

TELMA BARBOSA DE OLIVEIRA

***HELICOBACTER PYLORI* EM PACIENTES COM PÚRPURA
TROMBOCITOPÊNICA IDIOPÁTICA**

CAMPINAS

Unicamp

2008

TELMA BARBOSA DE OLIVEIRA

***HELICOBACTER PYLORI* EM PACIENTES COM PÚPURA
TROMBOCITOPÊNICA IDIOPÁTICA**

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: PROF ^A. DR ^A. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

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

OL4h Oliveira, Telma Barbosa de
 “*Helicobacter pylori* em pacientes com Púrpura Trombocitopênica
 Idiopática” / Telma Barbosa de Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

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

1. *Helicobacter pylori*. 2. Púrpura trombocitopênica Idiopática. 3.
Púrpura (Patologias) – Aspectos Imunológicos. I. Costa, Sandra
Cecília Botelho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : *Helicobacter pylori* and idiopathic thrombocytopenic
Púrpura**

Keywords: • *Helicobacter Pylori*
 • Purpura, Trombocytopenic, Idiopathic
 • Purpura, Pathology – Immunologic aspects

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

**Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa
Prof Dr Luís Ernesto de Almeida Troncon
Prof Dr Rogério Antunes Pereira Filho**

Data da defesa: 30 - 01 - 2008



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. Luiz Ernesto de Almeida Troncon

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

Data: 30/01/2008

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares, que me apoiaram em todos os momentos de dificuldade.

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

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

Ao Dr. Erich Vinicius de Paula, pela paciência, confiança e respeito ao meu trabalho.

A minha amiga Bruna Maria Rõesler, pela amizade e confiança em todos os momentos de dificuldade.

AGRADECIMENTOS

A Nossa Senhora Aparecida, por estar presente em todos os momentos de minha vida, na dificuldade e na alegria, todos os dias, sem nunca me desamparar.

Aos meus familiares que, mesmo de longe, estiveram sempre presentes.

À Teca, do Banco de Sangue da Puccamp, por ajudar-me a chegar ao Mestrado, uma etapa muito importante da minha vida profissional.

Às amigas Sandra, Juliana, Cristiane e Daniela, pela amizade e, em especial, pelo incentivo nos momentos difíceis.

Aos queridos amigos, Marcinha e Rogério do Laboratório de Epidemiologia da Unicamp.

Ao André, pela amizade e ajuda em todos os momentos, desde o início do Mestrado até o final. Jamais esperaria encontrar uma pessoa assim, com tantas qualidades.

Ao Sérgio, pela amizade e ajuda nos gráficos, sempre amigo de verdade.

À Susana, pela amizade e ajuda.

Débora e Carla, pela amizade e convivência no Laboratório.

Ronaldinho, pelo incentivo, auxílio e companheirismo.

À equipe de endoscopia do Gastrocentro da Unicamp e ao Dr. Ciro Garcia Montes, pelo auxílio na coleta das amostras de tecido gástrico usadas neste estudo.

À secretária Ana Diva, pela amizade, sempre otimista, e pela eficiência como profissional.

À enfermeira chefe do Gastrocentro, Ana Lúcia, pelo auxílio na coleta das amostras e agendamento dos pacientes.

À equipe do Ambulatório do Hemocentro, pela ajuda, dedicação e auxílio na pesquisa.

À farmacêutica Nancy e às biólogas Natalícia e Elizabeth, do Laboratório de Bacteriologia e Hepatologia do Gastrocentro, pelo auxílio.

À Dra Luciana e à técnica administrativa do Laboratório de Patologia do Gastrocentro, Judith, pela paciência e pelo auxílio com os laudos histológicos dos pacientes.

E, mais uma vez, à minha amiga Bruna, que esteve sempre presente na alegria e na tristeza, mas sempre otimista de que tudo daria certo.

*“Nenhum vento sopra
a favor de quem não
sabe para onde ir “*
(Lucius Annaeus)

*“O mundo é um belo livro,
mas pouco útil para quem
não o souber ler”*

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xviii</i>
ABSTRACT.....	<i>xx</i>
1- INTRODUÇÃO.....	22
1.1- <i>Helicobacter pylori</i>.....	23
1.2- Características microbiológicas do <i>H. pylori</i>.....	24
1.3- Infecção pelo <i>H. pylori</i>.....	25
1.4- Marcadores de virulência da bactéria <i>H. pylori</i>.....	26
1.4.1- Gene <i>cagA</i>	26
1.4.2- Gene <i>vacA</i>	27
1.4.3- Gene <i>babA</i>	27
1.4.4- Gene <i>cagE</i>	28
1.4.5- Gene <i>cagT</i>	28
1.4.6- Gene <i>iceA</i>	28
1.4.7- Gene HP-NAP.....	29
1.4.8- Gene <i>dupA</i>	29
1.5- Epidemiologia e transmissão do <i>H. pylori</i>.....	29
1.6- Relação entre o <i>H. pylori</i> e as doenças humanas.....	31
1.6.1- Gastrite crônica.....	31
1.6.2- Úlcera péptica.....	32
1.6.3- Câncer gástrico.....	32

1.6.4- Linfoma Gástrico tipo MALT.....	33
1.6.5- Doenças Extragástricas.....	33
1.7- Métodos utilizados para o diagnóstico do <i>H. pylori</i>.....	34
1.7.1- Métodos indiretos.....	34
1.7.2- Teste respiratório da uréia marcada – Urea Breath Test (UBT).....	34
1.7.3- Sorologia.....	35
1.7.4- Pesquisa de antígeno nas fezes.....	35
1.8- Métodos diretos.....	36
1.8.1- Teste rápido da urease.....	36
1.8.2- Histologia.....	37
1.8.3- Cultura.....	38
1.8.4- Reação em cadeia da polimerase.....	38
1.9- Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI).....	39
1.9.1- PTI e sua relação com o <i>Helicobacter pylori</i>	40
1.9.2- Agregação plaquetária e a relação entre diferentes cepas do <i>H.pylori</i>	41
1.9.3- Diagnóstico da PTI.....	42
1.9.4- Tratamento da PTI.....	42
2- OBJETIVOS.....	43
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	45
3.1- Critérios de diagnóstico.....	48
3.2- Extração de DNA de tecidos não fixados.....	49
3.3- Extração de DNA das amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia a partir de tecido fixado em parafina.....	50

3.4- Reação em cadeia da polimerase utilizando primers para detecção do gene da betaglobina humana para controle interno da reação....	51
3.5- Detecção da bactéria <i>Helicobacter pylori</i> pela reação em cadeia da polimerase tipo <i>nested</i>	52
3.6- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase para a região do gene da urease C do <i>H.pylori</i>	53
3.7- Detecção do DNA do <i>Helicobacter pylori</i> pela reação em cadeia da polimerase para a reação do gene <i>cagA</i>	54
3.8- Visualização do DNA nos fragmentos amplificados.....	55
3.9- Estatística.....	55
3.10- Normas de biossegurança utilizadas para evitar a contaminação nas amostras.....	56
4- RESULTADOS.....	57
4.1- <i>Nested</i> PCR para detecção do DNA da bactéria <i>H.pylori</i>	58
4.2- PCR para amplificação da região do gene urease C do <i>H.pylori</i>	59
4.3- PCR para a amplificação do gene <i>cagA</i> do <i>H.pylori</i> (marcador de virulência).....	59
5- DISCUSSÃO.....	67
6- CONCLUSÃO.....	71
7- REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
8- APÊNDICES.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucléico
<i>H.pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
Nested PCR	reação em cadeia da polimerase tipo nested
mL	mililitros
mm	milímetros
M	Molar
NaCl	cloreto de sódio
Tris	tris (hidroxometil) 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>

NSAIDs	antiinflamatórios não esteroidais
PPIs	<i>proton pump inhibitors</i> (inibidores da bomba de prótons)
IBP	inibidor da bomba de prótons
UBT	urea breath test
O₂	gás oxigênio
CO₂	gás carbônico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
H & E	hematoxilina & eosina
Mb	megabase
μm	micrômetros
nm	nanômetro
pmol	picomol
μM	milimolar
KDa	Kilodaltons
H⁺	ânion hidrogênio
HLA	antígenos leucocitários humanos
<i>cagA</i>	<i>citotoxin antigen associated gene</i>
CagA-PAI	ilha de patogenicidade cag
CagA	proteína produzida pelo gene cagA
Kb	quilobases
IL-8	interleucina 8
vacA	gene vacA
VacA	proteína produzida pelo gene vacA
s	região que codifica o sinal peptídico do gene vacA

m	região média do gene vacA
s1, s2	alelos da região s do gene vacA
s1a, s1b, s1c	subtipos dos alelos s1 da região s do gene vacA
m1, m2	alelos da região média do gene vacA
babA	<i>blood group antigen adhesion gene</i>
babA1, babA2	alelos do grupo babA
cagE	gene cage
iceA	<i>Induced by contact with epithelium gene</i>
iceA1, iceA2	alelos do gene iceA
picB	gene homólogo das proteínas de secreção tipo III
HP NAP	<i>gene neutrophils-activating protein</i>
dupA	duodenal ulcer promoting gene
MALT	mucosa associated lymphoid tissue (linfoma tipo MALT)
PCO3	primer da região da betaglobina humana
PCO4	primer da região da betaglobina humana
UreC	região do gene urease C
PTI	púrpura trombocitopênica idiopática
Mbo I	enzima purificada do <i>Maraxella bovis</i>
pb	pares de bases
M	marcador de peso molecular (<i>Ladder</i>)
C+	controle positivo
C-	controle negativo
vWF	fator de Von Willebrand
H2RAs	antagonista do receptor de histamina 2

<i>H. heilmannii</i>	<i>Helicobacter heilmannii</i>
RC	remissão completa
RP	remissão parcial
SR	sem resposta ao tratamento
CMV	Citomegalovírus
HCV	vírus da Hepatite C
SAM	serviços de arquivo médico

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Resultados da detecção do gene <i>cagA</i> do <i>H.pylori</i> nos pacientes com PTI.....	61
Tabela 2- Resultados da detecção do <i>H.pylori</i> para o gene <i>UreC</i> e gene <i>cagA</i> nos pacientes com PTI.....	61
Tabela 3- Resultados dos pacientes positivos para o <i>H.pylori</i> e <i>cagA</i> com remissão completa(RC), remissão parcial (RP) e sem remissão (SR).....	61
Tabela 4- Resultados dos pacientes com PTI e <i>cagA</i>	62
Tabela 5- Estatística descritiva da idade dos pacientes com PTI.....	63
Tabela 6- Resultados dos pacientes com PTI e gene <i>cagA</i> considerando somente remissão completa.....	64
Tabela 7- Resultados dos pacientes com PTI e gene <i>cagA</i> considerando remissão completa e parcial (juntas).....	64
Tabela 8- Resultados obtidos para detecção do DNA da bactéria pela <i>nested</i> PCR, para a região do gene <i>UreC</i> , <i>cagA</i> PCR simples nos pacientes com diagnóstico de PTI.....	65
Tabela 9- Resultados obtidos para teste rápido da urease e histologia dos pacientes com diagnóstico de PTI.....	66

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Análise direta de fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% para a detecção do <i>H.pylori</i> (345pb).....	58
Figura 2- Análise direta de fragmento obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% para amplificação de região do gene urease C do <i>H.pylori</i> (294pb).....	59
Figura 3- Análise de fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% para amplificação do gene cagA (350pb).....	60
Figura 4- Esquema dos resultados da detecção do <i>H.pylori</i> (gene ureC) nos pacientes com PTL.....	60
Figura 5- Gráfico demonstrativo da contagem das plaquetas nos grupos A e B do gene cagA obtidos pela PCR.....	62
Figura 6- Resultados obtidos através do estudo referido de monitorização das plaquetas do grupo A e B.....	63

LISTA DE QUADROS

	PÁG.
Quadro 1- Idade dos pacientes com PTI e <i>H. pylori</i> positivo incluídos no estudo, sendo P amostras fixadas em parafina (pacientes retrospectivos) e F amostras obtidas a fresco (pacientes prospectivos).....	47
Quadro 2- <i>Primers</i> para gene da betaglobina humana.....	52
Quadro 3- <i>Primers</i> da primeira reação (PCR) de detecção do DNA do <i>H.pylori</i>	53
Quadro 4- <i>Primers</i> da <i>nested</i> PCR para detecção do DNA do <i>H. pylori</i>	53
Quadro 5- <i>Primers</i> da reação para <i>urease C</i>	54
Quadro 6- <i>Primers</i> da reação (PCR) para o gene <i>cagA</i>	55
Quadro 7- Resultados da detecção da bactéria <i>Helicobacter pylori</i> pela <i>Nested</i> PCR (amplificação do produto final 345pb).....	58

RESUMO

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria gram-negativa que está relacionada ao desenvolvimento de doenças gástricas e extragástricas. Dentre as doenças gástricas incluem-se o câncer gástrico, a gastrite crônica, a úlcera péptica e linfoma tipo MALT. Com relação às doenças extragástricas essa bactéria recentemente foi relacionada com a anemia por deficiência de ferro e com algumas doenças autoimunes, como a artrite reumatóide e a púrpura trombocitopênica idiopática. A PCR tem sido uma importante ferramenta para a análise de pequenos fragmentos de DNA, os quais podem, inclusive, ser armazenados por um tempo maior em amostras emblocadas em parafina ou obtidas a fresco à temperatura de -80°C. Dessa maneira, foram estudados 33 pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática (PTI) e *H.pylori* positivo. No que diz respeito à detecção da bactéria pela *nested* PCR, foi obtido um resultado de 100% de concordância em comparação aos resultados de histologia e teste da urease, usados rotineiramente. Além dos *primers* para detecção do *Helicobacter pylori* foram utilizados *primers* para as regiões do gene *urease C* e do gene *cagA*, sendo os fragmentos obtidos analisados em gel de 2% agarose observados sob luz ultravioleta. Foi obtida também uma concordância de 100% para a região do gene *urease C*. Em relação ao gene *cagA*, 30,3% desses pacientes apresentaram esse. Dos 33 pacientes positivos para *H. pylori*, após tratamento específico, 27,7% tiveram remissão completa do quadro clínico, 33% remissão parcial e 40% não tiveram remissão. Para o gene *cagA* positivo, 9,0% dos pacientes com PTI tiveram remissão completa e em 21,2% não houve remissão. Em relação ao gene *cagA* negativo, 21,2% tiveram remissão completa e em 48,4% não houve remissão. Foram aplicados testes estatísticos para observar a relação do gene *cagA* com a PTI, (teste exato de Fisher, Box-plot média e desvio padrão da contagem das plaquetas e *Mann-Withney*). Os resultados obtidos não foram estatisticamente significantes neste grupo estudado. Portanto o gene *cagA* não está relacionado com o desenvolvimento da PTI.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a gram-negative bacterium that is related to the development of gastric and extragastric diseases. Gastric diseases include gastric cancer, chronic gastritis, peptic ulcer and MALT lymphoma. Extragastric diseases include iron deficiency anemia and some auto-immune conditions such as reumatoid arthritis and idiopathic thrombocytopenic purpura. PCR has been an important tool for the analysis of small fragments of DNA that may be stored for a longer time inserted in paraffin blocks or fresh tissue at -80°C. Here we studied 45 patients with ITP and 33 of these ones had positive tests, with agreement of 100% of histological and rapid urease test. Besides the primers for *H. pylori* detection, primers for urease C region and *cagA* gene were used and the fragments obtained were analysed in agarose gel by ultraviolet radiation. We obtained 100% of agreement for urease C region and for detection of *H. pylori* and 30% of agreement for *cagA* gene. In these 33 patients which were *H. pylori* positive, 27,7% had complete remission, 33,0% partial remission and 40,0% had no remission. In positive patients for *cagA* gene, 9,0% had complete remission and 21,2% had no remission. In negative patients for *cagA* gene, 21,2% had complete remission and 48,4% had no remission. We used statistical analysis (Exact Fishers test, Box-plot and Mann-Withney) to relation *cagA* gene and thrombocytopenic idiopathic purpura. Our results don't suggest or correlate the presence of *cagA* gene with idiopathic thrombocytopenic purpura development.

1- INTRODUÇÃO

1.1- *Helicobacter pylori*

Em 1983, Warren e Marshall isolaram bacilos de amostras de tecido gástrico, recebendo, esses microorganismos, primeiramente, o nome de *Campylobacter pyloridis*, *Campylobacter pyloricus* e *Campylobacter pylori* (Murray et al., 1998). Com a análise da sequência de ácidos nucleicos e com os estudos ultra-estruturais da bactéria foi possível constatar que ela não pertencia ao gênero *Campylobacter*, sendo então importante a sua denominação atual *Helicobacter pylori*; o gênero refere – se à forma helicoidal da bactéria e a espécie é referente à sua principal localização no estômago humano, o antro ou região pré- (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 correlacioná-lo ao desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico (Sullivan et al., 1990; Parsonnet et al., 1991; Dev et al., 1998; Kodaira et al., 2002).

O genoma bacteriano é circular e composto por 1.667.876 pares de bases (1,7Mb), sendo considerado pequeno se comparado com os genomas da *Escherichia coli* (4,6Mb) e a *Pseudomonas aeruginosa* (5,8Mb) (Tomb et al., 1997; Lee, 1998).

A presença de regiões hipervariáveis em genes codificantes para estruturas de superfície permite à bactéria evadir-se da resposta imunológica pela alteração de seu antígeno de superfície (Tomb et al., 1997).

O *H. pylori* persiste, indefinidamente, no hospedeiro, no ambiente do estômago, apesar da resposta imunológica humoral e celular formada contra ele. (Lee, 1998). Embora a infecção por *H. pylori* ocorra mundialmente, sua incidência parece variar de acordo com a cultura e com os aspectos socioeconômicos de cada país.

1.2- 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 (Goodwin et al., 1989). Este gênero, juntamente com outros (*Campylobacter*, *Arcobacter* e *Wolinella*), constitui a superfamília VI de bactérias gram-negativas definida por Vandamme et al., 1991).

O *Helicobacter pylori* passou a ser diferenciado a partir do seu formato espiralado (Goodwin et al., 1996) e mede cerca de 2,5 a 5,0 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de largura (Goodwin et al., 1990; Géis et al., 1993).

O genoma do *H.pylori* apresenta uma zona de plasticidade que possui 46% a 48% da seqüência de linhagem específica, mas ainda é desconhecido seu papel na biologia. Alguns autores defendem que esta enzima não se relacione com a patogenicidade desta bactéria (Alm et al., 1999) enquanto outros sugerem que estas regiões estariam associadas com a adaptação ao hospedeiro (Ge e Taylor, 1999).

Quando cultivada em meio sólido, a bactéria assume o formato de bastão, sendo as formas espiraladas pouco freqüentes e até ausentes (Goodwin et al., 1990). 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).

O gênero *Helicobacter* é composto atualmente de 27 espécies que compartilham propriedades comuns, especialmente aquelas relacionadas com a vida no estômago, onde podem localizar-se no fundo e no corpo, mas sendo principalmente no antro encontradas em maior densidade (Blaser e Berg 2001).

A bactéria é adaptada para colonizar somente a mucosa gástrica, sendo observada raramente em áreas de metaplasia intestinal (Marshall et al., 1985; Queiroz et al., 1993; Ladeira et al., 2003). O genoma dessa bactéria contém mais de 20 genes homólogos associados com a codificação de enzimas envolvidas na restrição do DNA e sistemas de

modificação, incluindo os sistemas do tipo I, tipo II e tipo III, sendo o papel dessas enzimas não estabelecido até o momento (Beg et al.,1997).

1.3- Infecção pelo *H. pylori*

Na infecção pelo *H. pylori* devem ser considerados, além do polimorfismo bacteriano, comprovadamente acentuado nessa bactéria, os componentes constitucionais do hospedeiro (características genéticas e imunológicas) e a inserção ambiental (Blaser e Berg 2001). Atualmente, acredita-se que a contaminação ocorra dentro da família, sendo mais prevalente na infância. (Covacci et al.,1999; Perez- Perez et al.,2004). 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, da citotoxina vacuolizante VacA e da proteína CagA, dentre outros (Kist et al.,2005). Além disso, a mobilidade permitida pela presença de flagelos também é importante para a patogenicidade (Goodwin e Armstrong 1990)

A urease é uma proteína de alto peso molecular (500 a 600 KDa) que atua promovendo a hidrólise da uréia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando à produção de amônia e aumentando o pH gástrico, permitindo, assim, a sobrevivência da bactéria no ambiente hostil do estômago (Weeks et al.,2001). Estudos demonstraram que cepas do *H. pylori* com deleção desse gene não conseguem sobreviver (Walsh, 2000; Weeks et al., 2001). Além disso, há uma alta diversidade genômica dessa região, principalmente no que diz respeito aos genes urease C e urease B, o que pode ser comprovado por estudos utilizando-se análise de restrição (Roesler 2006).

Outras enzimas produzidas pela bactéria, como a superóxido dismutase, catalase e arginase, conferem proteção contra atividades líticas de macrófagos e neutrófilos, impedindo uma resposta eficaz do hospedeiro (Hazell *et al.*,1991) e permitindo, conseqüentemente, a sobrevivência da bactéria na mucosa. Outra enzima produzida pela bactéria é a mucinase, que tem atividade endopeptidásica e capacidade para degradar a

mucina gástrica, mecanismo pelo qual se favorece a produção da doença (Fernandez, 2004).

A adesão da bactéria ao epitélio também é de grande importância para a colonização do meio, o que é permitido pela sua capacidade de produzir a adesina. Outras proteínas da membrana externa têm sido reconhecidas com essa função, entre 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 (Fernandez 2004).

Embora a infecção ocorra mundialmente, sua incidência parece variar de acordo com o *status* socioeconômico de cada país. Nos países desenvolvidos, a porcentagem de indivíduos infectados oscila entre 25% a 50% e há indícios de que esteja diminuindo, enquanto que nos países subdesenvolvidos essa taxa é maior, podendo chegar a 90% (Covacci et al., 1999; Perez-Perez et al., 2004). No entanto, somente 10% a 20% das pessoas infectadas apresentam manifestações clínicas que geralmente, aparecem após anos da infecção (Blaser e Parsonnet, 1994; Hofman et al., 2004).

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

1.4.1- Gene *cagA*

O *Citotoxin Antigen Associated* (*cagA*) é um 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 e Berg 2001). Estudos realizados por (Parsonnet et al., 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. (Censini et al., 1996)

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 e Berg, 2001), sendo encontrado na maioria das cepas (60%) das amostras obtidas de pacientes ocidentais, conforme estudos de (Covacci et al., 1999). Além da relação do gene *cagA* com doenças gástricas como o adenocarcinoma, (Michiyo et al., 2007) descreveram uma possível associação do gene *cagA* com doenças auto-imunes, como a púrpura trombocitopênica idiopática.

1.4.2- Gene *vacA*

O gene *vacA* é responsável pela produção da chamada citotoxina vacuolizante (*VacA*) e é importante fator de virulência do *H. pylori*, por induzir a vacuolização citoplasmática em células eucariontes. (Dellis et al., 2001).

Este gene está presente em todas as cepas do *H. pylori* e compreende duas partes variáveis, *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 a úlceras pépticas.

1.4.3- Gene *babA*

O *babA* – *blood group antigen adhesin*, foi descoberto recentemente e parece exercer um importante papel na patogenicidade da bactéria, ao permitir o contato entre esta e o epitélio e ao possibilitar a facilitação da liberação de fatores de virulência como *CagA* e *VacA* (Gehard et al., 1999).

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

1.4.4- 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 à produção de IL-8 (Naito e Yoshikawa 2002).

1.4.5- Gene cagT

O gene cagT é um homólogo do gene *virB7* (Covacci e Rappuoli 1998) e codifica uma proteína de membrana externa (Cascales e Christie 2003). Uma das funções proposta para VirB7 é a formação de um dímero com VirB9, que estabilizaria outras proteínas VirB.

Em um trabalho realizado no Brasil, Mattar et al., (2007) detectaram o gene cagT em 86% das amostras de *H. pylori*, sendo que essa porcentagem aumentou para 98% em casos isolados obtidos de indivíduos com úlcera péptica. Análises estatísticas demonstraram uma relação entre a presença do gene cagT, com um aumento de 27 vezes para o risco de desenvolvimento de úlcera péptica. (Pacheco 2007).

1.4.6- 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 regular 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).

1.4.7- Gene HP-NAP

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 dos neutrófilos às células endoteliais e estimula a produção de espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio pelos neutrófilos (Santin et al., 2000).

1.4.8- Gene dupA

Esses genes encontram-se na região de plasticidade do genoma de *H. pylori* e formam um *locus* contíguo, dupA (*duodenal ulcer promoting gene*), que foi sugerido como marcador para o desenvolvimento de úlcera duodenal e protetor contra atrofia gástrica, metaplasia intestinal e câncer gástrico (Lu et al., 2005). Como esse padrão foi similar a várias bactérias provenientes das digestões nas regiões geográficas examinadas, tal observação não refletia a circulação regional de um genótipo particular. A presença do gene *dupA* foi associada também a um aumento na produção de IL-8, verificado na região do antro da mucosa gástrica *in vivo* e também a partir de células epiteliais *in vitro*, devido à ativação de fatores de transcrição de IL-8 (Lu et al., 2005), justificando a intensa infiltração neutrofílica.

1.5- Epidemiologia e transmissão do *H. pylori*

O *H. pylori* é uma bactéria de distribuição universal que acomete mais da metade da população mundial, sendo considerado um importante problema de saúde pública. A infecção pelo *H. pylori* é adquirida principalmente na infância e caracteriza – se

pela cronicidade, fato que predispõe ao desenvolvimento de afecções em adultos, como o carcinoma gástrico e a úlcera péptica. Sua prevalência é significativamente maior nos países em desenvolvimento, em todas as faixas etárias (Kodaira et al., 2002).

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 sexo, a infecção pela bactéria mostrou ser igual tanto em homens quanto em mulheres (Kodaira et al., 2002). Entre 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).

Sabe-se que a bactéria consegue alcançar a mucosa gástrica pela boca, pois se trata de um microorganismo não invasivo (Cave, 1997). 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 disseminação do agente (Rotherbacher et al., 1998). No entanto, ainda não é possível determinar se a principal via de transmissão é oral-oral ou fecal-oral (Desai et al., 1991).

A contaminação por via fecal-oral tem sido investigada (Thomas et al., 1992; Kelly et al., 1994; Namavar et al., 1995), especialmente com o chamado teste do antígeno das fezes (Zeitune e Monica 2000). Contudo, o isolamento da bactéria das fezes tem sido problemático para as pesquisas em razão da necessidade de serem utilizadas fezes frescas e não armazenadas, por longos períodos, para a obtenção de melhores resultados (Brown, 2000). A Federação Brasileira de Gastroenterologia e o Núcleo Brasileiro para estudos do *Helicobacter*, em 2004, decidiram promover o II Consenso Brasileiro para estabelecer condutas relativas à infecção por *H. pylori* a serem divulgadas em todo o Brasil para alertar e solicitar providências aos órgãos públicos responsáveis pela saúde da população, das implicações, a curto e longo prazo, das conseqüências dessa infecção. (Coelho e Zaterka 2005).

1.6- 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 Federação Brasileira de Gastroenterologia e o Núcleo Brasileiro para Estudos do *H. pylori* decidiram estabelecer condutas relativas à infecção por *H. pylori* a serem divulgadas em todo o Brasil e constituir instrumento a ser utilizado pelas entidades organizadoras do consenso para alertar e solicitar providências aos órgãos públicos responsáveis pela saúde da população a longo e curto prazo, das consequências dessa infecção (Coelho e Zaterka 2005).

1.6.1- Gastrite crônica

A infecção produzida pelo *H. pylori* é considerada a principal causa de gastrite crônica (Ashon, 1995; Kawaguchi, 1996; Cover e Blaser 1996), ocorrendo, inicialmente, um processo inflamatório local, com intenso infiltrado de neutrófilos na lâmina própria, na camada de muco e na luz glandular. Esse processo, caracterizado como gastrite aguda, ocorre no corpo e mais intensamente no antro gástrico.

Nos exames endoscópicos 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 na totalidade destes casos, com redução do processo inflamatório em caso de erradicação do microorganismo. Além disso, há um paralelismo entre maior intensidade do processo e maior densidade de colonização (McNulty et al., 1986; Johnston et al., 1998; Zeitune e Monici, 2000).

1.6.2- Úlcera péptica

A descoberta do *Helicobacter pylori* foi um evento definitivo para o entendimento da patogênese da úlcera péptica (Rauws e Tytgat 1990; Dev et al.; 1998). Estimativas recentes dizem que mais de 15% dos indivíduos com infecção pelo *H. pylori* irão desenvolver úlceras gástrica ou duodenal ao longo de suas vidas. Além disso, essa infecção é associada com mais de 95% dos casos de úlcera duodenais e, na ausência do uso de antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs), com mais de 65% das úlceras gástricas (Walsh et al., 1995; Dev et al., 1998).

Após a erradicação do *H. pylori*, há a cicatrização da úlcera péptica, estabelecendo-se, a partir de 1987, que todos os pacientes com essa doença relacionada ao microorganismo deveriam receber tratamento específico para eliminação do 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).

1.6.3- 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; Aska et al., 1995, 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 e Lambert 1998; Peterson et al., 2001; Kodaira et al., 2002).

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).

Dentre os tipos de câncer, o gástrico representa a segunda causa de morte por essa doença no mundo, sendo que (Eslick et al., 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 et al., 1993), (Nomura e Stemmermann

1993), (Eslick et al., 1999), acreditam que um terço dos adenocarcinomas gástricos seja atribuído à infecção pelo *H. pylori*.

De acordo com dados estatísticos do Instituto Nacional do Câncer – INCA as taxas de mortalidade por neoplasias de estômago reduziram – se significativamente até o período de 2005 (SP Demográfico 2007).

1.6.4- Linfoma gástrico tipo MALT

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; Erdmn 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 e Sambert, 1998).

1.6.5- Doenças extragástricas

O *H. pylori* tem sido relacionado, mais recentemente, com doenças extragástricas, incluindo a anemia por deficiência de ferro (Capurso et al., 2001), algumas doenças auto- imunes, como a artrite reumatóide (Zentilin et al., 2002) e a púrpura trombocitopênica idiopática (Di Campli et al., 1998; Emilia et al., 2001; Ando et al., 2004).

Para a possível explicação das alterações determinadas pela bactéria e o surgimento destas doenças, tem sido sugerido que o processo inflamatório ocasionado pela presença desse patógeno poderia liberar substâncias que atuariam à distância, ou pela mimetização molecular cruzada que ocorreria entre a bactéria e os antígenos do hospedeiro (Zeitune e Lorena 2007). Algumas doenças de pele, como a urticária crônica idiopática e a

rosácea, outras doenças auto -imunes, como a Síndrome de Sjögren, a Púrpura de Henoch- Schoelein e a tireoidite auto- imune, e doenças vasculares, relacionadas à aterosclerose, também têm sido relacionadas à presença do *H. pylori* (Zeitune e Lorena 2007).

1.7- Métodos utilizados para o diagnóstico do *H. pylori*

Existem vários métodos que possibilitam o diagnóstico do *H. pylori*, os quais são classificados em indiretos ou não-invasivos, quando não há necessidade de se realizar uma endoscopia digestiva (Mégraud, 1996; Thijs et al., 1996; Czinn, 2005) e diretos ou invasivos, quando é necessária a obtenção de uma amostra de tecido gástrico para a detecção da bactéria.

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 amostra de fragmento gástrico, encontram-se principalmente o teste rápido da urease, o exame histológico, a cultura e a reação em cadeia da polimerase.

1.7.1- Métodos Indiretos

1.7.2- Teste respiratório da uréia marcada – Urea Breath Test (UBT)

O teste respiratório da uréia marcada é realizado com a ingestão, pelos pacientes em jejum, 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 hidrolizar a uréia em amônia e gás carbônico (CO_2). O átomo de carbono marcado (^{13}C ou ^{14}C) é então exalado precisamente na respiração e mensurado (Peterson et al., 2001; Czinn, 2005)

Apesar da especificidade deste teste ser alta, outras bactérias produtoras de urease podem estar presentes no estômago, como a *H.heilmanii*, 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 também 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).

1.7.3- 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. No entanto porém, esses 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).

1.7.4- Pesquisa de antígeno nas fezes

O exame do antígeno nas fezes surgiu como um método não invasivo rápido para detecção do *H. pylori*. Em estudos realizados por (Vaira et al., 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%), quando comparável ao teste respiratório da uréia (84% a 100%). A detecção do antígeno nas fezes, feita quatro semanas depois de o paciente completar em esquema de erradicação do *H. pylori*, apresentou uma sensibilidade de 90%, uma especificidade de 95% e um valor preditivo 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 e Walker 2001). Como 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- Métodos diretos

1.8.1- Teste rápido da urease

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

Existem vários *kits* comerciais disponíveis no mercado para o teste da urease, dentre os quais, os mais utilizados 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), e como desvantagens podem ser considerados o fato de ser uma técnica invasiva e de haver a necessidade de um número relativamente alto de microorganismos na amostra para se obter um resultado positivo (Arvind et al., 1988; Bourguignon et al., 1989).

Além disso, outra limitação para o uso desse 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 poderiam diminuir a densidade do *H. pylori* e, conseqüentemente, a atividade da urease, produzindo, assim, resultados falso-negativos (Peterson et al., 2001). A presença 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).

Sensibilidade de 89% a 98% e especificidade de 93% a 100% foram encontradas para os testes da urease por (Thijs et al., 1996), (Peterson et al., 2001) e Versalovic (2003).

1.8.2- 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 (Thijs et al., 1996). O Sistema Sydney de classificação propõe que a coleta de duas amostras de tecido da mucosa gástrica seja suficiente para diagnóstico histológico da infecção pelo *H. pylori* e das alterações histológicas produzidas (Price, 1991; Versalovic, 2003).

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).

1.8.3- Cultura

A cultura para *H. pylori* apresenta duas vantagens principais. Primeiro, ela permite testes de suscetibilidade antimicrobiana; segundo, os isolados por culturas podem ser caracterizados em detalhes (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 (Dunnn et al.,1997).

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). O crescimento do *Helicobacter pylori* é dificultado , em especial, pelo uso de antibiótico, pela ingestão de anestésico tópicos e pela contaminação da pinça de biópsia por outros microorganismos. Além disso, tem se limitado muito ao laboratório de pesquisa pela demora dos resultados e alta taxa de resultados falso negativos (Zeitune et al.,2007).

1.8.4- Reação em Cadeia da Polimerase

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

A *nested* PCR é uma reamplificação do produto da primeira amplificação, utilizando-se *primers* internos à primeira seqüência amplificada (Watanabe et al., 1997; Costa et al.,1992).

As vantagens da PCR são inúmeras e, dentre estas, as principais são a simplicidade de execução, o tempo utilizado para realização da reação e a possibilidade de genotipagem dos produtos obtidos, a fim de se identificar cepas diferentes de uma

determinada espécie. Além disso, a PCR possibilita a utilização de materiais retrospectivos em pesquisas (Newton e Grahan, 1997).

Com relação às 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.

Outra vantagem da PCR é que ela permite a realização da análise dos produtos obtidos por restrição, com o uso de enzimas, o que é de extrema relevância para se determinar cepas prevalentes de bactérias, como o *H. pylori*, em um determinado grupo de pacientes. Além disso, permite o acompanhamento de infecções e estudos epidemiológicos (Colding et al., 2003).

1.9- Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI)

A púrpura trombocitopênica idiopática (PTI) é uma doença auto-imune causada pela sensibilização das plaquetas por auto-anticorpos antiplaquetários, o que leva à sua destruição, sendo verificado que um complexo glicoprotéico é o principal alvo desses anticorpos em um determinado subgrupo de pacientes (Thude et al., 1999).

É uma doença hematológica freqüente, que se caracteriza pela produção de auto-anticorpos dirigidos contra a proteína da membrana plaquetária, não raros contra o complexo glicoprotéico IIb/IIIa, que leva à sensibilização das plaquetas que são fagocitadas por macrófagos (McMillan, 2000).

Esse tipo de púrpura, quando ocorre na infância, aparece quase sempre algumas semanas após uma infecção viral, fato este que sugere uma possível imunização cruzada entre o antígeno viral e o plaquetário. Em adultos, a PTI está geralmente associada a outras doenças imunológicas, à leucemia linfocítica crônica, aos linfomas, a alguns tipos de câncer não linfóides, à mononucleose infecciosa e à outras infecções virais e bacterianas (Stites et al., 2000).

O diagnóstico da PTI é baseado, no quadro clínico que, na maioria das vezes, consiste, principalmente, em sangramento cutâneo com petéquias e equimoses, podendo estar acompanhado de sangramento mucoso, com epistaxe, gengivorragia, menorragia, hematúria, sangramento do trato gastrointestinal e até do sistema nervoso central (Mc Millan, 2000).

1.9.1- PTI e sua relação com o *Helicobacter pylori*

Pesquisas recentes, como as realizadas por Francesch (2007) e (Shiotana et al., 2001) demonstraram que pode haver uma associação entre a PTI e a presença do *H. pylori* no trato gastrointestinal humano, podendo ser considerada como uma opção terapêutica, para esta alteração hematológica, a erradicação dessa bactéria. Além da possível relação entre a infecção produzida por esse patógeno e a PTI, tem sido também observado que as cepas de *H. pylori* cagA-positivas parecem estar mais relacionadas ao desenvolvimento desse tipo de púrpura do que as cepas cagA-negativas (Shiotana et al., 2001).

Dessa maneira, diversos estudos em pacientes com PTI demonstram que a erradicação da infecção produzida pelo *H. pylori* pode resultar no aumento do número de plaquetas, levando o paciente a uma melhora significativa de seu quadro clínico (Gasbarrini et al., 1998; Kohda et al., 2002; Hino et al., 2003; Veneri et al., 2002). Assim sendo pode incluir, portanto, essa bactéria como um dos fatos etiológicos da doença (Huber et al., 2003).

Embora o mecanismo exato dessa relação não seja conhecido, alguns estudos sugerem que a semelhança existente entre a estrutura bacteriana e os antígenos plaquetários possa ser importante. Um estudo recente, realizado por (Franceschi et al., 2005), demonstrou que os anticorpos anti-cagA reconhecem dois antígenos plaquetários em pacientes com PTI, mas não em indivíduos que não apresentam a doença.

Tem sido proposto, conseqüentemente, que o *H. pylori* pode induzir uma resposta imunológica aos antígenos que têm uma reação cruzada com diversos antígenos glicoprotéicos das plaquetas.

A produção de auto-anticorpos dirigidos contra células e tecidos do hospedeiro em pessoas com a infecção pelo *H. pylori* realmente ocorre. Anticorpos monoclonais contra os antígenos dessa bactéria têm capacidade de reagir com as células humanas gástricas, com as glândulas salivares, com o epitélio tubular renal e com o epitélio duodenal (Ko et al., 1997). Presumidamente, a eliminação do *H. pylori* do epitélio gástrico poderá aliviar a inflamação, eliminando a exposição aos antígenos e diminuindo, em consequência, a produção de anticorpos (Jackson et al., 2005).

Com relação à teoria da semelhança molecular entre os antígenos da bactéria e os antígenos plaquetários, (Michel et al., 2004) realizaram um estudo em pacientes *H. pylori*-positivos, correlacionando os anticorpos anti-plaquetas com a presença da bactéria.(Pamuk et al., 2002)

Como consequência, o III Consenso de Maastricht (Malfertheiner et al., 2007) sugere o tratamento de erradicação do *H. pylori* em pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática como terapia para essa doença. Sendo assim, fica claro que são necessários mais estudos sobre a citada relação, inclusive possibilitando a determinação de quais cepas bacterianas seriam as mais prevalentes nos pacientes com PTI, o que, até o momento, não se encontra estabelecido.

1.9.2- Agregação plaquetária e a relação entre diferentes cepas do *H.pylori*.

Algumas cepas do *H. pylori* têm demonstrado induzir a ativação e a agregação plaquetárias. Essas cepas apresentam tanto anticorpos IgG quanto uma possível ligação com o fator de Von Willebrand nas membranas celulares (Jackson et al., 2005). Apesar disso, alguns estudos, como os realizados por (Byrne et al., 2003), não encontraram uma associação entre cepas positivas gene *cagA* e *vacA* e o desenvolvimento dessa doença. Porém, (Jackson et al., 2005) lembram que pode haver uma relação entre as cepas *cagA* positivas e o desenvolvimento da PTI, o que requer, conseqüentemente, maiores estudos sobre essa interação.

1.9.3- Diagnóstico da PTI

O diagnóstico da PTI é baseado, na maioria das vezes, no quadro clínico, que consiste principalmente em sangramento cutâneo com o surgimento de petéquias e equimoses, podendo estar acompanhadas de sangramento mucoso, epistaxe e alterações do trato gastrointestinal (McMillan 2000).

Na verdade, o diagnóstico da PTI é de exclusão das demais causas de trombocitopenia por consumo periférico das plaquetas, tais como hiperesplenismo, hepatopatia ou coagulação intravascular disseminada. Na presença de esplenomegalia é necessário realizar exames laboratoriais para lúpus eritematoso, artrite reumatóide ou investigar uma doença linfoproliferativa. A pesquisa de infecção viral, especialmente HIV e hepatite C, e de outros anticorpos, como o anticardiolipina, complementa o diagnóstico da doença (The) American Society of Hematology ITP Practice Guideline, 1997).

1.9.4- Tratamento da PTI

Em linhas gerais, o tratamento da PTI inclui o uso de corticosteróides e a esplenectomia, bem como o emprego de imunoglobulina intravenosa em altas doses (George, 2000). Os casos resistentes a esses tratamentos recebem terapias alternativas, as quais incluem agentes imunossupressores, tais como azatioprina, ciclofosfamida, alcalóides da vinca ou outros medicamentos, como o danazol (George, 2000).

O critério de resposta à terapêutica é importante para se definir a estratégia de manejo desses pacientes. O objetivo do tratamento deve ser a resolução do quadro hemorrágico e a elevação da contagem das plaquetas, não necessariamente para níveis normais. Pacientes com sangramento e plaquetas abaixo de $20.000/\mu\text{L}$ devem ser hospitalizados. Uma contagem de plaquetas acima de $25.000/\mu\text{L}$ geralmente não se associa a sangramento e o paciente pode apresentar tempo de sangramento normal. Não se visa à normalização da contagem de plaquetas, mas sim tratar pacientes sintomáticos, com sangramento cutâneo-mucoso que, em geral, apresentam contagem de plaquetas abaixo de $30.000/\mu\text{L}$ (The) American Society of Hematology ITP Practice Guideline, 1997).

2- OBJETIVOS

Assim, os objetivos do presente trabalho foram:

- Detectar o DNA do *Helicobacter pylori* para a região do gene urease C, em amostras de tecido gástrico obtidas de pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática submetidos à endoscopia digestiva alta no Gastrocentro da Unicamp;
- Verificar se os pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática e *H. pylori* positivo apresentam melhora da plaquetopenia após a erradicação da bactéria;
- Detectar se o gene *cagA* nas amostras positivas para *H.pylori* confere resposta diferente à plaquetopenia causada pela PTI, em relação à erradicação da bactéria.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

Os pacientes incluídos na pesquisa foram de ambos os gêneros, todos com resultados positivos para *Helicobacter pylori* e que pertenciam ao protocolo da linha de pesquisa do Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) da Unicamp. Um total de 33 pacientes foi submetido aos exames endoscópicos para retirada de fragmentos da mucosa gástrica por biópsia, havendo sido realizado, para pesquisa da bactéria, exame histológico, utilizando a coloração de hematoxilina – eosina e Giemsa modificado, e o teste da urease. Foram considerados, para inclusão no estudo, somente pacientes com plaquetopenia que apresentavam número de plaquetas acima de 50.000/ μ L; os casos de pacientes com plaquetopenia grave e sangramento, com plaquetas abaixo de 50.000/ μ L foram excluídos do estudo. Dos 33 pacientes positivos para *H. pylori* e que tinham PTI, todos receberam a terapia tripla (inibidor de bomba proteônica em dose dupla, 1g de amoxicilina e 500mg de claritromicina), duas vezes ao dia no período de 7 dias.

Após a terapia para erradicação do *Helicobacter pylori*, como provável causa da manifestação da doença, foi acompanhada a resposta de acordo com o aumento das plaquetas, classificando-se como RC (resposta completa, com contagem de plaquetas acima de 150.000/ μ L), RP (resposta parcial, com contagem de plaquetas entre 50.000/ μ L e 150.000/ μ L) e SR (sem resposta ao tratamento).

Para melhor investigação da relação da bactéria com a PTI, foi estudado o gene *cagA*, que está relacionado com as doenças mais graves induzidas pela bactéria, como um de seus principais marcadores de virulência.

O presente estudo foi aprovado e acompanhado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil. Todos esses pacientes concordaram em participar do estudo, por meio de assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, conforme disposição do Comitê de Ética.

Das 33 amostras, 18 foram obtidas de pacientes acompanhados durante os anos de 2000 a 2004 (análise retrospectiva) e 15 foram avaliados durante os anos de 2005 a 2007 (análise prospectiva).

Quadro 1- Idade dos pacientes com PTI e *H. pylori* positivo incluídos no estudo, sendo P amostras fixadas em parafina (pacientes retrospectivos) e F amostras obtidas a fresco (pacientes prospectivos).

AMOSTRA	PACIENTE	HC	IDADE
P 01	C R	776858-6	45
P 02	C M F	679387-9	42
P 03	D A S	795172-9	56
P 04	G C A	628389-0	59
P 05	L D P	6666014	37
P 06	M A P P	761906-6	43
P 07	M H C O	632877-3	56
P 08	M I A F	412151-3	50
P 09	M C F	540493-8	33
P 10	M I P	765514-7	42
P 11	M A B	651277-7	36
P 12	N V S	268707-2	55
P 13	O S G	330095-6	49
P 14	T M S R	567691-7	60
P 15	J C S R	795183-8	43
P 16	F N S	872056-1	40
P 17	A Z V	879659-8	37
P 18	J B S	911786-2	45
F 01	G S	711099-9	26
F 02	T P A	772973-4	27
F 03	S S F	504608-1	56
F 04	R G S G	293990-7	39
F 05	T A S	5676917	61
F 06	G F S	953228-6	56
F 07	M A B R	955630-7	56
F 08	A C S	735257-7	45
F 09	R C F M	943587-2	27
F 10	M S S	477422-3	38
F 11	A C V	6776568	49
F 12	L H S	874451-0	51
F 13	A C R	736114-9	28
F 14	R F	8989731	32
F 15	A D D	8868688	27

Os métodos utilizados para análise molecular do DNA do *H. pylori* nas amostras obtidas dos pacientes com PTI incluídos na pesquisa.

- extração do DNA das amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia;
- Reação de betaglobina para confirmação da extração do DNA;
- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase tipo *nested* para detecção do DNA da bactéria;
- amplificação gênica específica para região do gene da urease C pela reação em cadeia da polimerase;
- amplificação gênica específica do gene do cagA da bactéria pela reação em cadeia da polimerase simples.

3.1- 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 rápido da urease e histologia e que apresentavam Púrpura Trombocitopênica Idiopática, do protocolo de pesquisa do Hemocentro da FCM, Unicamp.

Pacientes que apresentaram resultados negativos para os dois exames, histologia e teste rápido da urease, e pacientes que tiveram apenas um dos testes realizados, foram excluídos do estudo. Os resultados de exames e as pastas de acompanhamentos de todos os pacientes incluídos nesta pesquisa foram avaliados no Serviço de Arquivo Médico (SAM) do Hospital das Clínicas da Unicamp.

Um total de 33 pacientes, com amostras de fragmentos de tecido retirados da mucosa gástrica que foram obtidos por biópsia, utilizados no presente estudo. Destas amostras, 18 haviam sido coletadas nos anos 2000 a 2004, e estavam emblocadas em parafina e armazenadas em temperatura ambiente no Departamento de Patologia, localizado

no Gastrocentro da Unicamp e 15 amostras foram coletadas a fresco nos anos de 2005 a 2007, 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.

3.2- Extração de DNA de tecidos não fixados

O método utilizado para a extração do DNA, com algumas modificações, foi descrito por (Latchman et al.,1995) uma seção 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 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 (10mg/mL de uma solução estoque). O tubo foi, após isso, passado no vórtex e as amostras incubadas “overnight “à temperatura de 55° C.

Em seguida, à amostra foram adicionadas 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 1500rpm.

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, e 1,0 mL 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 mistura, acrescentando-se solução tampão (Tris – EDTA) em um volume de 30 µL e colocando-se as amostras em banho-maria a 37°C, durante uma hora. A amostra foi, então, armazenada à temperatura de - 20° C.

3.3- Extração de DNA das amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia a partir de tecido fixado em parafina.

O método de extração de DNA a partir de tecido fixado em parafina com algumas modificações foi descrito por (Pinto et al.,1998).

Foram utilizados cortes de uma a duas fitas de parafinas de 5 a 10mm, colocados em tubo eppendorf de 1,5 mL. Às amostras foi adicionado 1 mL de xileno, agitando-as e deixando-as descansar de 3 a 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por mais 5 minutos e o xileno foi descartado. Esse passo foi repetido 2 a 3 vezes, ressuspensando-se, posteriormente, as amostras em 500 µL de etanol a 100% e centrifugando-se por 5 minutos a 14.000 rpm. O etanol foi descartado e às amostras foram adicionados 500 µL de etanol a 95%, centrifugando a mistura por mais 5 minutos, descartando-se o sobrenadante .

Após isso, foram acrescentados 500 µL de etanol a 70%, sendo as amostras centrifugadas por mais 5 minutos. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado e a amostra deixada à temperatura ambiente para secagem.

Finalmente, após a secagem, a amostra foi ressuspensa em solução de proteinase K (20 mg/mL) e solução tampão contendo 50 mM Tris, 0,5% de SDS, 1mM de EDTA e água destilada.

Depois da ressuspensão foram adicionados à amostra 430 µL de fenol, homogeneizando-as e centrifugando-as por 30 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante, que contém o DNA, foi transferido para um novo tubo, no qual foi adicionada uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), seguido de homogeneização e centrifugação por 30 minutos.

Após a adição de 75 µL de acetato de amônia e 750 µL de etanol a 100%, a amostra foi invertida várias vezes e incubada por 24 horas a -20° C, sendo, depois, centrifugada por 30 minutos a 12.000 rpm, colocada a -4° C, decantando-se o sobrenadante e lavando-se o precipitado cuidadosamente com 500 µL de etanol 70% gelado, descartando-o imediatamente. O material foi então deixado para secagem em temperatura ambiente e foi ressuspendido em solução contendo 50 µL de água estéril, 10 M de Tris (pH 8,0) e 1 µL de EDTA, mantendo-se o material estocado a -20 ° C até a utilização.

3.4- 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 betaglobina humana seguiu o método descrito por (Saiki et al.,1988).

Essa amplificação teve como objetivo principal analisar a presença e quantidade do DNA extraído das amostras de tecido gástrico, garantindo-se 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 a seus respectivos tempos: 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, 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 sequência de primers utilizados, que flanqueiam uma região conservada do gene da betaglobina humana. (Quadro 2).

Quadro 2- *Primers* para gene da betaglobina humana

<i>Primer</i>	Sequência (5' – 3')	Sentido
PCO3	ACA CAA TCG TGT TCA CTA GC	<i>sense</i>
PCO4	CAA CTT CAT CCA CGT TTC ACC	<i>antisense</i>

3.5- 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 et al., 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, 10mM de Tris- HCl, pH 8,5), 0,8 µL(1,5 mM) de MgCl₂, 4,0 µL de Dntp, 0,4µL (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 termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer / Cetur, 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 ligação complementar entre os *primers* e a região específica do DNA, ou seja, para o anelamento e realizada à temperatura de 72°C por 7 minutos. Os *primers* utilizados para a primeira reação de amplificação foram os seguintes: (Quadro 3).

Quadro 3- *Primer* da primeira reação (PCR) de detecção do DNA do *H.pylori*

<i>Primer</i>	Seqüência (5'- 3')	Sentido
1	CAG TTA TTT GGT GGC TAC AAC CG	<i>sense</i>
2	CCC ATC AAT AGA CGC TTA ATC C	<i>antisense</i>

Para a *nested* PCR (segunda reação de amplificação), uma alíquota de 4 µL do produto amplificação foi submetida ao mesmo procedimento descrito acima, com utilização de *primers* internos aos anteriormente usados (Quadro 4).

Quadro 4- *Primer* da *nested* PCR para detecção do DNA do *H. pylori*

<i>Primer</i>	Seqüência (5'- 3')	Sentido
3	GCT GTA ATT TAA GGG TGG GGG TTG	<i>sense</i>
4	TCG CGT AAT TCA AAC TGC AAC CG	<i>antisense</i>

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.

3.6- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase para a região do gene da urease C do *H. pylori*.

A amplificação gênica da região do gene urease C seguiu o método descrito por (Lage et al., 1995), com algumas modificações.

O volume total para cada reação foi de 25 µL, contendo 1µL 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 35 ciclos em termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer/ Cetus, Norwalk, Conn, EUA), submetendo-se as amostras a 94° C por 2 minutos, 94°C por 2 minutos (desnaturação), 55° C por 2 minutos (anelamento), 72° C por 1 minuto e 30 segundos (extensão) e 72° C por 2 minutos (extensão final).

Os *primers* utilizados na reação de amplificação estão descritos na (Quadro 5).

Quadro 5- *Primer* da reação para *urease C*

Primer	Seqüência (5'- 3')	sentido
Ure C 1	AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT	Sense
Ure C 2	AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC	Antisense

A reação resultou em um fragmento final de 294 pares de bases.

3.7- Detecção do DNA do *Helicobacter pylori* pela reação em cadeia da polimerase para a região do gene *cagA*.

A reação gênica para amplificação do gene *cagA* seguiu o método descrito por (Santanu et al.,2004). O volume total para cada reação foi de 25 µL, contendo 1,5 µL do DNA extraído, 2,7 µL de tampão, 0,8 µL de MgCl₂, 4,0 µL de dntp, 0,4 µL de cada *primer* (*cagA* 5c e *cagA* 3c) e 0,25 µL de *Taq* polimerase, completando-se o volume com água destilada. Os *primers* foram diluídos 1:5 com água destilada.

Foram realizados 35 ciclos em termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA), sendo 94° C por 3 minutos, 94° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto e 72° C por 10 minutos.

Os *primers* utilizados na reação de amplificação encontram-se descritos na (Quadro 6).

Quadro 6- *Primer* da reação (PCR) para o gene *cagA*

<i>Primer</i>	seqüência (5' – 3')	Sentido
<i>cag5c</i>	GTT GAT AAC GCT GTC CGC TTC	Sense
<i>cag3c</i>	GGG TTG TAT GAT ATT TTC CAT AA	Antisense

A reação resultou em um fragmento final de 350 pares de bases.

3.8- Visualização do DNA nos fragmentos amplificados

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

Nas amostras positivas foram observados, comparando-se ao *ladder* (marcador molecular), fragmentos de 345 pares de bases na detecção, 294 pares de bases na região do gene urease C e 350 pares de bases na região do *cagA*.

3.9- Estatística

Para a avaliação dos resultados obtidos, no presente estudo foi utilizado o teste de *Box -plot* a média e desvio padrão das plaquetas e *Wilcoxon (signed-rank test)* que avalia a contagem das plaquetas considerando o $p > 0,05$ como estatisticamente significativo para os grupos *cagA* negativo (grupo A) e *cagA* positivo (grupo B). E Fisher para grupo *cagA* negativo e *cagA* negativo, considerando remissão completa e parcial.

3.10- Normas de biossegurança utilizadas para evitar a contaminação nas amostras.

Durante todos os procedimentos e técnicas utilizados para desenvolvimento da 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, e preparo das amostras para amplificação.
- 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 luvas 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 metódica.

4- RESULTADOS

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

A amplificação ocorreu em 33 amostras de DNA extraídas dos fragmentos de mucosa gástrica obtidos por biópsia do total de pacientes estudados. Destas amostras positivas para *H. pylori* 18 eram amostras parafinadas e 15 amostras a fresco.

Quadro 7- Resultado da detecção da bactéria *Helicobacter pylori* pela *nested* PCR (amplificação do produto final 345 pb)

Amostras de tecido gástrico	
Parafinadas	18
A fresco	15
Total de amostras	33

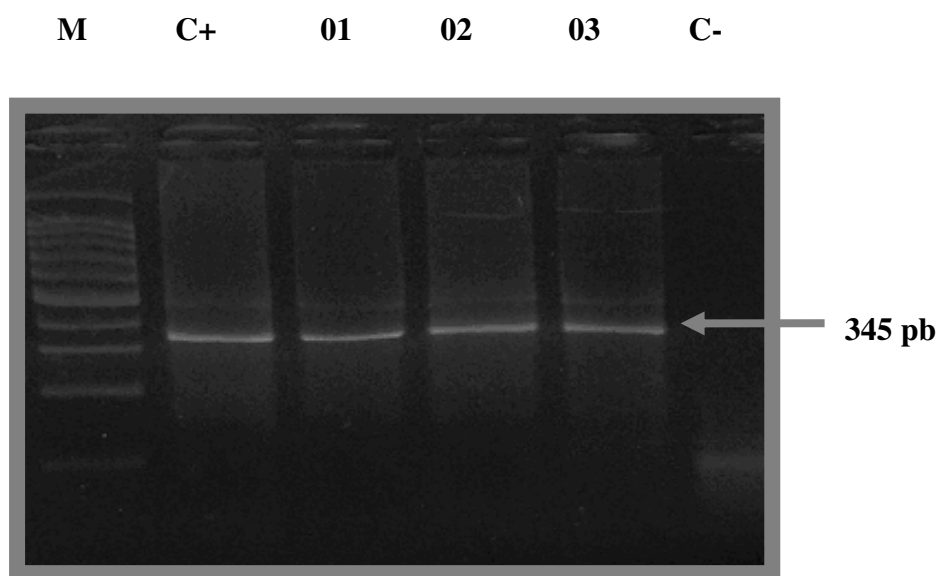


Figura 1- Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio . Detecção do *H. pylori* (345pb) **M-** marcador de peso molecular *ladder* 100 pb. **C+** controle positivo.

1 a 3 – pacientes positivos para *H.pylori*. **C-** controle negativo.

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

Amplificação da região do gene urease C do *H. pylori* foi realizada em 33 amostras de DNA, porém com algumas dificuldades para amplificação para amostras parafinadas, havendo a necessidade de serem feitas repetidas reações para a otimização da PCR.

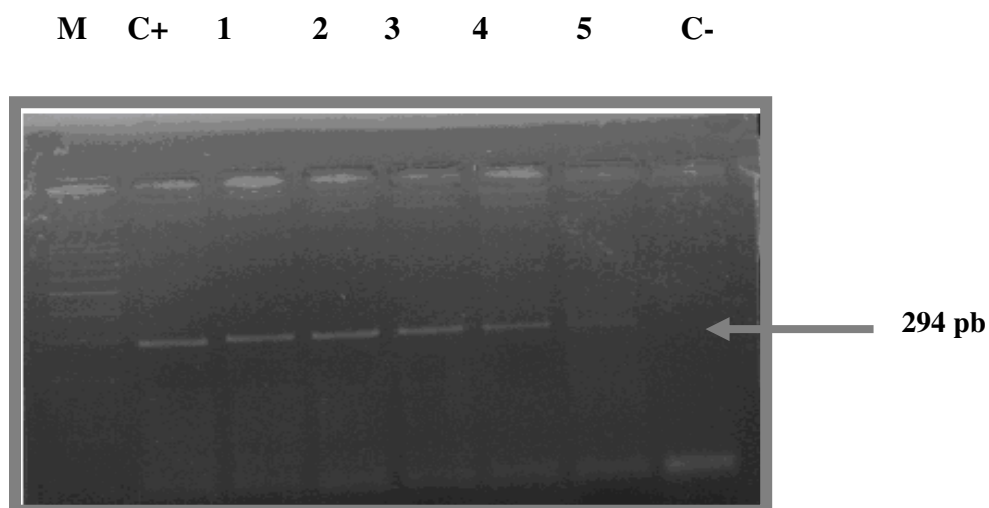


Figura 2- Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Amplificação da região do gene urease C do *H.pylori* (294 pb). **M** – marcador de peso molecular *ladder* 100 pb. C+ controle positivo. 1 a 5 – amostras positivas. C- controle negativo.

4.3- PCR para a amplificação do gene *cagA* do *H. pylori* (marcador de virulência).

A amplificação do gene *cagA* do *H. pylori* ocorreu em 33 amostras de DNA, sendo a padronização da reação realizada de acordo com o item “Métodos”. Os melhores resultados foram obtidos com a diluição 1:5 dos *primes* (*cag5c* –*cag3c*).

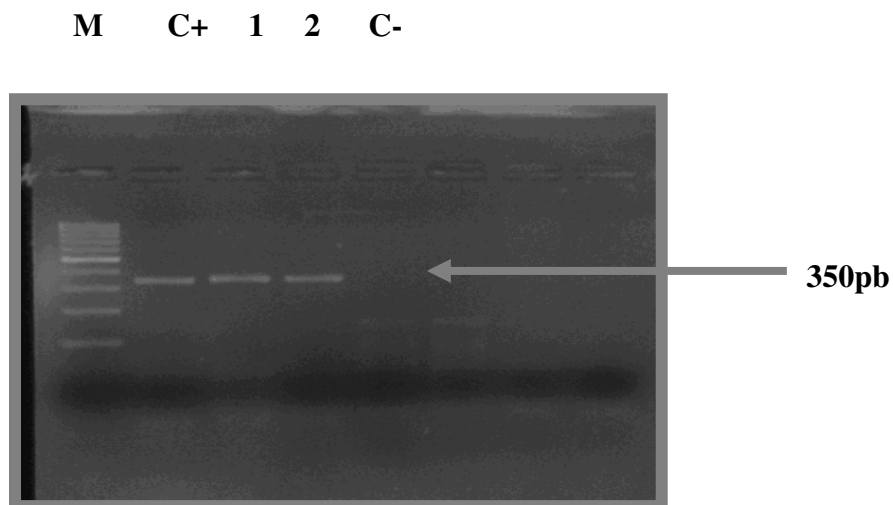


Figura 3- Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Amplificação do gene *cagA* do *H.pylori* (350 pb). M – marcador de peso molecular *ladder* 100pb. C+ controle positivo. 01 a 02 – amostras positivas. C- controle negativo.

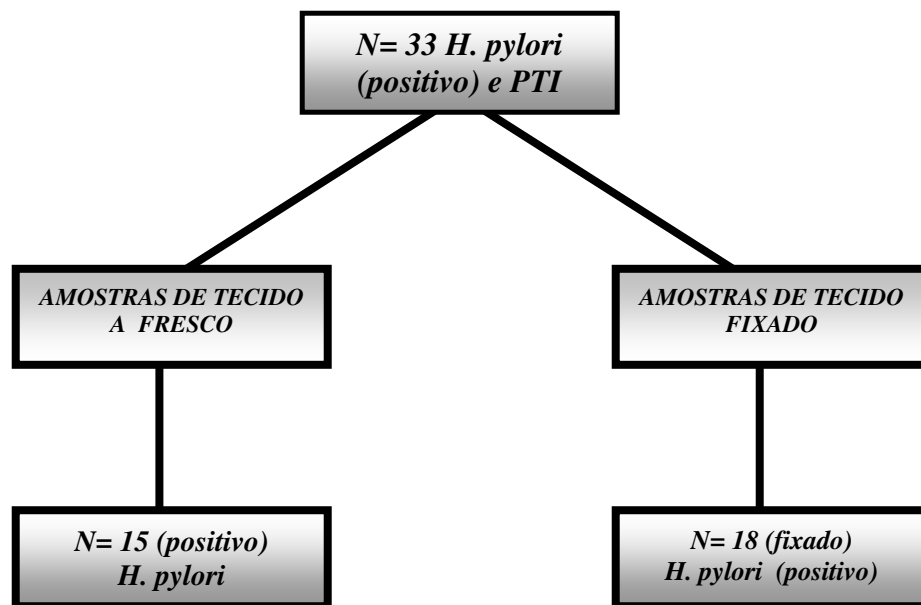


Figura 4- Esquema dos resultados da detecção do *H. pylori* (gene *ureC*) nos pacientes com PTI

Tabela 1- Resultados da detecção do gene *cagA* do *H. pylori* nos pacientes com PTI

n = 33	
Positivo	10 (30%)
Negativo	23 (70%)

Tabela 2- Resultados da detecção do *H. pylori* para o gene *ureC* e gene *cagA* nos pacientes com PTI

n= 33		
Detecção	Positividade	%
<i>Helicobacter pylori</i>	33/33	73,3
<i>UreC</i>	33/33	73,3
Gene <i>cagA</i>	10/33	30,3

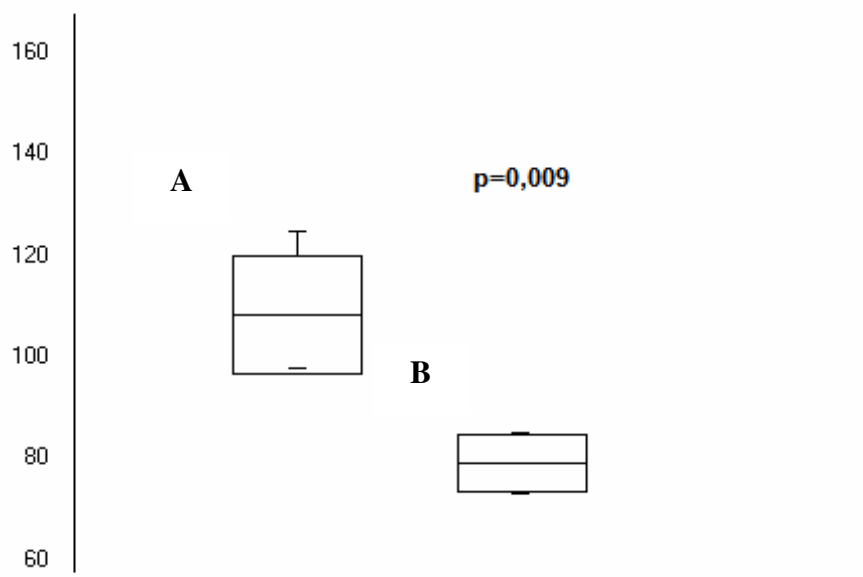
Tabela 3- Resultados dos pacientes positivos para o *H. pylori* e *cagA* com remissão completa (RC), remissão parcial (RP) e sem remissão (SR)

PTI e <i>H.pylori</i> positivo			
n=33			
	RC	RP	SR
<i>Helicobacter pylori</i>	9 (27,7%)	11(33,3%)	13(40%)
Gene <i>cagA</i>	3(9,0%)	-	7(21,21%)

Resultados

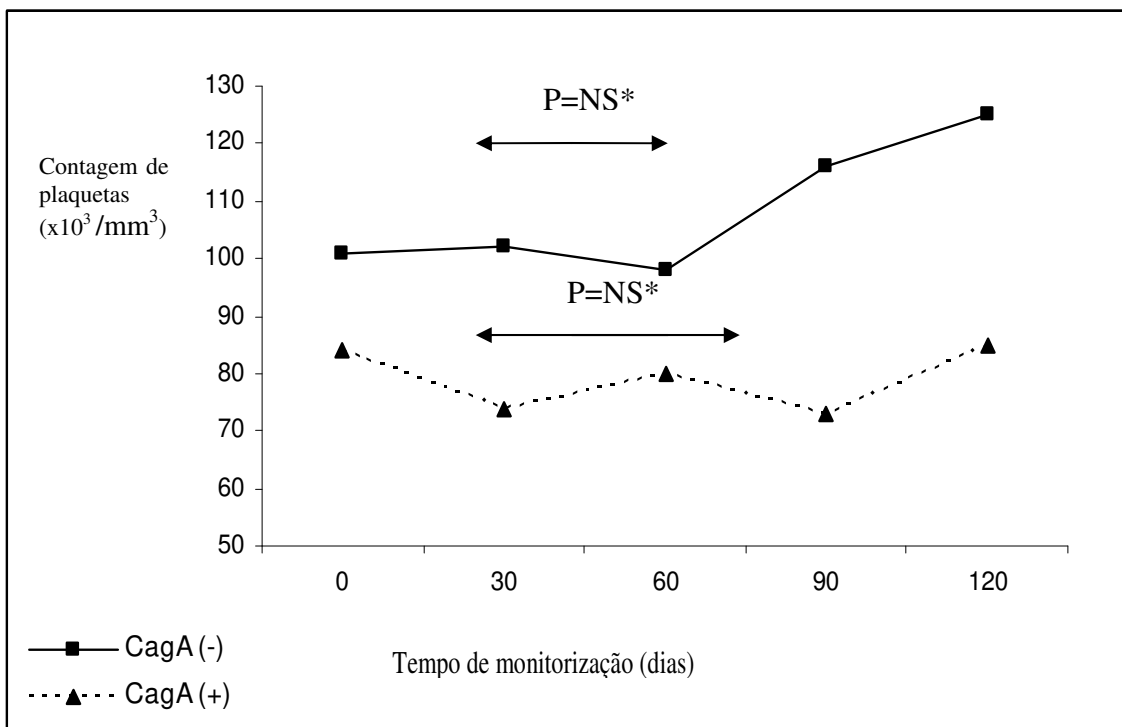
Tabela 4- Resultados dos pacientes com PTI e cagA

	PTI e cagA		Total
	RC	SR	
Gene cagA negativo	7 (21,2%)	16 (48,4%)	23
Gene cagA positivo	3(9,0%)	7 (21,2%)	10



Box-plot – Média e Desvio padrão da contagem de plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$) nos grupos CagA negativos (A) e CagA positivo (B); * *Mann-Withney*.

Figura 5- Gráfico demonstrativo da contagem das plaquetas nos grupos A e B do gene cagA obtidos pela PCR



Cinética da contagem de plaquetas nos grupos CagA positivo e CagA negativo. * *Wilcoxon (signed-rank test)*.

Figura 6- Resultados obtidos através do estudo referido de monitorização das plaquetas do grupo A e B

Tabela 5- Estatística descritiva da idade dos pacientes com PTI

Estatística Descritiva			
n = 33			
Idade (anos)	Média ± D.P.	Mínimo – Máximo	Mediana
	42,7 ± 10,4	26 – 61	42

Tabela 6- Resultados dos pacientes com PTI e gene *cagA* considerando somente remissão completa

Remissão completa			
cagA	presente	ausente	Total
positivo	3	7	10
negativo	7	16	23
Total	10	23	33

* teste exato de Fisher $P^* = 0,65$.

Tabela 7- Resultados dos pacientes com PTI e gene *cagA*, considerando remissão completa e parcial (juntas).

Remissão completa e parcial			
cagA	presente	ausente	Total
positivo	7	3	10
negativo	13	10	23
Total	20	13	33

* teste exato de Fisher $P^* = 0,73$

Tabela 8- Resultados obtidos para detecção do DNA da bactéria pela *nested* PCR, para a região do gene *ureC*, *cagA* PCR simples nos pacientes com diagnóstico de PTI.

AMOSTRA	PACIENTE	HC	DETECÇÃO	cagA	UREASE C
P 01	C R	776858-6	positivo	negativo	positivo
P 02	C M F	679387-9	positivo	negativo	positivo
P 03	D A S	795172-9	positivo	negativo	positivo
P 04	G C A	628389-0	positivo	positivo	positivo
P 05	L D P	6666014	positivo	negativo	positivo
P 06	M A P P	761906-6	positivo	negativo	positivo
P 07	M H C O	632877-3	positivo	negativo	positivo
P 08	M I A F	412151-3	positivo	positivo	positivo
P 09	M C F	540493-8	positivo	negativo	positivo
P 10	M I P	765514-7	positivo	negativo	positivo
P 11	M A B	651277-7	positivo	positivo	positivo
P 12	N V S	268707-2	positivo	negativo	positivo
P 13	O S G	330095-6	positivo	negativo	positivo
P 14	T M S R	567691-7	positivo	negativo	positivo
P 15	J C S R	795183-8	positivo	positivo	positivo
P 16	F N S	872056-1	positivo	negativo	positivo
P 17	A Z V	879659-8	positivo	positivo	positivo
P 18	J B S	911786-2	positivo	positivo	positivo
F 01	DG	9791528	positivo	negativo	positivo
F 02	SSF	5046081	positivo	negativo	positivo
F 03	TAS	5676917	positivo	negativo	positivo
F 04	GFS	9532286	positivo	negativo	positivo
F 05	MABR	9556307	positivo	negativo	positivo
F 06	MSS	4774223	positivo	negativo	positivo
F 07	LHHC	58745010	positivo	negativo	positivo
F 08	DMA	9581358	positivo	positivo	positivo
F 09	VCS	9581217	positivo	negativo	positivo
F 10	DDR	9433266	positivo	positivo	positivo
F 11	PRS	7029497	positivo	positivo	positivo
F 12	MAP	9559214	positivo	positivo	positivo
F 13	CJ	9662512	positivo	negativo	positivo
F 14	MCC	8639514	positivo	negativo	positivo
F 15	RDSG	6597077	positivo	negativo	positivo

Tabela 9- Resultados obtidos para teste rápido da urease e histologia dos pacientes com diagnóstico de PTI

AMOSTRA	PACIENTE	HC	HISTOLOGIA	TES.UREASE
P 01	C R	776858-6	positivo	positivo
P 02	C M F	679387-9	positivo	positivo
P 03	D A S	795172-9	positivo	positivo
P 04	G C A	628389-0	positivo	positivo
P 05	L D P	6666014	positivo	positivo
P 06	M A P P	761906-6	positivo	positivo
P 07	M H C O	632877-3	positivo	positivo
P 08	M I A F	412151-3	positivo	positivo
P 09	M C F	540493-8	positivo	positivo
P 10	M I P	765514-7	positivo	positivo
P 11	M A B	651277-7	positivo	positivo
P 12	N V S	268707-2	positivo	positivo
P 13	O S G	330095-6	positivo	positivo
P 14	T M S R	567691-7	positivo	positivo
P 15	J C S R	795183-8	positivo	positivo
P 16	F N S	872056-1	positivo	positivo
P 17	A Z V	879659-8	positivo	positivo
P 18	J B S	911786-2	positivo	positivo
F 01	DG	9791528	positivo	positivo
F 02	SSF	5046081	positivo	positivo
F 03	TAS	5676917	positivo	positivo
F 04	GFS	9532286	positivo	positivo
F 05	MABR	9556307	positivo	positivo
F 06	MSS	4774223	positivo	positivo
F 07	LHHC	58745010	positivo	positivo
F 08	DMA	9581358	positivo	positivo
F 09	VCS	9581217	positivo	positivo
F 10	DDR	9433266	positivo	positivo
F 11	PRS	7029497	positivo	positivo
F 12	MAP	9559214	positivo	positivo
F 13	CJ	9662512	positivo	positivo
F 14	MCC	8639514	positivo	positivo
F 15	RDSG	6597077	positivo	positivo

5- DISCUSSÃO

O *Helicobacter pylori* tem sido associado à patogênese de doenças extragástricas, como as doenças coronárias, a urticária idiopática crônica e algumas doenças auto-imunes como a artrite reumatóide, a tiroidite auto-imune, a síndrome de Sjogren e a púrpura de Schoenlein-Henoch. Além disso, nos últimos anos, diversos estudos, principalmente da Itália e do Japão, encontraram que a erradicação do *H. pylori* em pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática (PTI) levou a um substancial e persistente aumento da contagem das plaquetas em mais da metade dos indivíduos tratados, conforme (Gasbarrini et al., 1998) e (Emilia et al., 2001).

Assim, pesquisas recentes de (Franceschi et al., 2007) e (Shiotana et al., 2001) demonstraram que pode haver uma associação entre a PTI e a presença do *H. pylori*. Dessa maneira, é de extrema importância que sejam realizadas novas pesquisas a respeito dos fatores de virulência dessa bactéria e de sua possível influência no desenvolvimento da PTI. (Francischi et al., 2007)

A produção de auto-anticorpos em resposta à infecção pelo *H. pylori* realmente ocorre, sendo observado que anticorpos monoclonais contra os antígenos dessa bactéria têm demonstrado reagir com as células humanas gástricas. Embora o mecanismo exato dessa relação não seja conhecido, estudos sugerem que a semelhança existente entre a estrutura bacteriana e os antígenos plaquetários possa ser importante.

Neste trabalho, investigou-se a presença do *H. pylori* em pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática. Além disso, investigou-se uma possível associação entre o gene *cagA*, decorrente da infecção por *H. pylori*, com a doença hematológica. Estes pacientes receberam como terapia para o *H. pylori* o tratamento triplo recomendado para erradicação da bactéria, com eficácia maior que 80%. Após, esses pacientes receberam a terapêutica específica para erradicação da bactéria, foram analisados no período de quatro meses a contagem das plaquetas.

A incidência da infecção por *H. pylori* no Brasil é alta, Maya (2007) e (Estrada et al., 2007). Os dados a respeito da associação entre os genótipos de *H. pylori* e os quadros clínicos são contraditórios, quando se comparam resultados de países diferentes e até mesmo de regiões dentro de um mesmo país (Mattar et al., 2007). Estudos realizados no

Japão (Sato et al.,2004) demonstram que em pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática e *H.pylori* quando tratados, tem uma melhora significativa da plaquetopenia.

Em relação ao gene *cagA* do *H. pylori* em pacientes com PTI, este tipo de investigação ainda não havia sido realizado no Brasil. Um dos principais fatores de virulência do *H. pylori* é o gene *cagA*, que se relaciona principalmente com doenças gástricas, sendo relatadas também possíveis associações desse gene com doenças extragástricas (Kodama et al.,2007).

Estudos como os realizados por (Emilia et al., 2001) demonstram que, após a erradicação da bactéria, os pacientes com PTI apresentaram um aumento significativo das plaquetas, sendo que esses pacientes tiveram acompanhamento de quatro a seis meses (Emilia et al., 2007) demonstraram que, dentre os vários genes estudados,o *vacA* teria uma relação mais constante com PTI. Sendo o gene *cagA* também importante e presente nesses pacientes.

Pesquisas realizadas no Japão (Ando et al.,2004), envolvendo pacientes com PTI e *H. pylori* positivo estudaram outros genes a fim de investigar a possível relação da doença com o patógeno (Takahashi et al.,2004), tendo sido encontrado o gene *cagA* como o mais freqüente nos pacientes com PTI, com remissão completa. Além disso, outros estudos demonstraram que o gene *cagA* é encontrado nos orientais com grande freqüência. As evidências apontam o *H. pylori* como uma das causas da PTI, embora seu genótipo seja bastante diversificado nos diferentes continentes .

Segundo (Kodama et al.,2007), a melhor resposta dos pacientes com PTI pertence àqueles que têm o gene *cagA* positivo (remissão completa), indicando, essas evidências, que o *H. pylori* desempenha um papel importante no desenvolvimento da PTI.

No Brasil, a prevalência do *H. pylori* é alta e, embora existam indivíduos que não manifestam a doença (Muller et al.,2007), considera-se o gene *cagA* como marcador de virulências nas doenças gástricas, sendo, atualmente, este gene investigado por nós,Em resposta a: nosso grupo de estudo com relação à PTI. O presente trabalho traz resultados diferentes do gene *cagA*, quando comparados com os de (Kodama et al., 2007) e

(Emilia et al.,2007). Há diferenças na resposta de cada paciente, com relação à remissão total dos pacientes com PTI e *H. pylori* positivo. O gene *cagA* foi detectado em 30% das amostras positivas para *H. pylori*, em nosso grupo de estudo, sendo que a análise estatística não demonstrou uma relação entre esse gene e a PTI.

Trabalhos realizados na América do Sul, Maya(2007) e Estrada et al., 2007) quando comparados aos resultados obtidos no Japão, na Itália e na Espanha, demonstram que cada continente tem associação diferente(Emilia et al., 2007). Em relação ao gene *cagA* e PTI ainda não existe relação do *H. pylori* com PTI. Em 33 pacientes estudados, encontramos 27,7% com remissão completa e 33,3% remissão parcial com um total de 61,1%. Esses valores encontrados sugerem que nos pacientes com PTI seja investigada a presença do *H.pylori* e seu mecanismo de ação.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a PCR é uma técnica sensível e específica para detecção do *H. pylori* e para a determinação de suas diferentes cepas, conforme estudos anteriores realizados em nosso laboratório (Röesler, 2006). Porém, os resultados obtidos levam a sugerir que o gene *cagA* não seria um bom marcador para verificar quais pacientes poderiam se beneficiar com a erradicação da bactéria.

Estudos adicionais necessitam serem feitos para melhor a compreensão da relação do *H.pylori* e o gene *cagA* nos pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática.

6- CONCLUSÃO

- *H.pylori* positivo e PTI, 27,7% dos pacientes com remissão completa, 33,3% remissão parcial e 40% sem remissão;
- O gene *cagA* positivo foi observado em 30,3% dos pacientes com PTI e *H.pylori* positivo:
- Nove por cento com remissão e 21,21% sem remissão;
- Entre os pacientes negativos para o gene *cagA*, 21,2% remissão completa e 48,8% sem remissão;
- Neste estudo, não foram encontrados resultados significativos que possam correlacionar a presença do gene *cagA* com o desenvolvimento da púrpura trombocitopênica idiopática.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alm R A. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; 397(6715): 176-180

Ando T, Tsuzuki T, Mizuno T, Minami M, Ina K, Kusugami *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.

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

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

Atherton J C, Cao P, Peek 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.

Beg, D E; Hoffman, P S; Appelmek B J; Kusters J G, 1997. The *Helicobacter pylori* genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol.* 5: 468-474.

Blaser M J e Parsonnet J. Parasitism by the slow bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J Clin Invest* 1994; 94: 4-8.

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

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

Bode G, Mauch F, Malfertheiner P The cocoid formas of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *pidemol 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 an *Campylobacter pylori*.ICS 847.Amsterdam: Elsevier, 48-52,1989.

Byrne M F, Kerrigan S W, Corcoran P A , Atherton J C , Murray F E, Fitzgerald D J *et al.* *Helicobacter pylori* binds von Willebrand factor and interacts with GPIb to induce platelet aggregation. *Gastroenterology* 2003; 124: 1846-1854.

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.

Capurso G, Lahner E, Marcheggiano A, Caruana P, Carnuccio A, Bordi C *at 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.

Cascales E , Christie P J. The versatile bacterial type IV secretion systems.*Nat Rev Microbiol* 2003;1:137-148.

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

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.

Coelho L G V, Zaterka S. II Consenso brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. Federação Brasileira de Gastroenterologia e Núcleo Brasileiro; v 42- Nº 2 – Jun. 2005.

Colding H, Hartzen S H, Roshanisehat, Anderson L P, Krogfelt K A. Molecular methods for typing of *Helicobacter pylori* and their applications. FEMS Immunol Med Microbiol 1999; 24: 193-9

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 aplicação clínica. Polymerase Chain Reaction: principles and clinical applications. Rev Bras Reumatol 1992; 32:142-6.

Covacci A, Telford J L, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* Virulence and Genetic Geography. Science 1999; 284: 1328-1333.

Covacci A, e Rappuoli R. *Helicobacter pylori*: molecular evolution of a bacterial quasispecies. Curr Opin Microbiol. 1998; 1: 96-102.

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, investigation and management. The Journal of Pediatrics 2005 ; 21-26.

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

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.

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

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.

Emilia G, Luppi M, Zucchini P, Morselli M, Porenza L, Forghieri F *et al.* *Helicobacter pylori* infection and chronic immune thrombocytopenic purpura: long-term results of bacterium eradication and association with bacterium virulence profiles. Blood 2007;v.110. N° 12.

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.

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

Estrada R A, Ortega I P, Barreda M C, Ruiz G J. *Helicobacter pylori* infection and thrombocytopenia: A single- institution experience in México. Rev Invest, 2007. 59, 2: p.

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.

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

Fernández M C, Munôz D S, Díaz E G, Galan 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.

Franceschi F, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* and estragastric diseases. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2007; 21; 325-334.

Gasbarrini A, Franceschi F, Tartaglione T, Landolfi R, Pola P, Gasbarrini G. Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of *Helicobacter pylori*. *The Lancet*.1998; 352: 878.

Gasbarrini A, Franceschi F. Autoimmune diseases and *Helicobacter pylori* infection. *Biomed Pharmacother* 1999; 53: 223-6.

Gasbarrini A, Franceschi F, Tartaglione R *et al.*, Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1998; 352: 878.

Ge, Z eTaylor, D E. Contributions of genome sequencing to understanding the biology of *Helicobacter pylori*.*Annu.Rev. Microbiol* 1999; 53: 353-87.

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

George J N. Treatment options for chronic idiopathic (immune) thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2000; 37(1 supp 1): 31-4.

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

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

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.

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

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

Hino M, Yamane T, Park K *et al*. Platelet recovery after eradication of *Helicobacter pylori* in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. Ann Hematol 2003; 82: 30-32.

Hofman, P;Waider, B;Hofman, V., Bereswill, S;Brest, P ,Kist. M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter 2004; 9: 15-22.

Huber M R, Kumar S, Tefferi A. Treatment advances in adult immune thrombocytopenic purpura. Ann Hematol 2003; 82: 723-737.

Jackson S, Beck P L, Pineo G F, Poon M C. *Helicobacter pylori* eradication: novel therapy for immune thrombocytopenic purpura? A review of the literature. Am J Hematol 2005; 78: 142-150.

Johnton 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.

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; 51: 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*. Bundesgesundheitsblatt G G 2005; 48: 6: 669-78.

Kodama M, Kitadai Y, Ito M, Kati H, Masuda H, Tanaka S *et al*. Immune Response to CagA Protein is Associated with improved platelet count after *Helicobacter pylori* eradication in patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. Helicobacter 2007; 12: 36-42.

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

Kohda K, Kuga T, Kogawa K *et al.*, Effect of *Helicobacter pylori* eradication on platelet recovery in Japanese patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura and secondary autoimmune thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 2002; 118: 584-588.

Ko G H, Park H B, Shin MK. Monoclonal antibodies against *Helicobacter pylori* cross-react with human tissue. Helicobacter 1997; 2: 210-215.

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

Ladeira M S P, Salvador D M F, Rodrigues M A M. Biopathology of *Helicobacter pyloiri*. J Brás Patol Méd Lab 2003; 39; 4: 335-342.

Lage A P, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler J P, Bollen *et al.* Diagnosis of *Helicobacter pylori* by PCR: comparasion with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. J Clinical Microbiology.Oct.1995, p.2752 – 2756. vol.33.Nº 10.

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

Latchman D S. PCR Applications in Pathology. Principles and Practice. Oxford University Press1995.

Lee A.The *Helicobacter pylori* genome-new insights into pathogenesis and therapeutics. New Eng J Med 1998; 338; 1: 833-834.

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

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, Yamaka Y. Duodenal Ulcer Promoting Gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol 2005; 128: 833-848.

Machet L, Vaillant L, M.C. Machet *et al.*, Schönlein-Henoch Purpura Associated with Gastric *Helicobacter pylori* Infection. Dermatology 1997; 194: 84.

Makristathis A, Pasching E, Schutze K, Wimmer M, Rotter M L, Hischl A M. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 1998; 36: 2772-4.

Maya G C. Proof of and association between *Helicobacter pylori* and idiopathic thrombocytopenic purpura in Latin America. Helicobacter 2007; 12: 265-273.

Malfertheiner P, Megraud F, Morain O C, Bazzoli F, Osmar E E I, Graham D *et al.* Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. The European Helicobacter pylori Study Group (EHSg) 2007; 56: 772-81.

Marc Michel, M D Mehdi khellaf *et al.*, Autoimmune Thrombocytopenic Purpura and *Helicobacter pylori* Infection Arch Intern MED. Vol 162, may 13, 2002.

Marshall B J, 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, 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.

Mattar R; Marques S B, Moteiro M S, Santos A F, Iriya K, Carrilho F J. *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. J Med Microbiol 2007; 56: 9-14.

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.

McMillan R. The pathogenesis of chronic immune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. Semin Hematol 2000; 37; (1 suppl 1): 5-9.

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

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

Michel M, Cooper N, Jean C, Frissora C, Bussel J B. Does *Helicobacter pylori* initiate or perpetuate immune thrombocytopenic purpura? Blood 2004; 103: 890-896.

Muller L B, Fagundes R B, Moraes C C, Rampazzo A. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer precursor lesions in patients with dyspepsia. Ar. Gastroenterol 2007; 44, p. São Paulo.

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): 323-36.

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

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

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.

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

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

Pacheco A R. Implicação de genes da ilha de patogenicidade *cag* (*PAIcag*)de *Helicobacter pylori* no desenvolvimento de doenças gastroduodenais. [Dissertação mestrado]. Campinas: Univercidade Estadual de Campinas; 2007.

Pamuk G E, Pamuk O N, Baslar Z, Öngören S, Soysal T, Ferhanoglu B et al. Overview of 321 patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. Retrospective analysis of the clinical features and response to therapy. *Ann Hematol* 2002;81: 436-440.

Parsonnet J, Friedman G D, Vandersteen D P, Chang Y, Vogelman T H, Orentreich N, Sibley R K. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Méd* 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.

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.

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

Perez-Perez G I, Rothenbacher D; Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004 9: 1-6.

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

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

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

Pinto A P, Villa L L. A spin cartridge system for DNA extraction from paraffin wax embedded tissues. J Clin Pathol: Mol Pathol 1998;51:48- 49.

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

Queiroz D M, Mendes E N, Rocha G A, Oliveira A M, Magalhães P P *et al.*, CagA-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. Int J Cancer 1998; 78: 135-9.

Queiroz D M, Mendes E N H. *Helicobacter pylori* em outros microorganismos espiralados gástricos: aspectos microbiológicos. In: Castro, L P; Rocha, P.R. S.; Coelho L G V (editores). Tópicos em Gastroenterogia. São Paulo: Medsi, 1993.p. 235-248,v.4.

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

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, endoscopic, 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

Röesler B M. *Helicobacter pylori* em pacientes com ulcera péptica e gastrite crônica: detecção pela nested PCR e pela PCR e genotipagem pelos genes Urease C e UreaseB. [Dissertação mestrado] Campinas: Universidade Estadual de Campinas;2006.

Rotherbacher 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.

Santanu D C, Rayashru P. Multiplex PCR assay for rapid detection and genotyping of *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens. J Clinical Microbiology. June 2004. p.2821-24.

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

Sato R, Murakami K, Watanabe K, Okimoto T, Miyajima H, Ogata M *et al.* Effect of *Helicobacter pylori* eradication on platelet recovery in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Arch Intern med 2004; 164p

Shiotani A, Okada K, Yanoaka K, Itoh H, Nishioka S, Sakuramoto M, Matsunaka M. Beneficial effect of *Helicobacter pylori* eradication in dermatologic diseases. Helicobacter 2001; 6: 60-5.

SP Demográfico. Resenha de estatísticas vitais do estado de São Paulo. 2007; novembro: ano 8 - Nº 3.

STITES Daniel P, Terri Abbas Parslow T G. Imunologia Médica 9ª edição editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. Pg. 388 a 391.

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

Takahashi T, Yujiri T, Shinohara K , Inoue Yusuke, Sato Yet, Fujii Y *et al.*, Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* cagA protein may be involved in the pathogenesis of *H.pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. 2004 British J of Haematology; 124: 91-6.

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

(The) American Society of Hematology ITP Practice Guideline Panel. Diagnosis and treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura: recommendations of the American Society of Hematology. Ann Intern Med 1997; 126: 319-326.

Thijs J C, Van Zwet A A, Thijs W J, Oey H B, Karrenbeld A, Stellard 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.

Thude H, Gatzka E, Anders O, Barz D. Allele frequencies of human platelet antigen 1, 2, 3 and 5 systems in patients with chronic refractory autoimmune thrombocytopenia and in normal persons. Vox Sang 1999; 77: 149-153.

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.

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.

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 *et al.*, Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* Taxonomy and emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. Nov Int J Syst Bacteriol 1991; 41(1): 88-103.

Veneri D, Franchini M, Gottardi M. Efficacy of *Helicobacter pylori* eradication in raising platelet count in adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. Haematologica 2002; 87: 1177-1179.

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

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

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

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

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

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

Zeitune J M R, Lorena S L S. Relação do *Helicobacter pylori* com doenças extra-digestivas. Investigações mais rigorosas são necessárias. Rev. Cond. Ter. Gastro 2007 9: 35 – 44. conferir

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

8- APÊNDICES

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE _____
REGISTRO HOSPITALAR – HC _____ DATA NASCIMENTO __/__/__
DOCUMENTO DE IDENTIDADE _____ SEXO ____ IDADE _____
ENDEREÇO _____ No. _____ APTO. _____
BAIRRO _____ CIDADE _____ CEP _____
TELEFONE (DDD) _____ RECADO _____

2. RESPONSÁVEL LEGAL _____
NATUREZA (grau de parentesco) _____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE _____ SEXO _____
DATA DE NASCIMENTO __/__/____
ENDEREÇO _____ No. _____ APTO. _____
BAIRRO _____ CIDADE _____ CEP _____
TELEFONE (DDD) _____

APÊNDICE 2

Título do protocolo de pesquisa: Erradicação do *H. pylori* em pacientes com Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI)

Pesquisador: Telma Barbosa de Oliveira – RA: 049148

Telefone: (19) 3828-8436 ou (19) 96422262 – E-mail: telma_barbosa@bol.com.br

1. Justificativa e os objetivos de pesquisa: acompanhar pacientes seguidos no Hemocentro da Unicamp, com púrpura trombocitopênica idiopática associada à bactéria *Helicobacter pylori* que, possivelmente, seria uma das causas dessa doença. Para isso, será realizada uma pesquisa chamada *Helicobacter pylori* em pacientes com Púrpura Trombocitopênica Idiopática. O objetivo deste estudo será avaliar entre os pacientes com essa doença a sua provável causa. Estudaremos a infecção pelo *H. pylori* e poderemos entender melhor a relação da bactéria com as plaquetas, já que esse é o suposto motivo da doença.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: se você / seu filho (a) concorda em participar desse estudo, após a assinatura desse documento, o Termo de Consentimento, serão coletados 2 fragmentos de tecido gástrico por biópsia, os quais serão utilizados para: obter o DNA para PCR (reação em cadeia da polimerase), que será usado na determinação do *H. pylori* e identificação de sua cepa. Nenhuma alteração ou interferência em seu tratamento será feita em decorrência de sua participação nesse estudo. Um questionário, com perguntas sobre você, o diagnóstico e a evolução de sua doença, será feito pelo seu médico, para que possa entender melhor os resultados que esperamos encontrar. Você terá assegurado o direito de livre acesso aos resultados dos exames realizados nesse estudo.

3. Desconforto e riscos esperados: durante a coleta da biópsia, você poderá sentir um desconforto leve e, após a coleta, permanecerá sob o efeito do medicamento usado no procedimento médico, deixando você um pouco sedado.

Esclarecimento dado pelo pesquisador sobre garantias do sujeito da pesquisa, consignando:

Acesso, a qualquer tempo, das informações sobre riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. Se você tiver qualquer dúvida ou pergunta sobre este estudo, você poderá entrar em contato com o Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia.

Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à assistência. Se você concordar em participar do estudo “Erradicação do *Helicobacter pylori* em pacientes com Púrpura Trombocitopênica Idiopática”, você poderá mudar de idéia e se retirar do estudo a qualquer momento. Se não quiser participar, você continuará a ser tratado normalmente aqui no Hemocentro da Unicamp. Todas as informações serão mantidas em sigilo dentro dos limites da lei e os arquivos da pesquisa serão identificados por nomes e códigos, com acesso restrito ao pesquisador e ao médico do Hemocentro da Unicamp. Caso aconteça algum problema durante a coleta, esta será interrompida e você terá atendimento gratuito da equipe do médico responsável no momento.

APÊNDICE 3

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador, e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa, intitulado “Erradicação do *Helicobacter pylori* em Pacientes com Púrpura Trombocitopênica Idiopática”.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

data

assinatura do pesquisador

data