação e persistência do *H. pylori* em todo o mundo (Majewski e Goodwin 1988).

A grande atividade da urease é um fator determinante na patogenicidade do *H. pylori* e, na região genômica da urease, a primeira a ser seqüenciada, os genes são altamente conservados (Owen *et al.*, 1998).

O gene urease C, atualmente denominado *glmM* (Foxall *et al.* 1992), é específico do *H. pylori* e pode ser usado para a identificação primária do microorganismo, fato comprovado por vários pesquisadores, dentre os quais, Moore e col. (1993), em cujo estudo não foi possível obter um produto de amplificação para a região do gene urease C quando os DNAs genômicos de várias outras bactérias gram-negativas e urease-positivas foram usados como amostras sob condições idênticas àsquelas usadas para as amostras do DNA do *H. pylori*.

Assim como o gene urease C, o gene urease B é altamente conservado e específico do *H. pylori*, podendo ser utilizado nas amplificações de PCR para estudos epidemiológicos (Mobley *et al.* 1996, Matsui *et al.* 2000).

Simsek e col. (2000) discutiram a importância da genotipagem para o correto tratamento, constatando que as modificações genômicas ocorridas no *H. pylori* podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos, resultando na diminuição da efetividade terapêutica. A genotipagem é, portanto, necessária para o diagnóstico e o planejamento de regimes terapêuticos. A análise por restrição (RFLP) é, assim, reportada por estes autores, como sendo o melhor método para a determinação de cepas dessa bactéria, sendo de grande importância para estudos epidemiológicos.

Colding e col. (1999) relataram análises por PCR para detecção do *H. pylori* diretamente em material gástrico obtido por biópsia, sendo seus achados condizentes com os de nosso trabalho. A análise de pequenos fragmentos amplificados das regiões dos genes

urease C e urease B demonstrou que a estrutura genômica do *H. pylori* é extremamente diversa quando se utilizam as enzimas de restrição *Mbo I* e *Hae III*. Apesar de esses autores relatarem infecções com diferentes cepas do microorganismo em um mesmo indivíduo, em nosso trabalho não foi encontrado esse tipo de infecção. Apenas um genótipo foi determinado para as amostras de cada indivíduo incluído no estudo.

Smith e col. (2003) realizaram um estudo com pacientes nigerianos utilizando a PCR para região do gene *glm M* (urease C), achando resultados confiáveis, altamente reproduzíveis e úteis para a avaliação da erradicação da bactéria e da monitorização do tratamento. No estudo desses pesquisadores, demonstrou-se a prevalência de uma cepa para os casos de dispepsia não-ulcerosa e porcentagens iguais de uma segunda cepa para os casos de dispepsia não-ulcerosa e de úlcera péptica estudados.

Muitos trabalhos também fazem comparações entre os diversos métodos diagnósticos que podem ser usados para identificação do *H. pylori*. Simsek e col. (2000) realizaram um estudo comparativo entre PCR – RFLP, cultura e exame histológico, observando que, destes, o primeiro apresenta maiores sensibilidade e especificidade. Lo e col. (2005) utilizaram a PCR e outros testes diagnósticos, invasivos e não invasivos, para detecção do *H. pylori* em pacientes com úlcera péptica hemorrágica, concluindo que a PCR é o método mais sensível para diagnóstico no caso destes pacientes.

As técnicas de nested-PCR – RFLP e PCR – RFLP têm sido amplamente utilizadas para tipagem e diferenciação de cepas de *H. pylori* obtidas de amostras clínicas. Esses métodos têm sido usados para analisar os genes do *H. pylori*, especialmente aqueles que codificam a enzima urease e proteínas acessórias (Tanahashi *et al.* 2000).

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a nested-PCR e a PCR seguidas da análise de restrição (RFLP) são técnicas que poderiam se tornar usuais e efetivas para determinação da diversidade genética relacionada ao gene urease do *H. pylori* existente entre amostras clínicas.

A análise dos produtos amplificados por nested PCR para a região do gene urease C originou 17 padrões de digestão com a enzima *Mbo I*. O grupo prevalente para os casos de gastrite crônica foi denominado ureC MboI G, com fragmentos de 110, 120, 250 e

310 pb, ocorrendo em 13 das amostras estudadas (15,7%). Para úlcera péptica, o grupo mais encontrado foi chamado de ureC MboI E, com fragmentos de 110, 180 e 500 pb, com prevalência de 24,4% (11 casos).

Em relação aos produtos amplificados para a região do gene urease B, 7 padrões foram determinados pela enzima *Hae III*. Tanto para os casos de úlcera quanto de gastrite, o mesmo padrão, denominado ure B I, com fragmento único de 750 pb, foi o prevalente, ocorrendo em 53 (63,9%) dos casos de gastrite crônica e em 27 (60,0%) dos de úlcera péptica.

Em conclusão, a nested PCR – RFLP e a PCR -RFLP são técnicas que apresentam uma excelente reprodutibilidade, um bom poder discriminatório e facilidades de performance e de interpretação dos resultados, podendo ser utilizadas para estudos epidemiológicos, para a diferenciação entre infecções pregressas e atuais, estudos de contaminação intra-familiares e nosocomiais e determinação das cepas prevalentes entre diferentes doenças. Além disso, pode ser usada para o acompanhamento do tratamento antimicrobiano, já que um mesmo indivíduo, mesmo tratado com sucesso, pode ser contaminado novamente com uma mesma cepa ou com uma cepa diversa da anterior.



7- CONCLUSÕES

As três técnicas de amplificação foram padronizadas e realizadas com sucesso para todas as regiões do genoma do *Helicobacter pylori* que serviram como alvo para as reações: nested PCR para detecção do DNA bacteriano, nested PCR para o gene urease C e PCR para o gene urease B.

A amplificação pela nested PCR para detecção ocorreu no total de 128 amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia, amostras já positivas para o teste da urease e para a histologia.

A amplificação da região do gene urease C pela nested PCR também foi possível nas 128 amostras estudadas, sendo os produtos obtidos analisados por restrição com a enzima *Mbo I*, resultando em 17 genótipos. O mais prevalente para os casos de gastrite foi chamado de UreC Mbo I G, com 110, 120, 250 e 310 pares de bases, representando 15,7% dos pacientes com gastrite. Para os casos de úlcera péptica, o genótipo mais prevalente foi chamado de UreC Mbo I E, com 110, 180 e 500 pares de bases, representando 24,4% dos casos de úlcera péptica.

Com relação à amplificação da região do gene urease B, foi encontrado um genótipo prevalente tanto para os casos de úlcera péptica quanto para os de gastrite. Este genótipo, com 750 pares de bases, foi encontrado em 60,0% dos casos de úlcera péptica e em 63,9% dos casos de gastrite, sendo denominado UreB I. Um segundo genótipo mais freqüente, também para ambas as doenças, foi chamado de UreB II, com 310 e 440 pares de bases, sendo 20,0% dos casos de úlcera péptica e 20,5% dos de gastrite.

No grupo estudado, de 128 amostras de fragmentos da mucosa gástrica obtidas por biópsia, não foi possível determinar uma diferença significativa entre as cepas que provocam úlcera péptica e gastrite crônica. Como nossa casuística não foi grande, mais estudos em relação à genotipagem e doença gastrointestinal, além de estudos sobre os fatores do hospedeiro, precisam ser feitos para conseguirmos entender melhor a relação entre o *H. pylori* e seus mecanismos fisiopatológicos de agressão ao hospedeiro.



8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed N. 23 Years of the Discovery of *Helicobacter pylori*: Is the debate over? Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2005; 4: 17-19.

Albenque M, Tall F, Dabis F, Mégraud F. Epidemiological study of *Helicobacter pylori* transmission from mother to child in Africa. Rev Esp Enferm Dig 1990; 78: 4-8.

Allen S J, Thomas J E, Alexander N D E, Bailey R, Emerson P M. Flies and *Helicobacter pylori* infection. Arch Dis Child 2004; 89: 1037-38.

Alm R A. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1999; 397 (6715): 176-80.

Ando T, Tsuzuki T, Mizuno T, Minami M, Ina K, Kusugami K *et al.* Characteristics of *Helicobacter pylori* – induced gastritis and the effect of *H. pylori* eradication in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Helicobacter 2004; 9 (5): 443-52.

Andrew A, Wyatt J L, Dixon M F. Observer variation in the assessment of chronic gastritis according to the Sydney System. Histopathol 1994; 25: 317-22.

Arvind A S, Cook R S, Tabaqchali S, Farthing M J. One-minute endoscopy room test for *Campylobacter pylori*. Lancet 1988; 1 (8587): 704.

Asaka M, Kimura T, Kato M, Kudo M, Miki K, Ogoshi K *et al.* Possible role of *Helicobacter pylori* infection in early gastric cancer development. Cancer 1995; 75: 2789-93.

Ashorn M. What are the specific features of *Helicobacter pylori* gastritis in children? Ann. Med. 1995; 27: 617-20.

Atherton J C, Cao P, Peek R M Jr., Tummuru M K, Blaser M J, Cover T L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. J Biol Chem 1995; 270 (30): 1771-7.

Atherton J C, Cover T L, Twells R J, Morales M R, Hawkey C J, Blaser M J. Simple and accurate PCR – based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1999; 37 (9): 2979-82.

Barresi G, Giuffré G, Vitarelli E.; Grosso, M.; Tuccari, G. The immunoexpression of Tn, sialyl-Tn and T antigens in chronic active gastritis in relation to *Helicobacter pylori* infection. *Pathology* 2001; 33: 298-302.

Bernersen B, Johnsen R, Bostad L, Straume B, Sommer A, Burhol P. Is *Helicobacter pylori* the cause of dyspepsia? *BMJ* 1992; 304: 1276-9.

Bhatia S J e Abraham P. *Helicobacter pylori* in the Indian environment. *Indian J Gastroenterol* 1995; 14: 139-44.

Blaser M J. *Helicobacter pylori*: microbiology of a slow bacterial infection. *Trends Microbiol* 1993; 1: 255-260.

Blaser M. J. Genetic basis for heterogeneity of *Helicobacter pylori*, p. 33-39. In HUNT, R. H.; TYTGAT, G. N. J. (editors), *Helicobacter pylori*: basic mechanisms to clinical cure. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1996.

Blaser M J e Berg D E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 2001; 107 (7): 767-73.

Blaser M J. An Endangered Species in the Stomach. *Scientific American* 2005; 24-31.

Bode G, Mauch F, Malfertheiner P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infect* 1993; 111: 483-90.

Bourguignon G, Croizé J, Riard P, Hostein J, Lenoc P. In vitro study of different media to detect urease of *Campylobacter pylori*. In MÉGRAUD, F.; LAMOULIATTE, H. (editors). *Gastroduodenal pathology and Campylobacter pylori*. ICS 847. Amsterdam: Elsevier, 49-52, 1989.

Brown L M. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. *Epidemiol Rev* 2000; 22 (2): 283-297.

Bulent K, Murat A, Esin A, Faith K, Murat H, Hakan H *et al*. Association of CagA and VacA presence with ulcer and non-ulcer dyspepsia in a Turkish population. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1580-1583.

Calvet X, Feu F, Forne M, Montserrat A, Elizalde J I, Viver J M *et al.* The evaluation of a new immunoenzyme analysis for the detection of *Helicobacter pylori* infection in stool samples. *Gastroenterol Hepathol* 1999; 22: 270-2.

Cammarota G, Tursi A, Montalto M, Papa A, Branca G, Vecchio F M *et al.* Prevention and treatment of low-grade B-cell primary gastric lymphoma by anti-*H. pylori* therapy. *J Clin Gastroenterol* 1995; 21: 118-122.

Canete A, Abunaji Y, Alvarez-Calatayud G, de Vicente M, Gonzalez-Holguera J A, Leralta M *et al.* Breath test using a single 50 mg dose of ¹³C-urea to detect *Helicobacter pylori* infection in children. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 2003; 36: 105-111.

Capurso G, Lahner E, Marcheggiano A, Caruana P, Carnuccio A, Bordi C *et al.* Involvement of the corporal mucosa and related changes in gastric acid secretion characterize patients with iron deficiency anaemia associated with *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1753-61.

Cave D R. How is *Helicobacter pylori* transmitted? *Gastroenterology* 1997; 133 (suppl 6): 9-14.

Cellini L, Allocati N, di Campli E, Masulli M, di Bartolomeo S, Dainelli B. *Helicobacter pylori* isolated from stomach corpus and antrum: comparison of DNA patterns. *J Infection* 1996; 32: 219-221.

Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree J E, Ghiara P, Borodovsky M *et al.* Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I – specific and disease – associated virulence factors. *Proc Natt Acd Sci USA* 1996; 93: 14648-53.

Christensen A H, Gjorrupt T, Hilden J, Fenger C, Henriksen B, Vyberg M *et al.* Observer homogeneity in the histologic diagnosis of *Helicobacter pylori*. Latent class analysis, kappa coefficient, and repeat frequency. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 933-39, 1992.

Clemens J *et al.* Impact of Infection by *H. pylori* on the risk and severity of endemic cholera. *J Infect Dis* 1995; 171: 1653-56.

Clemens J, Alpert M J, Rao M, Huda S, Qadr F, Van Loon F P L *et al.* Sociodemographic, hygienic and nutritional correlates of Bangladesh children. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 1113-8.

Coelho L G V e Zaterka S. II Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. *Arq Gastroenterol* 2005; 42: 128.

Cohen H, Laine L. Endoscopic Methods for the Diagnosis of *H. pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11 (suppl 1): 3-9.

Colding H, Hartzen S H, Roshanisehat H, Andersen L P, Krogfelt K A. Molecular methods for typing of *Helicobacter pylori* and their applications. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 24: 193-199.

Colding H, Hartzen S H, Mohammadi M, Herup K, Kristiansen J E, Andersen L P. Performance of PCR-restriction fragment polymorphism analyses of the *Helicobacter pylori* ureB gene in differentiating gene variants. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 57-60.

Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-40.

Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Sur Pathol* 1995; 19 (suppl 10): 537-543.

Costa F F e Costa S C B. Reação em Cadeia da Polimerase: princípios e aplicações clínicas. Polymerase Chain Reaction: principles and clinical applications. *Rev Bras Reumatol* 1992; 32: 142-6.

Coudron P E, Stratton C W. Factors affecting growth and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in liquid media. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1028-30.

Covacci A, Telford J L, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999; 284: 1328-33.

Cover T L e Blaser M J. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention. *Adv Int Med* 1996; 41: 85-117.

Czinn S J. *Helicobacter pylori* infection: detection, investigation and management. *The Journal of Pediatrics* 2005; 21-26.

Danesh J. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systemic review of the epidemiological studies. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 119: 205-210.

Debellis L, Papini E., Caroppo R, Montecucco C, Curci S. *Helicobacter pylori* cytotoxin vacA increases alkaline secretion in gastric epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281 (6): G1440-8.

Del Giudice G e Micheti P. Inflammation, immunity and vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2004; 9 (supl 1): S23.

de Carvalho Costa Cardinali L, Rocha G A, Rocha A M, de MOURA s b, DE Figueiredo Soares T, Esteves A M *et al.* Evaluation of ¹³C urea breath test and *Helicobacter pylori* stool antigen test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children from a developing country. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3334-5.

de Luis D A, Varela C, de La Calle H, Canton R, de Argila C M, San Roman A L *et al.* *Helicobacter pylori* infection is markedly increased in patients with autoimmune atrophic thyroiditis. *J Clin Gastroenterol* 1998; 26: 259-63.

de Martel C, Llosa A E, Farr S M, Friedman G D, Vogelmann J H, Orentreich N *et al.* *Helicobacter pylori* infection and the risk of development of esophageal adenocarcinoma. *J Infect Dis* 2005; 191: 761-7.

Desai H G, Gill H H, Shankaran K, Mehta P R, Prabhu S R. Dental plaque: a permanent reservoir of *Helicobacter pylori*? *Scand J Gastroenterol* 1991; 26: 1205-8.

Dev A T, Lambert J R. Diseases associated with *Helicobacter pylori*. *MJA* 1998; 169: 220-5.

Di Campi C, Gasbarrini A, Nucera E. Beneficial effects of *Helicobacter pylori* eradication on idiopathic chronic urticaria. Dig Dis Sci 1998; 143: 1226-9, 1998.

Dubois A, Berg D E, Incecik E T, Fiala N, Heman-Ackah L M, Perez-Perez G I *et al.* Transient and persistent experimental infection of nonhuman primates with *Helicobacter pylori*: implications for human disease. Infect Immunol 1996; 64: 2885-91.

Dunn B E, Cohen H, Blaser M. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997; 720-41.

Eisenberg J C, Czinn S J, Garhart C A, Redline R W, Bartholomeo W C, Gottwein J M *et al.* Protective efficacy of anti-*Helicobacter pylori* immunity following systemic immunization of neonatal mice. Infect Immunol 2003; 71: 1820.

El-Zimaity H M, Graham D Y, al-Assi M T, Malaty H, Karttunen T J, Graham D P *et al.* Interobserver variation in the histopathological assessment of *Helicobacter pylori* gastritis. Hum Pathol 1996; 27: 35-41.

Emilia G, Longo G, Luppi M, Gandini G, Morselli M, Ferrara *et al.* *Helicobacter pylori* eradication can induce platelet recovery in idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 2001; 97: 812-14.

Erdamn S E, Correa P, Coleman L A, Schrenze M D, Li X, Fox J G. *Helicobacter mustelae* – associated gastric MALT lymphoma in ferrets. Am J Pathol 1997; 151 (1): 273-280.

Ernst P B e Gold B D. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. Annu Rev Microbiol 2000; 54: 615-640.

Eskandarian R, Malek M, Mousavi SH, Babaei M. Association of *Helicobacter pylori* infection with cardiac syndrome X. Singapore Med J 2006; 47 (8): 704-706.

Eslick D, Lim L L Y, Byles J E, Xia H H X, Talley N J. Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: a meta-analysis. Am J Gastroenterol 1999; 94: 2373-9.

Evans D J Jr, *et al.* A sensitive and specific serologic test for detection of *Campylobacter pylori* infection. Gastroenterol 1989; 96: 1004-8.

Evans D J Jr, Evans D G, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Graham D Y *et al.* Characterization of *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun* 1995; 63 (6): 2213-20.

Ferguson D A Jr, Li C, Patel N R, Mayberry W R, Chi D S, Thomas E. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2802-4.

Fernandez H. Gênero *Helicobacter*. In Trabulsi L R *et al.* *Microbiologia*, 4^a. ed., São Paulo: Atheneu, 353-358, 2004.

Fernández M C, Munôz D S, Díaz E G, Gálan Jurado M V, Alonso C R. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection using urease rapid test in patients with bleeding duodenal ulcer: influence of endoscopic signs and simultaneous corporal and antral biopsies. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96 (9): 599-605.

Figueiredo C, Machado J C, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2005; 10 (1): 14-20.

Foxall P A, Hu L T, Mobley H L T. Use of polymerase chain reaction-amplified *Helicobacter pylori* urease structural genes for differentiation of isolates. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 739-741.

Fox J G. Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9 (suppl 2): 93-103.

Fox J G, Batchelder M, Marini R, Yan L, Handt L, Li X *et al.* *Helicobacter pylori*-induced gastritis in the domestic cat. *Infect Immunol* 1995; 63: 2674-81.

Fujimoto S B, Marshall B, Blaser M J. PCR-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (2): 331-4.

Galadari IH, Sheriff MO. The role of *Helicobacter pylori* in urticaria and atopic dermatitis. *Skinmed* 2006; 5 (4): 172-6.

Geis G, Suerbaum S, Forsthoff B, Laying H, Opferkuch P W. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 1993; 38: 371-7.

Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W *et al.* Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen adhesion. Proc Natt Acad Sci USA 1999; 96: 12778-83.

Goodman J K, Correa P, Aux H J J, Ramírez H, De Lany J P, Pepinosa O G *et al.* *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways. Am J Epidemiol 1996; 144: 290-299.

Goodwin C S, McCulloch R K, Armstrong J A, Wee S H. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. J Med Microbiol 1987; 19: 257-267.

Goodwin C S *et al.* *Campylobacter pylori* become *Helicobacter pylori*. Int J Bacteriol 1989; 39: 353-405.

Goodwin C S *et al.* Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* com. Nov., respectively. Int J Syst Bacteriol 1989; 39: 397-405.

Goodwin C S e Armstrong J A. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). Eur J Clin Microbiol 1990; 9: 1-13.

Goodwin C S, McCulloch R K, Armstrong J A, Tytgat G N. Choosing the best anti-*Helicobacter pylori* therapy: effect of antimicrobial resistance. Am J Gastroenterol 1996; 91: 1072-76.

Graham D Y, Malaty H M, Evans D G Evans D J Jr, Klein P D, Adam E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race and socioeconomic status. Gastroenterol 1991; 100: 1495-501.

Gramley W A, Asghar A, Frierson H F Jr, Powell SM. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. J Clin Microbiol 1999; 37: 2236-40.

Grubel P, Hoffman J S, Chong F K, Burstein N A, Mepani C, Cave D R. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1997; 35: 1300-3.

Hachem C Y, Clarridge J E, Evans D G, Graham D Y. Comparison of agar based media for primary isolation of *Helicobacter pylori*. J Clin Pathol 1995; 48: 714-716.

Handt L K, Fox J G, Dewhirst F E, Fraser G J, Paster B J, Yan L L *et al.* *Helicobacter pylori* isolated from domestic cat: public health implications. Infect Immunol 1994; 62: 2367-74.

Hazell S L, Lee A, Brady L, Hennessy W. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. J Inf Dis 1986; 153 (4): 658-663.

Hazell S L, Evans D J Jr, Graham D Y. *Helicobacter pylori*. J Gen Microbiol 1991; 137: 57-61.

Henriksen T H, Brorson O, Schoyen R, Thoresen T, Setegn D, Madebo T. Rapid growth of *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995; 14: 1008-11.

Hudson M J, Newell D G. Continuous culture of *Campylobacter pylori*. In: Ruiz-Palacios G M, Calva E, Ruiz-Palacios E R (editors): *Campylobacter V: Proceedings of the Fifter International Workshop on Campylobacter infections*. Puerto Vallarta, Mexico, 1991, p. 239-295.

Hulter K, Han S W, Enroth H, Klein P D, Opekun A R, Gilman R H *et al.* *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. Gastroenterol 1996; 110: 1031- 5.

Hunter P R e Gaston M A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 1988; 26: 2465-6.

Jenks P J e Kusters J G. Pathogenesis and virulence of *Helicobacter pylori*. Curr Op Gastroenterol 2000; 16 (1): S11-8.

Johsnton B A J, Reed P I, Ali M H. Prevalence of *Campylobacter pylori* in duodenal and gastric mucosa-relationship to inflammation. Scand J Gastroenterol 1988; 23: 69-75.

Kansau I, Raymond J, Bingen E, Courcoux P, Kalach N, Bergeret M *et al*. Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. Res Microbiol 1996; 147: 661-669.

Karel'skaia IA e Ignat'ev VK. Helicobacter pylori infection in patients with chronic hives and asthma. Klin Med 2005; 83 (3): 58-61.

Kawaguchi H, Haruma K, Komoto K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G. *Helicobacter pylori* infection is the major risk factor for atrophic gastritis. Am J Gastroenterol 1996; 91: 959-962.

Kelly S M, Pitcher M C, Farmery S M, Gibson G R. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. Gastroenterol 1994; 107: 1671-4.

Kist M, Glocker E, Suerbaum S. Pathogenesis, diagnostics and treatment of *Helicobacter pylori* infection. Bundesgesundheitsblatt G G 2005; 48 (6): 669-78.

Klein P D, Graham D Y, Opekun A R, Sekely S. Helicobacter (Campylobacter) pylori is a waterborne disease in Peruvian children. Gastroenterol 1990; 98 (5): a69.

Klein P D, Graham D Y, Gaillour A, Opekun A R, Smith E O. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointest. Physiol. Working Group. Lancet 1991; 337: 1503-6.

Kodaira M S, Escobar A M U, Grisi S. Aspectos Epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na Infância e Adolescência. Rev Saúde Pública 2002; 36 (3): 356-369.

Kosunen T U, Seppala K, Sarna S, Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 1992; 1: 893-5.

Kowalski M. *Helicobacter pylori* infection in coronary artery disease: influence of *H. pylori* eradication on coronary artery lumen after percutaneous transluminal coronary angioplasty. The detection of *H. pylori* specific DNA in human coronary atherosclerotic plaque. J Physiol Pharmacol 2001; 52 (Suppl 1): 3-31.

Labigne A, Cussac V, Courcoux P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. J Bacteriol 1991; 173: 1920-1931.

Ladeira M S P, Salvador D M F, Rodrigues M A M. Biopathology of *Helicobacter pylori*. J Bras Patol Med Lab 2003; 39 (4): 335-342.

Laine L, Estrada R, Trujillo M, Knigge K, Fennetty M B. Effect of proton-pump inhibitor therapy on diagnostic testing for *Helicobacter pylori*. Ann Intern Med 1998; 129: 545-550.

Latchman D S. PCR Applications in Pathology. Principles and Practice. Oxford University Press, 1995.

Lee A. The *Helicobacter pylori* genome – new insights into pathogenesis and therapeutics. New Eng J Med 1998; 338 (12): 833-834.

Leung W K, Sung J J, Ling T K, Siu K L, Cheng A F. Use of chopsticks for eating and *Helicobacter pylori* infection. Dig Dis Sci 1999; 44: 1173-6.

Li C, Ferguson D A Jr., Ha T, Chi D S, Thomas E. A highly specific and sensitive DNA probe derived from chromosomal DNA of *Helicobacter pylori* is useful for typing *H. pylori* isolates. J Clin Microbiol 1993; 31 (8): 2157-62.

Li C, Musich P R, Ha T, Ferguson D A Jr, Patel N R, Chi D S *et al*. High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay. J Clin Pathol 1995; 48: 662-6.

Li C, Ha T, Ferguson D A Jr, Chi D S, Zhao R, Patel N R *et al*. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. Dig Dis Sci 1996; 41: 2142-9.

- Lo C C, Lai K H, Peng N J, Lo G H, Tseng H H, Lin C K *et al.* Polymerase chain reaction: a sensitive method for detecting *Helicobacter pylori* infection in bleeding peptic ulcers. *W J Gastroenterol* 2005; 11 (25): 3909-14.
- Logan R P H e Berg D E. Genetic diversity of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1996; 348: 1462-3.
- Logan R P H e Walker M M. ABC of the upper gastrointestinal tract: Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ* 2001; 323 920-2.
- Lu H, Hsu P, Graham D Y, Yamaoka Y. Duodenal Ulcer Promoting Gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol* 2005; 128: 833-848.
- Madinier I M, Fosse T M, Monteil R A. Oral carriage of *Helicobacter pylori*: a review. *J Periodontol* 1997; 68: 2-6.
- Magalhães A F N *et al.* Gastrite por *Helicobacter pylori*. Quando e como tratar. *GED* 1996; 15: 115.
- Magalhães A F N e Zeitune J M R. Gastrite por *Helicobacter pylori* deve ser classificada como doença. *GED* 1997; 16: 247.
- Majewski S I e Goodwin C S. Restriction endonuclease analysis of the genome of *Campylobacter pylori* with a rapid extraction method: evidence for considerable genomic variation. *J Infect Dis* 1988; 157 (3): 465-71.
- Makristathis A, Pasching E, Schutze K, Wimmer M, Rotter M L, Hirschl A M. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2772-4.
- Malaty H M, Graham D Y, Wattigney S, Osato M, Berenson G S. Natural history of *Helicobacter pylori* infection in childhood: 12-year follow-up cohort study in a biracial community. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 279-282.
- Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Bell D, Bianchi Porro G, Deltenre M *et al.* Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht Consensus Report. The European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG). *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9 (1): 1-2.

Mapstone N P, Lynch D A, Lewis F A, Axon A T, Tompkins D S, Dixon M F *et al.* Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. J Clin Pathol 1993; 46: 540-543.

Marshall B J e Warren J R. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983; 1273-5.

Marshall B J, Mc Gechie D B, Rogers P A, Glancy R J. *Campylobacter pylori* infection and gastroduodenal disease. Med J Aust 1985; 142: 439-444.

Marshall B J, Armstrong J A, Mc Gechie D B, Glancy R J. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. Med J Aust 1985; 1 (42): 436-9.

Marshall B J, Warren J R, Graham J F, Langston S R, Goodwin C S, Blincow E D. Rapid urease test in the management of *Campylobacter pyloridis* – associated gastritis. Am J Gastroenterol 1987; 82: 200-210.

Matsui H, Kubo Y, Ninomiya T, Mizunami I Y, Onji M. Recurrence of gastric ulcer dependent upon strains differences of *Helicobacter pylori* in urease B genes. Dig Dis Sc 2000; 45 (1): 49-54.

Mc Nulty C A, Gearty J C, Crump B, Davis M, Donovan I A, Melikian V *et al.* *Campylobacter pyloridis* and associated gastritis: investigator-blind, placebo-controlled trial of bismuth salicylate and erythromycin ethylsuccinate. Br Med J 1986; 293: 5645-49.

Mégraud F. Transmission of *Helicobacter pylori*: fecal-oral versus oral-oral route. Aliment Pharmacol Ther 1995; 9 (suppl 2): 85-91.

Mégraud F. Advantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori*. Scand J Gastroenterol 1996; 31 (suppl 215): 57-62.

Mendall M A e Northfield T C. Transmission of *Helicobacter pylori* infection. Gut 1995; 37: 1-3.

Mendall M A e Pajares-Garcia J. Epidemiology and Transmission of *Helicobacter pylori*. Curr Opin Gastroenterol 1995; 11: 1-4.

Menezes Silva C H P. Bacteriologia: um texto ilustrado. Rio de Janeiro: Eventos, 1999, p. 236-9.

Mobley H L T. The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10: S57-64.

Molyneaux A J e Harris M D. *Helicobacter pylori* in gastric biopsies – Should you trust the pathology report? *J R Coll Physicians London* 1993; 27: 119-120.

Moore R A, Kureishi A, Wong S, Bryan L E. Categorization of clinical isolates of *Helicobacter pylori* on the basis of restriction digest analyses of polymerase chain reaction-amplified ureC genes. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (5): 1334-5, 1993.

Morris A e Nicholson G. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol* 1987; 82: 192-199.

Murray L J, Bamfort K B, O'Reilly D P J, McCrum E, Evans A E. *Helicobacter pylori* infection: relation with cardiovascular risk factors, ischaemic heart disease, and social class. *Br Heart J* 1995; 74: 497-501.

Murray P R, Rosenthal K S, Kobayashi G S, Pfaller M A. Microbiologia Médica. 3a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 209-214.

Naito Y e Yoshikawa T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori* – induced inflammation and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (3): 323-336.

Namavar F, Roosendaal R, Kuipers E J, de Groot P, van der Bijl M W, Pena A S *et al.* Presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity, esophagus, stomach and feces of patients with gastritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 234-237.

Newton C R e Graham A. PCR, 2a. ed., UK: Cheshire, 1997.

Nguyen A M, el-Zaatari F A, Graham D Y. *Helicobacter pylori* in the oral cavity. A critical review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79: 705-709.

Nilus M, Strohle A, Bode G, Malfertheiner P. Coccoid like forms (CLF) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 1993; 280: 259-272.

Niv Y, Abukisis G, Koren R. ¹³C urea breath test, referral patterns, and results in children. J Clin Gastroenterol 2003; 37: 142-146.

Nomura A, Stemmermann G N. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. J Gastroenterol Hepatol 1993; 8: 294-303.

Oh J D, Kling-Backhed H, Giannakis M, Xu J, Fulton R S, Fulton L A *et al.* The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103 (26): 9999-10004.

Oplustil C P, Zocolli C M, Tobouti N R, Sinto S I. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica, São Paulo: Sarvier, 2000, p. 136-138.

Osato M S, Ayub K, Le H H, Reddy R, Graham D Y. Houseflies are an unlikely reservoir or vector for *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1998; 36: 2786-8.

Oshono A, Gillam D, Botha A, Tunio M, Holton J, Boulos P *et al.* *Helicobacter pylori*: the mouth, stomach and gut axis. Ann Periodontol 1998; 3: 276-280.

Owen R J, Slater E R, Xerry J, Peters T M, Teare L E, Grant A. Development of a scheme for genotyping *Helicobacter pylori* based on allelic variation in urease subunit genes. J Clin Microbiol 1998; 36: 3710-3712.

Parente J M L. Prevalência da infecção pelo *Helicobacter pylori* em crianças até 12 anos de idade – Campinas, 2003 (Dissertação – Mestrado – Universidade Estadual de Campinas)

Parsonnet J, Friedman G D, Vandersteen D P, Chang Y, Vogelstein T H, Orentreich N, Sibley R K. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 1991; 325: 1127-1131.

Parsonnet J H, Hansen S, Rodriguez L. *Helicobacter pylori* infection in gastric lymphoma. N Engl J Med 1994; 330: 1267-71.

Parsonnet J, Friedman G D, Oreintreich N, Vogelmann H *et al.* Risk for gastric cancer in people with cagA positive or cagA negative *Helicobacter pylori* infection. Gut 1997; 40: 297-301.

Parsonnet J H, Shmueli H, Haggerty T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. JAMA 1999; 282: 2240-5.

Patel P, Mendall M A, Carrington D, Strachan D P, Leathan E, Molineaux N *et al.* Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. BMJ 1995; 311: 711-714.

Peek R M, Blaser M J, Mays D J, Forsyth M H, Cover T L, Song S Y *et al.* *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. Cancer Res 1999; 59: 6124-31.

Perez-Perez G I, Taylor D N, Bodhidatta L, Wongsrichanalai J, Base W B, Dunn B E *et al.* Seroeprevalence of *Helicobacter pylori* in Thailand. J Infect Dis 1990; 161: 1237-41.

Perri F, Maes B, Geypens B *et al.* The influence of isolated doses of drugs, feeding and colonic bacterial ureolysis on urea breath test results. Aliment Pharmacol Ther 1995; 9: 705-709.

Perri F, Qasim A, Marras L, O'Morain C. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2003; 8 (suppl. 1): 53.

Peterson W L, Fendrick A M, Cave D R, Penra D A, Carabedian-Ruffalo S M, Laine L. Doença relacionada ao *Helicobacter pylori*: Diretrizes para Diagnóstico e Tratamento. JAMA Brasil 2001; 5 (1): 60-68.

Pieniazek P, Karczewska E, Duda A, Tracz W, Pasowicz M Konturek S J. Association of *Helicobacter pylori* infection with coronary heart disease. J Physiol Pharmacol 1999; 50 (5): 743-751.

Pounder R E. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Aliment Pharmacol Ther 1995; 9 (2): 33-39.

Price A B. The Sydney System: histological division. J Gastroenterol Hepathol 1991; 6: 209-222.

Pytko-Poloczyk J, Konturek S J, Karczewska E, Bielanski W, Kaczmarczyk-Stachowska A. Oral cavity as permanent reservoir of *Helicobacter pylori* and potential source of reinfection. J Physiol Pharmacol 1996; 47: 121-129.

Queiroz D M, Mendes E N, Rocha G A. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol 1987; 25: 2378-2379, 1987.

Queiroz D M, Mendes E N H. *Helicobacter pylori* e outros microrganismos espiralados gástricos: aspectos microbiológicos. In: CASTRO, L. P.; ROCHA, P. R. S.; COELHO, L. G. V. (editores). Tópicos em Gastroenterologia. São Paulo: Medsi, 1993. p. 235-248, v. 4.

Queiroz D M, Mendes E N, Rocha G A, Oliveira A M, Oliveira C A, Magalhães P P *et al.* CagA-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. Int J Cancer 1998; 78: 135-139.

Rauws E A J, Tytgat G N J. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 1990; 335: 1233-5.

Ritcher I J E, Folk G W, Vaezi M F. *Helicobacter pylori* and gastro-esophageal reflux disease: the bug may not be all bad. Am J Gastroenterol 2005; 93: 1800-02.

Robertson B, Labigne A. Sequencing of PCR products. In “*Helicobacter pylori*: techniques for clinical diagnosis and basic research” (A. Lee & F. Mégraud) pp 146-151, W. B. Sanders Company, London.

Rocha G A, Queiroz D M, Mendes E N, Barbosa A J, Lima G F Jr, Oliveira C A *et al.* *Helicobacter pylori* acute gastritis: histological, endoscopical, clinical, and therapeutic features. Am J Gastroenterol 1991; 1592-95.

Romaniuk P J, Zoltowska B, Trust T J, Lane D J, Olsen G L, Pace N R *et al.* *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. J Bacteriol 1987; 169 (5): 2137-41.

Rothenbacher D, Bode G, Berg G, Gommel R, Gonser T, Adler G, Brenner H. Prevalence and determinants of *Helicobacter pylori* infection in preschool children: a population-based study from Germany. Int J Epidemiol 1998; 27: 135-141.

Saiki R K, Gelfand S, Stoffel S. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239: 487-491.

Sasaki Y, Yoshito T, Sata M, Fuji Y, Matsubara F, Zhao M *et al.* *Helicobacter pylori* in the natural environment. Scand. J. Infect. Dis 1999; 31: 275-279.

Satin B, del Giudice G, Della Bianca V, Dusi S, Laudanna C, Tonello F *et al.* The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. J. Exp. Med 2000; 191 (9): 1467-76.

Schütze K, Hentschel E, Dragosis B, Hirschl A M; *Helicobacter pylori* reinfection with identical organisms: transmission by the patients spouses. Gut 1995; 36: 831-833.

Shimada T, Ogura K, Ota S, Terano A, Takahashi M, Hamada E *et al.* Identification of *Helicobacter pylori* in gastric specimens, gastric juice, saliva and feces of Japanese patients (Letter). Lancet 1994; 343: 1636-7.

Simsek I S, Menevse S, Sahin F I. PCR and RFLP analysis for identification and typing of *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric biopsy specimens. Tohoku J Exp Med 2000; 190: 213-222.

Smith S I, Chibututu C, Anomneze E, Atimomo C, Atoyebi O, Ndububa D *et al.* Molecular typing of Nigerian *Helicobacter pylori* isolates by glmM restriction fragment length polymorphism. Biomed Science in Brief 2003; 170-172.

Staat M A, Kruszon-Moran D, McQuillan G M, Kaslow R A. A population-based serologic survey of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents in the United States. J Infect Dis 1996; 174: 1120-3.

Sullivan P B, Thomas J E, Wight D G D, Neale G, Easham E J, Corrah T *et al.* *Helicobacter pylori* in Gambia children with chronic diarrhea and malnutrition. Arch Dis Child 1990; 65: 189-191.

Suzuki J, Muraoka H, Kobayasi I, Fujita T, Mine T. Rare Incidence of Interpousal Transmission of *Helicobacter pylori* in asymptomatic individuals in Japan. J Clin Microbiol 1999; 37 (2): 4174-6.

Tanahashi T, Kita M, Komada T, Sawai N, Yamaoka Y, Mitsufuji S, Katoh F. Comparison of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and PCR-direct sequencing methods for differentiating *Helicobacter pylori* ureB gene variants. J Clin Microbiol 2000; 38 (1): 165-169.

Tebbe B, Geilen C C, Schulzke J D. *Helicobacter pylori* infection and chronic urticaria. J Am Acad Dermatol 1996; 34: 685-686.

Testino G, Cornaggia M, de Iaco F. *Helicobacter pylori* influence on gastric acid secretion in duodenal ulcer patients diagnosed for the first time. Pan Minerva Med 2002; 44: 19-22.

Thijs J C, Van Zwet A A, Thijs W J, Oey H B, Karrenbeld A, Stellaard F *et al.* Diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: a prospective evaluation of their accuracy, without selecting a single test as the gold standard. Am J Gastroenterol 1996; 91 (10): 2125-29.

Thomas J E, Gibson G R, Darboe M K, Dale A, Weaver L T. Isolation of *Helicobacter pylori* from human feces. Lancet 1992; 340: 1194-5.

Thomsen L L, Gavin B J, Tasman-Jones C. Relation of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa in chronic gastritis of the antrum. Gut 1990; 32 (1): 230-236.

Tindberg Y, Bengtsson C, Granath F, Blennow M, Nyrén O, Granstrom M. *Helicobacter pylori* infection in Swedish school children: lack of evidence of child-to-child transmission outside the family. Gastroenterol 2001; 121: 310-316.

Tomb J F, White O, Kerlavage A R, Clayton R A, Sutton G G, Fleischmann R D *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-547.

Tombola F, Morbiato L, del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M, Papini E. The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J Clin Invest* 2001; 108 (6): 929-937.

Trevisani L, Sartori S, Galvani F, Rossi M R, Ruina M, Chiamenti C *et al.* Evaluation of a new enzyme immunoassay for detecting *Helicobacter pylori* in feces: a prospective pilot study. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1830-3.

Tummuru M K R, Sharma S A, Blaser M J. *Helicobacter pylori* pic B, a homolog of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 1995 18: 867-876.

Vaira D, Malfertheiner P, Mégraud F, Axon A T, Deltene M, Hirschl A M *et al.* Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen based assay: multicentre study. *Lancet* 1999; 354: 30-33.

Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R *et al.* Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* Taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. *Nov Int J Syst Bacteriol* 1991; 41 (1): 88-103, 1991.

Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 20-31.

Van-Doorn L J, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W *et al.* Clinical relevance of the cagA, vacA and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol* 1998; 115: 59-66.

Versalovic J. *Helicobacter pylori*: Pathology and Diagnostic Strategies. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 403-412.

Victória J M N, Kalapothakis E, Correia Silva J F, Gomez R S. *Helicobacter pylori* DNA in recurrent aphthous stomatitis. J Oral Pathol Med 2003; 32: 219-23.

Vincent P, Gottrand F, Pernes P, Husson M A, Beju A, Leclerc H *et al.* *Helicobacter pylori* infection in cohabiting children. Lancet 1991; 337: 848.

Zeitune J M R, Monici LT. Gastrites. Rev Bras Med 2000; 57: 33-43.

Zentinlin P, Seriole B, Dulbecco P, Caratto E, Liritano E, Fasciolo D *et al.* Eradication of *Helicobacter pylori* may reduce disease severity in rheumatoid arthritis. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 1291-9.

Zhang L, Blot W J, You W C, Chang Y S, Kneller R W, Jin M L *et al.* *Helicobacter pylori* antibodies in relation to precancerous gastric lesions in a high-risk Chinese population. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1996; 5: 627-30.

Walsh J H, Peterson W L. Drug Therapy: The Treatment of *Helicobacter pylori* Infection in the Management of Peptic Ulcer Disease. N Engl J Med 1995; 333: 984-991.

Walsh J H. A pH – sensitive channel regulates urea across to *Helicobacter pylori* urease. Gastroenterol 2000; 118: 249-250.

Warren J R, Marshall B J. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984; 16: 1311-5.

Watanabe Y, Kurata J H, Mizuno S, Mukai M, Inokuchi H, Miki K, Ozaka K, Kawai K. *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Cancer: a Nested Case – Control Study in a Rural Area of Japan. Dig Dis Sci 1997; 42 (7): 1383-87.

Weeks D L, Eskandari S, Scott D R, Sachs G. A H⁺ - gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. Science 2000; 287: 482-485.

Weeks D L, Sachs G. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol 2001; 40 (6): 1249-59.

West A P, Millar M R, Tompkins D S. Effect of physical environment on survival of *Helicobacter pylori*. J Clin Pathol 1992; 45: 228-231.

Westblom T U, Fritz S B, Phadnis S, Midkiff B R, Leon-Barua R, Recavarren S *et al*. PCR Analysis of Peruvian Sewage Water: support for fecal-oral spread of *Helicobacter pylori*. Acta Gastroenterol Belg 1993; 56 (suppl 47)

Wotherspoon A C, Doglioni C, Oiss T C, Pan L, Moschini A, deBoni M, Isaacson P G. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 1993; 342: 575-577.

Wright P A, Wynford-Thomas D. The Polymerase Chain Reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. J Pathol 1990; 162: 99-117.



9-ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,

RG: _____, aceito colaborar com o estudo “*Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera e gastrite: detecção pela nested PCR e pela PCR e genotipagem pelos genes *urease C* e *urease B*”, que será realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para pesquisa da bactéria *H. pylori* pela reação em cadeia da polimerase. Para isso, sei que colherão amostras de tecido gástrico por biópsia no momento do exame endoscópico ao qual serei submetido(a) no Gastrocentro da Unicamp, para a realização de diagnóstico de patologia digestiva, sendo um pequeno fragmento desta amostra utilizado para a reação em cadeia da polimerase. Estou ciente de que poderei desistir de participar deste estudo a qualquer momento, e que isto em nada irá prejudicar o meu tratamento. Sei que a minha colaboração em muito auxiliará o tratamento dos pacientes que vierem a apresentar futuras doenças gástricas. Estou ciente também de que todos os dados colhidos serão mantidos em total sigilo, e que meu nome não será colocado em qualquer publicação.

Campinas, _____ de _____ de 200____.

Assinatura do paciente ou responsável

Pesquisadora responsável: Bruna Maria Roesler – RA: 030277

Contato: roesler@linkway.com.br – tel: (19) 37887734 / (19) 35413719

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Contato: costa@fcm.unicamp.br – tel: (19) 37887734 / (19) 32892351

Comitê de Ética em Pesquisa – tel: (19) 37888936