

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Érika Gonçalves de Oliveira

**CORRELAÇÃO DE MARCADORES GENÔMICOS E DA
DENSIDADE RELATIVA DE POPULAÇÕES DE
Helicobacter pylori (\mathcal{E} -Proteobacteria: Helicobacteraceae)
EM PACIENTES PORTADORES DE AFECÇÕES
GÁSTRICAS.**

Mogi das Cruzes, SP

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Érika Gonçalves de Oliveira

**CORRELAÇÃO MARCADORES GENÔMICOS E DA
DENSIDADE RELATIVA DE POPULAÇÕES DE
Helicobacter pylori (ϵ -Proteobacteria: Helicobacteraceae)
EM PACIENTES PORTADORES DE AFECÇÕES
GÁSTRICAS.**

Dissertação apresentada à Universidade de Mogi das Cruzes, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Recursos Naturais e Agronegócios.

Orientador: Professor Dr. Douglas Mascara

**Mogi das Cruzes, SP
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Oliveira, Érika Gonçalves de

Correlação de marcadores genômicos e da densidade relativa de populações de *Helicobacter pylori* (Proteobacteria : Helicobacteraceae) em pacientes portadores de afecções gástricas / Érika Gonçalves de Oliveira. – 2010.

118 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2010

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Recursos Naturais e Agronegócios

Orientador: Profº Drº Douglas Mascara

1. *H. pylori* 2. *vacA* 3. *cagA* I. Mascara, Douglas

CDD 579.3



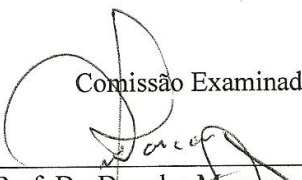
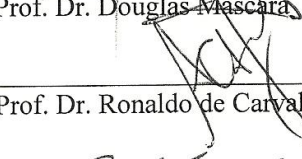

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quinze horas do dia sete de julho de dois mil e dez, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Correlação da diversidade genômica e da densidade relativa de populações helicobacter pylori (*ε-proteobacteria: helicobacteraceae*) em pacientes portadores de afecções gástricas" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Érika Gonçalves de Oliveira**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Douglas Mascara e Wellington Luiz Araújo da Universidade de Mogi das Cruzes e Ronaldo de Carvalho Araújo da Universidade Federal de São Paulo, sob a presidência do(a) primeiro(a), como orientador(a) da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADA por UNANIMIDADE
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 07 de julho de 2010.

Comissão Examinadora	Julgamento
 _____ Prof. Dr. Douglas Mascara	<u>APROVADA</u> <small>(aprovado(a)/reprovado(a))</small>
 _____ Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo	<u>APROVADA</u> <small>(aprovado(a)/reprovado(a))</small>
 _____ Prof. Dr. Wellington Luiz Araújo	<u>APROVADA</u> <small>(aprovado(a)/reprovado(a))</small>

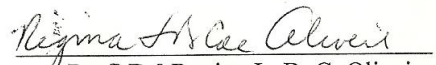
ADENDO

ADENDO À ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quinze horas do dia sete de julho de dois mil e dez, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação “Correlação da diversidade genômica e da densidade relativa de populações *helicobacter pylori* (ϵ -*proteobacteria: helicobacteraceae*) em pacientes portadores de afecções gástricas” para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Érika Gonçalves de Oliveira**.

Em adendo, o título da dissertação, conforme sugestão da banca, foi alterado para “Correlação de marcadores genômicos e da densidade relativa de populações de *helicobacter pylori* (ϵ -*proteobacteria: helicobacteraceae*) em pacientes portadores de afecções gástricas”, o que deverá constar nas cópias definitivas da dissertação.

Mogi das Cruzes, 07 de julho de 2010.


Prof^a Dr^a Regina L. B. C. Oliveira
Coordenadora do Programa
Pós-Graduação em Biotecnologia

Aos meus pais.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Douglas Mascara, por compartilhar comigo seu tema de pesquisa, sendo um interlocutor disposto a oferecer estímulos e, principalmente, a percorrer novos caminhos, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam durante o processo de reflexão. Por ser paciente e generoso e pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. Por sua amizade, principalmente. Pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Pela alegria de trabalharmos juntos.

Ao professor Dr. Fábio Henrique Kwasniewski por sua disponibilidade em trocar informações, sugestões e críticas fundamentais à confecção deste trabalho. Por estimular novas idéias e pelas longas horas de conversa.

Ao professor Dr. Milton Rocha de Moraes pela alegre convivência e por seu incentivo ao longo deste processo de aprendizagem.

Ao Dr. Rui Afonso Bassani, pela realização das coletas das biópsias gástricas, por compartilhar seus conhecimentos e pela empolgação demonstrada durante o desenvolvimento do projeto.

Ao professor Dr. Pedro Frare, pelo auxílio em alguns importantes procedimentos estatísticos utilizados nessa dissertação.

A toda equipe do Setor de Endoscopia do Hospital Luzia de Pinho Melo, pela dedicação e cuidado com os pacientes, pelo bom humor constante, pelo otimismo e incentivo constantes em nossa atividade diária.

Ao Diego Watanabe e à Aline Miyuki, que dão sentido às atividades de ensino e que representam a continuidade e a renovação de nossas idéias.

À Tatiana e à Vanessa, pelo auxílio nos momentos importantes e pelo apoio durante essa caminhada.

Aos meus tios Nicéia e Darwin por terem me acolhido de maneira tão carinhosa e generosa.

À Adriana, Luciana e ao Rafa, pela amizade e incentivo no convívio diário.

E de maneira muito especial e carinhosa, ao amigo Fernando Mafra, cujo entusiasmo e dedicação deram sentido e rumo a este trabalho. Sem a sua amizade esta jornada não teria sido possível.

RESUMO

Helicobacter pylori é um microorganismo espiralado, gram-negativo e flagelado, que habita o trato gastrointestinal do homem. Infecta cerca de 50% da população mundial, contudo apenas 15% dos indivíduos portadores desenvolvem alguma afecção gástrica. Muitas linhagens produzem fatores que modulam a resposta imunológica do hospedeiro, aumentando o risco de desenvolvimento de úlcera gástrica, adenocarcinoma gástrico e possivelmente outras patologias. Os objetivos do presente estudo foram determinar a prevalência do microorganismo em pacientes com enfermidades gástricas, atendidos pelo Setor de Endoscopia do Hospital Luzia de Pinho Melo, Mogi das Cruzes/SP. A partir das biópsias recolhidas procuramos verificar a diversidade das linhagens por intermédio de marcadores moleculares específicos. Além disso, verificamos a existência de correlações entre diversos parâmetros dos pacientes e a diversidade genética e a densidade bacteriana. As biópsias coletadas e armazenadas (álcool 70%; -20°C) foram submetidas à extração do DNA genômico através do método Fenol-clorofórmio. Sequência específica para o gene *Urease C* foi utilizado como marcador para a presença de *H.pylori* em ensaios de amplificação (PCR). Os *loci vacA* e *cagA*, relacionados ao nível de patogenicidade da bactéria, também foram examinados. O *loco vacA*, possui duas regiões variáveis, a região sinal (variantes s1 e s2) e a região média (variantes m1 e m2), cuja combinação de haplótipos tem sido associada a padrões distintos de virulência. Verificamos elevada prevalência da infecção pela *H.pylori*, 76% dos pacientes estão infectados. Entre os fatores correlacionados, a idade e o gênero apresentaram maior probabilidade preditiva para as diversas patologias gástricas examinadas. Entretanto, apenas o marcador s1 apresentou significativa capacidade preditiva para o desenvolvimento de úlcera, gastrite e esofagite. O marcador da ilha de patogenicidade, *cagA* apresentou significativa capacidade preditiva apenas para o desenvolvimento de úlceras gástricas. Padronizamos protocolo de quantificação (qPCR) relativa das cepas através do marcador *m1*. Houve diferença significativa entre a densidade relativa de *H. pylori* e pacientes portadores de diferentes patologias gástricas.

Palavras-Chaves: *H.pylori*; *vacA*; *cagA*

ABSTRACT

Helicobacter pylori is rod-shaped, Gram-negative and flagellated microorganism that colonize the gastrointestinal tract of the man. This bacterium is highly prevalent, about 50% of the world-wide population is infected. However, only about 15% of infected individuals develop some gastric disease. Many strains produce factors that modulate the immune response of the host, increasing the risk of development of esophageal adenocarcinoma and ulcer gastric. The aims of the present study were to determine the prevalence of the microorganism in patients with gastric diseases, attended by Digestive Endoscopy Sector of the Hospital Luzia de Pinho Melo, Mogi of the Cruzes/SP. Gastric biopsies were collected and the diversity of strains was determined using specific molecular markers. Moreover, we evaluated by multiple logistic regression a direct correlation between *H. pylori* infection and biological and clinical parameters of the patients. The genetic diversity and the bacterial density also were analyzed. The biopsies were stored in alcohol (70%) at -20°C. The samples were submitted to DNA genomic extraction using the phenol-chloroform method. Specific sequence for the gene *urease C* was used as a marker for the infection of *H.pylori* in the amplification assays (PCR). The *vacA* and *cagA loci* also were examined with the level of pathogenicity of the bacterium. The *vacA* locus has two variable regions, the signal region: s1 and s2 variant and the medium region: m1 and m2 variant. Specific haplotype combinations have been associated associated with different patterns of virulence. We have verified a high prevalence of the infection for the *H.pylori*, 76% of the patients are infected. The age and the sex were the factors that showed higher predictive power to the gastric disease. Only the marker *s1* of *H. pylori* showed a significant predictive capacity of development of gastritis and esophagitis. The marker of the pathogenicity island, *cagA* showed a significant predictive capacity only for the development of gastric ulcer. A protocol of quantification (qPCR) was developed for *H. pylori* using the marker *m1* specific strain. A significant difference was found between the population density of *H. pylori* and the gastric diseases.

Key-words: *H.pylori*; *vacA*; *cagA*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	<i>Primers</i> utilizados para amplificação dos alelos do gene <i>vacA</i> e do gene <i>cagA</i> da <i>Helicobacter pylori</i>	43
Tabela 2:	Frequência de distribuição dos alelos de <i>H. pylori</i> de acordo com as patologias dos pacientes.....	54
Tabela 3:	Capacidade preditiva dos parâmetros relacionados aos portadores de Patologias Ulcerativas e a <i>Helicobacter</i>	58
Tabela 4:	Capacidade preditiva dos parâmetros relacionados aos portadores de Úlcera e a <i>Helicobacter pylori</i>	61
Tabela 5:	Capacidade preditiva dos parâmetros relacionados aos portadores de Gastrite e a <i>Helicobacter pylori</i>	63
Tabela 6:	Capacidade preditiva dos parâmetros relacionados aos portadores de Pangastrite e a <i>Helicobacter pylori</i>	65
Tabela 7:	Capacidade preditiva dos parâmetros relacionados aos portadores de Bulbite e a <i>Helicobacter pylori</i>	67
Tabela 8:	Capacidade preditiva dos parâmetros relacionados aos portadores de Esofagite e a <i>Helicobacter pylori</i>	69
Tabela 9:	Capacidade preditiva dos parâmetros relacionados aos portadores de Pólipo e a <i>Helicobacter pylori</i>	71
Tabela 10:	Correlação entre as patologias estudadas e os valores de CT encontrados após a amplificação do alelo m1	76
Tabela 11:	Prevalência de cepas de <i>Helicobacter pylori</i> em diferentes países.....	84

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Representação esquemática da mucosa gástrica colonizada pela <i>Helicobacter pylori</i>	25
Figura 2:	<i>Helicobacter pylori</i>	28
Figura 3:	Diversidade alélica do gene <i>vacA</i>	31
Figura 4:	Gel de agarose (2%): padrão de bandas relativo a diferentes genes e alelos em <i>Helicobacter pylori</i>	46
Figura 5:	Freqüência de distribuição de <i>Helicobacter pylori</i> de acordo com as patologias	47
Figura 6:	Freqüência de distribuição de <i>Helicobacter pylori</i> de acordo com as idades	48
Figura 7:	Freqüência de distribuição de <i>Helicobacter pylori</i> de acordo com o sexo	49
Figura 8:	Padrão de bandas amplificadas em gel de agarose (2%) relativo aos genes Urease C e CagA	50
Figura 9:	Padrão de bandas amplificadas em gel de agarose (2%) relativo aos <i>loci</i> s1 e s2	50
Figura 10:	Padrão de bandas amplificadas em gel de agarose (2%) relativo aos <i>loci</i> m1 e m2	51
Figura 11:	Freqüência de distribuição dos alelos de <i>Helicobacter pylori</i>	52
Figura 12:	Freqüência de distribuição das combinações entre as sequências s e m de <i>Helicobacter pylori</i>	55
Figura 13:	Freqüência de distribuição das combinações dos alelos de <i>Helicobacter pylori</i>	56
Figura 14:	Estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver patologias ulcerativas de acordo com a presença de parâmetros relativos ao hospedeiro e de variações alélicas relacionadas à <i>Helicobacter pylori</i>	59

Figura 15: Estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver úlcera de acordo com a presença de parâmetros relativos ao hospedeiro e de variações alélicas relacionadas à <i>Helicobacter pylori</i>	60
Figura 16: Estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver gastrite de acordo com a presença de parâmetros relativos ao hospedeiro e de variações alélicas relacionadas à <i>Helicobacter pylori</i>	62
Figura 17: Estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver pangastrite de acordo com a presença de parâmetros relativos ao hospedeiro e de variações alélicas relacionadas à <i>Helicobacter pylori</i>	64
Figura 18: Estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver bulbite de acordo com a presença de parâmetros relativos ao hospedeiro e de variações alélicas relacionadas à <i>Helicobacter pylori</i>	66
Figura 19: Estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver esofagite de acordo com a presença de parâmetros relativos ao hospedeiro e de variações alélicas relacionadas à <i>Helicobacter pylori</i>	68
Figura 20: Estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver pólipos de acordo com a presença de parâmetros relativos ao hospedeiro e de variações alélicas relacionadas à <i>Helicobacter pylori</i>	70
Figura 21: Curva de dissociação das amplificações efetuadas através da aplicação dos <i>primers</i> VA3-F e VA3-R para o alelo m1.....	72
Figura 22: Curva exponencial de amplificação do alelo m1 de <i>Helicobacter pylori</i> , evidenciando a diluição do produto amplificado.....	73
Figura 23: Curva exponencial de amplificação do gene m1 de <i>Helicobacter pylori</i> , evidenciando a diluição do produto amplificado de acordo com as patologias.....	74
Figura 24: Média dos valores de Ciclo Exponencial encontrados em diversas patologias de pacientes atendidos no setor de Endoscopia do Hospital Luzia de Pinho Melo MC/SP.....	75
Figura 25: Coeficiente de densidade relativa inicial entre diferentes amostras oriundas de pacientes portadores de diferentes quadros clínicos.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BabA	<i>Blood-group antigen-binding adhesin A</i>
CagA	Citotoxina Associada ao Gene A
CagE	Citotoxina Associada ao Gene E
CT	Cycle Threshold
DupA	<i>Duodenal ulcer promoting gene A</i>
FlaA e FlaB	Gene Flagelina A e B
<i>H.pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HP-NAP	Proteína de Ativação de Neutrófilos
IL-8	Interleucina 8
PAI	Ilha de Patogenicidade
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase – Quantitativo
SabA	<i>Siliac acid-binding adhesin A</i>
VacA	Citotoxina Vacuolizante

LISTA DE ANEXOS

Anexo I: Número do Registro do Projeto no CONEP.....	109
Anexo II: Processo CEP.....	110
Anexo III: Parecer de aprovação pelo Comitê de Ética do projeto de pesquisa.....	112
Anexo IV: Termo de liberação de pesquisa científica a ser realizada no Hospital das Clínicas Luzia de Pinho Melo.....	113
Anexo V: Formulário do participante.....	114
Anexo VI: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	117

SUMÁRIO

1. Introdução	
1.1 Biologia e transmissão da <i>Helicobacter pylori</i>	20
1.2 Patogenicidade	21
1.3 Patologias gástricas comumente associadas à infecção por <i>H. pylori</i>	
1.3.a Gastrite	25
1.3.b Pangastrite	26
1.3.c Úlceras gástricas	26
1.3.d Esofagite	26
1.3.e Bulbite e Metaplasia	27
1.3.f Pólipos	27
1.4 Genoma	28
1.5 Toxinas e haplótipos	30
1.6 Epidemiologia	33
a) Fatores de risco intrínsecos.....	33
b) Fatores de risco extrínsecos.....	33
1.7 Distribuição da infecção	
1.7.a) Cavidade Oral.....	35
1.7.b) Vesícula Biliar.....	35
1.8 PCR Quantitativo	36
2. Objetivos	
2.1 Gerais	37
2.2 Específicos	38

3. Método	
3.1 Seleção de Participantes	39
3.1.1 Parâmetros analisados.....	39
3.2 Anamnese dos grupos amostrais	40
3.3 Coleta de material biológico	40
3.4 Correlação de prevalência de <i>H. pylori</i> com patologias gástricas.....	41
3.5 Extração de DNA	41
3.6 Amplificação por PCR e detecção do produto de DNA amplificado.....	42
3.7 qPCR	43
3.7.1 Determinação da curva de diluição.....	44
3.8 Análises Estatísticas	44
4. Resultados	
4.1 Nível de prevalência de <i>H. pylori</i>	46
4.2 Identificação e caracterização das cepas de <i>H. pylori</i>	49
4.3 Diversidade de cepas	51
4.3.1 Nível de prevalência das diferentes cepas.....	51
4.3.2 Análise de correlação da diversidade de cepas com a ocorrência das diferentes afecções gástricas.....	57
4.4 Estimativa da densidade relativa inicial de populações <i>H. pylori</i> em pacientes com diferentes afecções gástricas.....	72
4.4.1 Padronização da metodologia.....	72
4.4.2 Comparação entre as amostras, referente à densidade relativa das populações de <i>H. pylori</i>	73
5. Discussão	78

6. Conclusões	90
7. Referências	91
8. Anexos	109

1. INTRODUÇÃO

O estômago é um órgão glandular endócrino e exócrino complexo (DANI & CASTRO, 1993). As células parietais presentes na mucosa gástrica, são capazes de sintetizar, ácido clorídrico e pepsina (MILLER *et al.*, 2010). A pepsina é uma enzima proteolítica que só é ativa em pH muito ácido, cuja função é quebrar as ligações peptídicas das proteínas transformando-as em peptídios (KAMANGAR *et al.*, 2009).

As células parietais produzem também uma glicoproteína, conhecida como fator intrínseco, que é responsável pela absorção de vitamina B12 (WUERGES *et al.*, 2007).

Outro grupo de células importantes presentes na mucosa gástrica, são as células G, capazes de secretar a gastrina (COPPS *et al.*, 2009). Este hormônio age nas células parietais estimulando a secreção ácida (FRANEK *et al.*, 2009).

A proteção da parede gástrica contra agressões é atribuída à alta velocidade das mitoses do seu epitélio e, também, ao muco. O muco é produzido pelas células superficiais e pelas glândulas da cárdia, do fundo e do piloro (DANI & CASTRO, 1993).

A camada de muco protege o epitélio de forma mecânica, lubrificando a parede gástrica e prevenindo sua erosão. A composição hidroeletrólítica constitui o principal fator de proteção do muco e a interação do ácido clorídrico (HCl) com o bicarbonato, neutraliza parcialmente e evita a agressão à camada epitelial.

Quando ocorre descontinuidade da camada de muco, há uma facilitação à penetração do suco gástrico para a mucosa gástrica, de modo que passará a ser diretamente agredida (BRZOZOWSKA *et al.*, 2009).

1.1 Biologia e transmissão da *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (ε-Proteobacteria: Helicobacteraceae) é um bacilo gram-negativo, móvel, curvado ou espiralado, microaeróbico, de difícil isolamento em meios de culturas convencionais e que possui um tamanho entre 2,5 a 5µm. Foi isolado pela primeira vez em 1982 por Warren e Marshall, em biópsias de pacientes com gastrite crônica (MARTINEZ, 2001). O seu habitat natural é o epitélio gástrico humano onde mantêm sua forma espiral característica, entretanto, pode se converter em uma forma coccóide quando exposto a condições ambientais desfavoráveis (AZEVEDO, 2007). O ser humano é o principal reservatório natural da *H. pylori* (FOX, 1995; MENDALL, 1995). Entretanto, estudos demonstraram a ocorrência de contaminação de gatos domésticos (*Felis silvestris*), sugerindo que os mesmos possam servir como reservatórios e vetores para o agente infeccioso (HANDT, 1994). Todavia, tem sido proposto que a transmissão predominante ocorra através de contaminação oral e fecal-oral (GOODWIN *et al.*, 1989).

Ensaio com o objetivo de compreender os mecanismos de transmissão do microorganismo dependem da eficiência dos métodos de cultura dessas células em laboratório (KORWIN, 2003). Entretanto, a manutenção de uma cultura deste patógeno humano é considerada difícil, uma vez que se trata de um organismo extremamente fastidioso, o qual requer no mínimo três dias de crescimento a 37°C em um meio seletivo e enriquecido com sangue ou soro (VERSALOVIC *et al.*, 1999). As colônias têm aspecto característico, devido ao pequeno tamanho e o aspecto brilhante. O crescimento em meio líquido é favorecido pela agitação (BODE *et al.*, 1993). A cultura bem sucedida requer uma atmosfera de microaerofilia, ou seja, 5% de oxigênio, 7% de dióxido de carbono e 8% de hidrogênio com 80% de nitrogênio, em ambiente úmido (ALBERTSON *et al.*, 1998). Estes parâmetros de cultura são alguns dos fatores responsáveis pela dificuldade de cultivar e manter *H.pylori* obtida de focos ambientais ou diretamente dos espécimes clínicos. Além disso, diversos meios de crescimento complexo não conseguem simular as circunstâncias encontradas pela *H. pylori in vivo*. Ainda não está claro como as linhagens do microorganismo obtêm aminoácidos essenciais, tais como arginina, leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, metionina, serina e histidina (TESTERMAN *et al.*, 2001).

O gênero *Helicobacter* é formado por 47 espécies diferentes, as quais são prevalentes nos mais diversos reservatórios naturais, como mamíferos e aves (DEWHIRST *et al.*, 2000). Pelo menos 20 espécies, são patogênicas e dentre elas, podemos destacar a *Helicobacter acinonychis*, isolada por Eaton e colaboradores (1993) na mucosa gástrica de leopardos portadores de úlcera. Outras espécies são capazes de colonizar tecido hepático e biliar, sendo associadas ao desenvolvimento de hepatocarcinoma nos seres humanos e animais, como *Helicobacter bilis* (FOX *et al.*, 1995), *Helicobacter cholecystus* (FRANKILIN *et al.*, 1996), *Helicobacter hepaticus* (FOX *et al.*, 1994) e *Helicobacter marmotae* (FOX *et al.*, 2002). No homem, espécies como *Helicobacter cinaedi* (TOTTEN *et al.*, 1985), *Helicobacter heilmannii* (MCNULTY *et al.*, 1989) e *Helicobacter winghamensis* (MELITO *et al.*, 2001) também são capazes de colonizar a mucosa gástrica, causando patologias como gastrite e úlcera.

1.2 Patogenicidade

A infecção *H. pylori* no homem remonta os últimos 50.000 anos e provavelmente coevoluiu com o seu hospedeiro (BLASER & ATHERTON, 2004).

A contaminação frequentemente ocorre na infância e persiste por toda a vida. A infecção é associada a patologias principalmente durante a vida adulta. Entretanto, apesar do fato de que a metade da população está infectada pela *H. pylori*, apenas uma pequena fração desenvolve algum tipo de afecção gástrica (BANATVALA, *et al.*, 1993).

Em razão da prevalência geralmente assintomática, a infecção pode persistir por décadas sem tratamento (GOODWIN *et al.*, 1990). Entretanto, em diversos estudos têm sido associada a presença de *H. pylori* à patologias gastrointestinais, principalmente gastrites e úlceras pépticas (WU *et al.*, 2005). Segundo esses estudos, a patogenicidade se deve a diversos fatores, dentre eles fatores referentes ao hospedeiro, tais como o estado nutricional, a variabilidade das citocinas produzidas, o hábito fumante e o consumo de bebidas alcoólicas.

Variações relativas ao genoma do hospedeiro também podem influir na morbidade da infecção. Por exemplo, o polimorfismo para o gene da Interleucina-8 pode afetar a produção da IL-8 e interferir na resposta imunológica contra a *H. pylori* (TAGUCHI *et al.*, 2005). Alelos descritos no hospedeiro são associados a uma maior

expressão da citocina IL-8 o que resulta em maior infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica e como conseqüência o aumento do risco de gastrite e tumor gástrico (principalmente, do tipo difuso). Além disso, tem sido ressaltado que a presença de cepas mais virulentas associadas ao polimorfismo do hospedeiro, para IL-8 e outras citocinas, induzem uma resposta inflamatória mais severa, maior lesão da mucosa gástrica e assim aumento do risco de desenvolvimento de patologias gástricas severas (PEREZ *et al.*, 2005; TAGUCHI *et al.*, 2005).

A maior morbidade causada pela *H. pylori* também é atribuída à sua capacidade de colonizar o epitélio gástrico, sobreviver nesse ambiente hostil e multiplicar-se suficientemente para poder ser transmitido a outro hospedeiro (ANDERI *et al.*, 2002).

A *H. pylori* penetra na protegida mucosa gástrica unindo-se ao epitélio gástrico e causando alterações gástricas em indivíduos suscetíveis. No entanto, nem todos os indivíduos são igualmente suscetíveis (VINAL *et al.*, 2002). Existem muitos fatores de virulência do *H. pylori* que contribuem para disseminar vias para agressão da mucosa gástrica. São vários os fatores conhecidos para a colonização e a sobrevivência da *H. pylori* no estômago humano. Dentre eles, a urease e a ação dos flagelos, os quais estão presentes em todas as espécies de *H. pylori* (AGUILAR *et al.*, 2001). A ação da urease de *H. pylori* possibilita a transformação da uréia em dióxido de carbono e amônia, neutralizando o ácido durante a colonização da mucosa (TRABULSI, 2002). Além da proteção à *H. pylori* exercida por esta enzima, também há a indução da apoptose de células gástricas *in vitro* e a inibição da somatostatina gástrica, liberada em animais, o que poderia ter conseqüências amplas na fisiologia digestiva (MAGALHÃES, 2000).

O flagelo possibilita à bactéria deslocar-se através da mucosa gástrica e alcançar níveis de pH ligeiramente mais neutros, abaixo da mucosa. Os genes descritos como envolvidos na formação dos flagelos são os genes *flaA* e *flaB* (OTTEMANN *et al.*, 2002). Além disso, essas estruturas também permitem à bactéria “escapar” das contrações que regulam o estômago vazio (AGUILAR *et al.*, 2001). Há diversos relatos referentes às diversas adesinas que medeiam a agressão de *H. pylori* às células epiteliais. Isso sugere que a bactéria poderia usar diversos mecanismos de aderência para estabilizar o contato com a superfície das células do

hospedeiro. Apesar da importância das adesinas na colonização e virulência, elas não têm sido apontadas como essenciais para a sobrevivência *in vivo* da *H. pylori* (ILVER *et al.*, 1998).

Proteases chamadas de mucinases também são produzidas pela bactéria e possuem atividade hidrolítica sobre o muco, permitindo a degradação da mucosa pelo ácido pepsínico, o que segundo alguns autores, facilitaria a sua infiltração em direção ao epitélio e favoreceria o aparecimento de patologias (VINALL *et al.*, 2002). As enzimas catalase e a superóxido dismutase (SOD) extracelular são produzidas em apreciável quantidade e têm sido consideradas fatores de resistência da bactéria aos mecanismos líticos oxidativos dos fagócitos polimorfonucleares, causando morte destes e lesão epitelial aguda, sendo importantes para a sobrevivência da bactéria na mucosa inflamada (SUAREZ *et al.*, 2006). Lipopolissacarídeos (LPS) de *H. pylori* têm sido implicados em outros aspectos da patogenicidade da infecção por *H. pylori*. A endotoxina LPS é um potente ativador da via clássica do complemento e pode estar associado com a ativação deste e, portanto com o surgimento de patologias diversas na mucosa (SLOMIANY & SLOMIANY, 2007).

A estrutura da cadeia O-específica do LPS em diferentes tipos de *H. pylori* pode mimetizar antígenos da estrutura do grupo sanguíneo Lewis, os quais estão presentes na mucosa gástrica normal humana e a expressão de desses antígenos de Lewis na superfície da bactéria pode “camuflar” a bactéria e contribuir para sua sobrevivência do estômago (AGUIAR *et al.*, 2002).

H. pylori também interfere na secreção gástrica e tem sido relacionada com situações de hipocloridria e hipergastrinemia. Sugere-se que essas alterações decorram a inflamação provocada pela infecção pelo microorganismo, com conseqüente redução da densidade de células parietais. Existe também a possibilidade de, em razão de alterações na barreira muco-bicarbonato, com aumento de sua permeabilidade, ocorrer maior retrodifusão de H⁺, diminuindo assim a concentração do ácido no lúmen do estômago (GUANG *et al.*, 2010).

Além disso, a infecção por mais de uma cepa de *H. pylori*, apesar de incomum, tem sido relatada algumas vezes na literatura e aparentemente, a presença de múltiplas cepas em um único paciente potencializa a ação patogênica do microorganismo (SAMARAS *et al.*, 2010). A diversidade genotípica das cepas,

também representa um papel importante no desenvolvimento de patologias gástricas, uma vez que a presença de alguns alelos no genoma do microorganismo podem implicar em uma maior produção de algumas citotoxinas (GHOSE *et al.*, 2005).

Durante a infecção, a bactéria incorpora-se ao lúmen gástrico, a urease permite a sobrevivência no ambiente ácido produzindo as moléculas de amônia que protegem o pH citosólico e periplásmico, assim como camada superficial em torno da bactéria. Os flagelos propulsionam a bactéria na camada do muco e permitem que alcance o domínio apical das células epiteliais gástricas, fixando-se através de adesinas especializadas. A *H. pylori*, inocula a proteína do *cagA* nas células da mucosa através de um sistema de secreção tipo IV, os quais liberam fatores tóxicos tais como a proteína de ativação de neutrófilos (HP-NAP) e o *vacA*, indutora de grandes vacúolos. Os vacúolos são evidentes nas células epiteliais do estômago em biópsias humanas e de rato. A proteína HP-NAP cruza a camada epitelial e recruta neutrófilos e monócitos, quais extravasam e causam dano tecidual liberando intermediários reativos do oxigênio (ROIs). As proteínas injetadas de *cagA* causam alteração do citosqueleto, formação de pedestal e sinalização nuclear para a liberação de linfocinas próinflamatórias, que amplificam a reação inflamatória com recrutamento dos linfócitos e induzem maior liberação de ROIs. A atividade tóxica combinada de *vacA* e de ROIs conduz a dano de tecido que é realçado pela diminuição da camada protetora de muco. (MONTECUCCO & RAPPUOLI, 2001).

Um sumário da ação da *H. pylori* em mucosa humana é apresentado na figura 1.

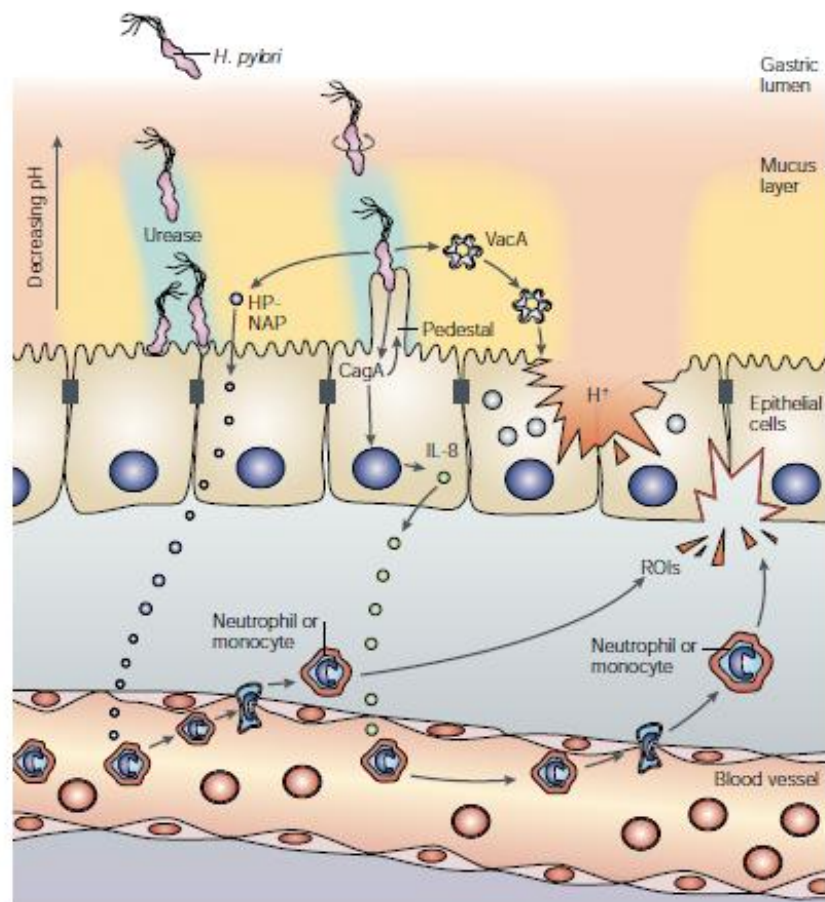


Figura 1: Representação esquemática da mucosa gástrica colonizada pela *Helicobacter pylori*, mostrando alguns dos fatores de virulência envolvidos na colonização e doença. (MONTECUCCO & RAPPUOLI, 2001).

1.3 Patologias gástricas comumente associadas à infecção por *H. pylori*

1.3.a Gastrite

As gastrites representam um grupo heterogêneo de alterações macro e microscópicas da mucosa gástrica, decorrentes de injúria de variada origem, usualmente associada a uma reposta inflamatória aguda, crônica ou mista. Podem acometer a mucosa do antro ou do corpo gástrico (DANI & CASTRO, 1993).

As gastrites agudas são causadas por uma agressão violenta da mucosa gástrica, principalmente devido a ingestão de álcool, toxinas bacterianas e medicamentos. Geralmente todo o estômago é atingido na gastrite aguda. Entretanto, a gastrite aguda associada à *H.pylori* é um quadro que tem sido raramente descrito (SOYLU *et al.*, 2008).

Gastrite crônica inespecífica, durante muito tempo, foi reconhecida como uma entidade de etiologia desconhecida, sem quadro clínico definido, sem terapia específica, de alta prevalência na população e tida como lesão histológica própria do envelhecimento. Seu diagnóstico é essencialmente histológico e é nos dias de hoje, associada, na maioria das vezes, à infecção pela *H.pylori* (LI *et al.*, 2010).

1.3.b Pangastrite

A pangastrite é caracterizada pelas mesmas alterações descritas para a gastrite, porém, desta vez, a lesão se expande por todo o estômago antro, corpo e algumas vezes, fundo gástrico (DANI & CASTRO, 1993).

1.3.c Úlceras gástricas

São lesões na mucosa gástrica caracterizadas pela perda da continuidade mucosa (DANI & CASTRO, 1993). A causa das úlceras constitui uma incógnita e acredita-se que seja resultado da ruptura do equilíbrio existente entre mecanismos protetores da mucosa gástrica, como a barreira mucosa e agentes de agressão. Muitos são os fatores de agressão da mucosa gástrica, dentre eles podemos citar: tabaco, álcool, cafeína e medicamentos, ácido acetil-salicílico e corticosteróides. Diversos estudos indicam uma alta prevalência da *H.pylori* em portadores de úlceras gástricas (MABE *et al.*, 2009).

1.3.d Esofagite

É uma inflamação crônica da mucosa esofágica e quase sempre é uma complicação da doença do refluxo gastroesofágico (DANI & CASTRO, 1993). Na doença do refluxo gastroesofágico os mecanismos de contenção do conteúdo gástrico são insuficientes, permitindo que este reflua em direção ao esôfago em condições não fisiológicas (GEBOES, *et al.*, 2001). O contato do suco gástrico com a mucosa esofágica leva a uma inflamação crônica e progressiva (JUNG *et al.*, 2010). Neste caso, a *H.pylori* é citada por muitos autores como protetora da mucosa esofágica por sua capacidade de reduzir a secreção gástrica de HCl (GRANDE *et al.*, 2008).

1.3.e Bulbite e Metaplasia

A bulbite é definida como uma inflamação do bulbo duodenal causada pelo contato frequente com a secreção ácida do estômago. Pode ser classificada em aguda ou crônica semelhante às gastrites (DANI & CASTRO, 1993).

A mucosa duodenal quando submetida a contatos frequentes e prolongados com a secreção hiperácida do estômago desenvolve mecanismos adaptativos de

defesa, tais como a transformação de células epiteliais de sua superfície em outro tipo de células adultas, mais resistentes, e a hiperplasia das glândulas duodenais. O aparecimento de epitélio ou glândulas mucosas simples do tipo pilórico no revestimento mucoso do duodeno constitui o que se chama de metaplasia gástrica no bulbo duodenal (TEPES, 2009).

As respostas adaptativas da mucosa duodenal a uma situação de hiperacidez são traduzidas por graus variáveis de inflamação histológica e pela metaplasia gástrica no bulbo duodenal. A maior parte dos autores admite que a presença da *H.pylori* em mucosa gástrica metaplásica no duodeno, favorecida pela inflamação por ela causada, resulta na ação ulcerogênica do HCl e da pepsina. A *H. pylori* poderia diminuir a resistência da mucosa gástrica metaplásica, facilitando a penetração e a ação do suco gástrico, favorecendo a formação da úlcera péptica duodenal (LI *et al.*, 2010)..

1.3.f Pólipos

Pólipo é qualquer lesão elevada, circunscrita, pedunculada ou não, da mucosa, sem especificação da estrutura, que pode ser epitelial ou não, ou de natureza benigna ou maligna. Quando eles atingem tamanhos superiores a 2cm, estão sujeitos a degeneração maligna (DANI & CASTRO, 1993). A *H.pylori* é considerada um agente carcinógeno do tipo I, contudo a associação entre a bactéria e a formação de pólipos, que é considerada uma lesão pré-neoplásica, não foi estabelecida (HAJI *et al.*, 2008).

1.4 Genoma

A *H. pylori* contém um genoma constituído de aproximadamente 1.600.000 pares de bases que codificam aproximadamente 1.500 genes, entre proteínas estruturais e toxinas (TOMB *et al.*, 1997). Dentre as substâncias sintetizadas, a urease, é considerada a principal responsável pela colonização e a sobrevivência da bactéria no ambiente ácido. Urease é uma enzima dependente de níquel capaz de catalisar a hidrólise de uréia em amônia, elevando assim o pH do meio gástrico (OLIVERA-SEVERO, 2006) (Figura 2).

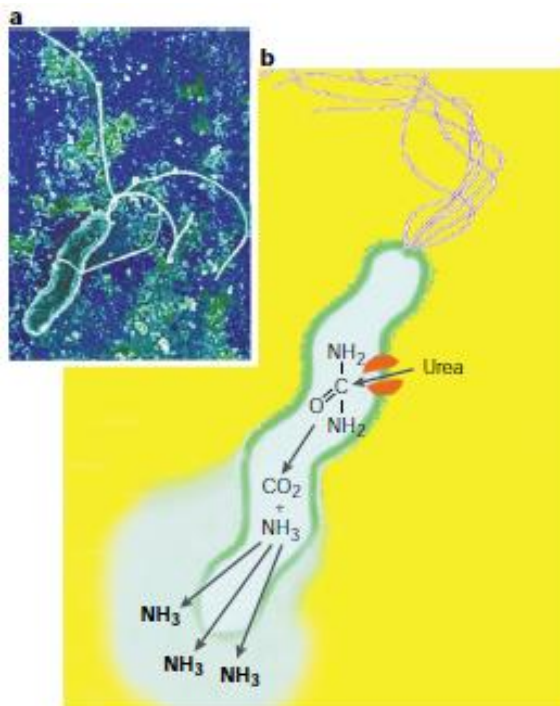


Figura 2: *Helicobacter pylori*. (a) Imagem de microscopia eletrônica. (b) Representação esquemática mostrando a forma, os flagelos polares a produção de amônia a partir da Uréia, com a função de neutralizar o pH ácido do ambiente gástrico (MONTECUCCO & RAPPUOLI, 2001).

A síntese da citotoxina vacuolizante (*vacA*) e a síntese da citotoxina associada ao alelo A (*cagA*) são considerados por muitos autores, os fatores principais para a determinação da patogenicidade de *H.pylori* sobre o epitélio gástrico (COVER e BLASER, 1992; ATHERTON *et al.*, 1995).

A aderência da bactéria ao epitélio gástrico está associada à adesina *blood-group antigen-binding adhesin A* (*BabA*). Sua aderência é precedida pela ligação dos antígenos Lewis b e H-1, presentes na mucosa gástrica (ILVER *et al.*, 1998). Não somente a proteína *BabA* está correlacionada com a adesão no epitélio gástrico como também a *sialic acid-binding adhesin A* (*SabA*), a qual liga-se em resíduos de ácido siálico expressos no epitélio gástrico em lesões similares (UNEMO *et al.*, 2005).

Os alelos descritos recentemente como *duodenal ulcer promoting gene A* (*dupA*) levam a expressão de proteínas de superfície, que segundo estudos realizados por Lu *et al.* (2005), estão associadas com a manifestação da úlcera

duodenal em adultos, contudo, esses dados não foram confirmados em crianças e adultos da população brasileira, indicando possíveis variações geográficas.

Algumas cepas de *H.pylori* podem ser portadoras da ilha de patogenicidade (PAI) (ATHERTON *et al.*, 1995). As ilhas de patogenicidade foram descritas em muitos outros patógenos, como *Yersinia spp* (CARNIEL *et al.*, 1996), *E. coli* (BLUM *et al.*, 1994), *Salmonella spp* (HOCHHUT *et al.*, 1997), entre outros. Quando presentes, as ilhas são associadas a uma maior virulência bacteriana e nos microorganismos citados agem na captação de íons ferro do ambiente e possui papel no metabolismo celular. Além disso essas ilhas são móveis e mostram-se importantes para a evolução bacteriana através da transferência horizontal de genes (HACKER *et al.*, 2001).

Além dos alelos citados, muitos outros são relatados como associados à patogenicidade de *H.pylori*, dentre eles destacamos:

1.4.a) Gene *cagE*: O predomínio de neutrófilos na mucosa gástrica, observado em pacientes infectados por cepas *cag*-PAI⁺, é ligado ao aumento de secreção de interleucina-8 (IL-8) secretada pelas células epiteliais da mucosa gástrica (QUEIROZ *et al.*, 1998). Entretanto cepas *cagA* negativas também induzem aumento da secreção de IL-8. Isto se deve ao fato de que a proteína *cagA* não atua diretamente sobre a IL-8. O gene ligado ao aumento da produção de IL-8 é o *cagE*, que é um dos genes da ilha *cag* (NAITO & YOSHIKAWA, *et al.*, 2002).

1.4.b) Gene *iceA*: Outro gene de *H. pylori* foi descrito e denominado *induced by contact with epithelium (iceA)*. Existem dois alelos deste gene: *iceA1* e *iceA2*. A função de *iceA1* não está clara, mas este alelo apresenta homologia com a endonuclease de restrição do tipo II da *Neisseria lactamica*. Sua expressão é regulada pelo contato do *H. pylori* com as células epiteliais da mucosa gástrica. A expressão deste alelo é associada à úlcera péptica e ao câncer gástrico. A função do alelo *iceA2* também é desconhecida (PEEK *et al.*, 1999).

1.4.c) Gene *HP-NAP*: A gastrite induzida pelo *H. pylori* é caracterizada por infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos. A intensidade da inflamação correlaciona-se com a severidade dos danos induzidos à

mucosa e ao DNA. Evans *et al.* (1995) descreveram o gene *neutrophils-activating protein (HP-NAP)* de *H. pylori* e relacionaram sua expressão ao potencial de indução de inflamação, mesmo em cepas *cagA* negativas. O produto do gene *HP-NAP* induz aderência de neutrófilos às células endoteliais, o qual estimula a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos neutrófilos (CECI *et al.*, 2006).

1.5 Toxinas e haplótipos

A citotoxina vacuolizante, induz a formação de vacúolos nas células epiteliais hospedeiras e a sua presença está associada à capacidade de produzir lesão tissular e úlcera (LOPES *et al.*, 2005). O loco *vacA* contém duas regiões variáveis: a região *s* (haplótipos *s1* e *s2*) e a região *m* (haplótipos *m1* e *m2*) (ver Figura 3).

As linhagens portadoras da combinação *s1-m1* são consideradas as mais agressivas, devido sua correlação positiva entre a prevalência de pacientes portadores dessas linhagens com a maior frequência de úlcera péptica (WU, 2005). Assim, diversas famílias de alelos diferentes do loco *vacA* estão presentes em *H.pylori* e seus produtos estão associados com ou sem atividade de vacualização *in vitro* (COVER *et al.*, 1994). Alelos *vacA* têm sido associados com aumento de úlceras pépticas. Além disso, as regiões *s* e *m* do loco têm diferentes relevâncias clínicas associadas: o haplótipo *s1/m1* é associado com a maior lesão do epitélio gástrico e a úlcera duodenal. (YAMAOKA *et al.*, 2002). As linhagens *s1+/m1+* estão presentes em maior prevalência no Japão e no norte da China, o que talvez justifique os altos índices de câncer gástrico nessas regiões. (ATHERTON & BLASER, 2009).

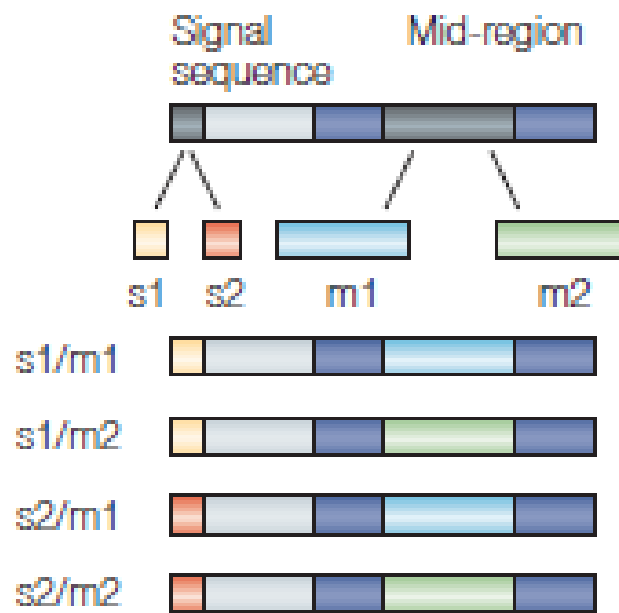


Figura 3: Diversidade alélica do gene *vacA*. Há um nível elevado de diversidade no loco *vacA* de *Helicobacter pylori*. A diversidade ocorre próxima à região 5' do *vacA* (a região s) e na região média do gene (a região m). Duas famílias principais de seqüências da região s (s1 e s2) e duas famílias principais de seqüências da região m (m1 e m2) foram descritas. As combinações entre as seqüências variantes s1/s2 e m1/m2, implicam em uma maior ou menor síntese da toxina *vacA* e conseqüentemente, maior patogenia. As linhagens descritas como portadoras da combinação s1+/m1+, são descritas como as mais patogênicas, enquanto as linhagens portadoras da combinação s2+/m2+ são descritas como as menos patogênicas. Linhagens portadoras das combinações s1+/m2+ ou s2+/m1+, possuem patogenicidade intermediária (BLANKE & COVER, 2005).

O gene *cagA* está posicionado em um dos extremos da ilha de patogenicidade (PAI), a qual contém aproximadamente 20 genes, incluindo o *picB*, que induz a produção de interleucina-8 pelas células do epitélio gástrico (ATHERTON *et al.*, 1995). É considerado um marcador de patogenicidade, uma vez que está presente em portadores de patologias gástricas severas, tais como úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico (WU, 2006).

A proteína *cagA*, produto do gene *cagA*, foi identificada como um antígeno imunodominante de função desconhecida. Demonstrou-se que variantes alélicas no gene *cagA* podem resultar em diferenças na estrutura da região C-terminal do

peptídeo e isso pode estar relacionado com níveis variáveis de injúrias no hospedeiro e de suscetibilidade bacteriana a acidez (SELBACH *et al.*, 2002). O sistema de secreção do loco *cag*-PAI tem sido associado ao transporte do peptídeo *cagA* para o interior das células epiteliais, onde é fosforilado a um resíduo de tirosina. A fosforilação da tirosina do *cagA* está associada com o rearranjo do citoesqueleto (MONTECUCCO & RAPPUOLI, 2001). Outros relatos têm demonstrado que *cagA* é processado em dois fragmentos na célula do hospedeiro, cujas funções não estão esclarecidas (HIRATA *et al.*, 2002).

Estudos sistemáticos de mutagenicidade, os quais codificam *cagA*, demonstraram que existem 17 entre 27 alelos essenciais para a inserção do produto gênico *cagA* nas células hospedeiras e 14 são necessários para que a *H.pylori* induza a transcrição de IL-8. Esta propriedade contribui com o poder pró-inflamatório da linhagem e também induz a capacidade virulenta do microorganismo (FISHER *et al.*, 2001). Não obstante, a indução de IL-8 não está ligada exclusivamente ao *cag*-PAI. Por outro lado, a exposição de células epiteliais gástricas à *H. pylori cag*-PAI-positivas podem ativar os proto-oncogenes *c-fos* e *c-jun*, os quais constituem uma etapa crucial no desenvolvimento da neoplasia relacionada à *H.pylori* (MEYER-TERVEHN *et al.*, 2000).

Kauser *et al.*, (2004) realizaram um estudo de âmbito mundial para avaliar a integridade do *cag*-PAI e associá-la à capacidade pró-inflamatória da *H.pylori*. Esses autores demonstraram que as linhagens japonesas apresentaram maior integridade do *cag*-PAI. Este estudo é corroborado por outros estudos, os quais verificaram uma elevada ocorrência de câncer gástrico e úlceras gástricas severas, nesta parte do mundo (MACHIDA *et al.*, 2004; MIWA *et al.*, 2002).

1.6 Epidemiologia

1.6.a Fatores de risco intrínsecos

a.1 Idade

Observa-se que na infância, ocorre rápido aumento da taxa de prevalência da infecção, particularmente nos cinco primeiros anos de vida. A partir dos 15 anos de idade, o aumento da prevalência passa a ser lento e constante. Em indivíduos com idade superior a 60 anos, a curva de prevalência estabiliza-se, ou há um discreto

declínio. O declínio na curva de prevalência da *H.pylori* em idosos pode ser explicado pela atrofia da mucosa gástrica, a qual reduz a viabilidade de *H.pylori* no estômago (ROOSENDAAL *et al.*, 1997; ZATERKA *et al.*, 2007).

a.2 Sexo

A infecção por *H.pylori* é similar em ambos os sexos (ZATERKA *et al.*, 2007).

a.3 Etnia

Estudos epidemiológicos indicam que a prevalência da infecção por *H.pylori* é maior nos indivíduos não caucasianos independentemente do nível socioeconômico atual. Todavia, esse fato pode, apenas em parte, ser considerado, uma vez que a prevalência da infecção por *H.pylori* é determinada principalmente pelas condições socioeconômicas durante a infância. Portanto, em grupos populacionais distintos, com mesmo padrão socioeconômico, podem apresentar diferenças na prevalência da *H.pylori* em virtude da ascensão social dos indivíduos não caucasianos ter-se dado apenas nos últimos anos (GRAHAM *et al.*, 1994; SATHAR *et al.*, 1994).

1.6.b Fatores de risco extrínsecos

A renda familiar é um indicador da condição socioeconômica. Graham *et al.* (1994) e Fiedorek *et al.* (1991) nos EUA, demonstraram que a infecção por *H.pylori* apresenta relação inversa à renda familiar.

O grau de escolaridade foi considerado como outro indicador de classe socioeconômica na maioria dos estudos epidemiológicos da *H.pylori*, sendo que a taxa de prevalência da infecção é mais elevada entre os indivíduos que cursaram até o ensino fundamental e menores entre aqueles com curso universitário (KODAIRA *et al.*, 2002).

Vários estudos mostram que a higiene precária e as más condições de moradia, em especial, a ausência de saneamento básico e de fornecimento de água tratada, estão associadas à maior taxa de aquisição de *H.pylori*.

Recentemente, um estudo realizado por Vergueiro *et al.*, (2008) entre doadores de medula óssea no estado de São Paulo, indicou que 68% dos doadores identificados como positivos para *H.pylori* não dispunham de água tratada e cerca de 60% não dispunham de tratamento de esgoto. O mesmo estudo reiterou outros resultados obtidos por estudos anteriores, como a distribuição da infecção entre os sexos, etnias e escolaridade.

Um levantamento feito por Kodaira em 2002, indicou que os relatos de surtos de infecção pela *H.pylori* observados em famílias, causados por cepas geneticamente idênticas, confirmam o alto risco de infecção entre pessoas agrupadas. O mesmo levantamento sugere ainda que o número de habitantes na moradia, particularmente na infância, é importante fator de infecção e que familiares diretos de pacientes infectados pela *H.pylori* apresentam frequência significativamente maior na positividade do agente. Esses resultados, não foram confirmados por Vergueiro *et al*, em 2008.

1.6.c Distribuição geográfica da infecção por *H.pylori* no Brasil

Estudos realizados no Brasil procuram caracterizar a distribuição da infecção no país. No início de 2010, Assumpção e colaboradores detectaram uma prevalência da infecção de 96% entre os moradores da cidade de Belém do Pará (região Norte) atendidos pelo setor de endoscopia de um hospital público. Resultado similar foi obtido na cidade de Botucatu (estado de São Paulo), onde a prevalência da infecção foi de 90% (KAGUE *et al.*, 2010). Um levantamento realizado por Santos e colaboradores em Pelotas, Rio Grande do Sul, detectou uma prevalência da infecção por *H.pylori* de 70%. Já na cidade de Salvador, Bahia, Lyra e colaboradores verificaram uma prevalência de 68% no ano de 2007, entretanto, os resultados foram obtidos através de testes sorológicos de doadores de sangue, o que difere dos estudos realizados nas cidades anteriormente citadas, onde as amostras de biópsias gástricas obtidas foram de pacientes submetidos à endoscopia, ou seja, pacientes com sintomatologia de afecções gástricas. Em 2003, Cunha e colaboradores evidenciaram que 79% dos moradores de três comunidades indígenas da região oeste da Amazônia, estavam infectados pela *H.pylori*.

Os estudos relacionados à epidemiologia da infecção por *H.pylori* no Brasil, são deficientes, já que se concentram nas cidades mencionadas. No restante do país, não existem dados na literatura relacionados à prevalência da infecção.

1.7 Distribuição da infecção.

1.7.a Cavidade Oral

O primeiro relato de *H.pylori* na cavidade oral foi proposto por Kradjen em 1989, em um estudo onde foram obtidas amostras de placa dental e em seguida

submetidas a cultura em meio seletivo para a bactéria. Desde então, diversos outros estudos têm sido realizados com o objetivo de comparar as cepas presentes na cavidade oral com aquelas colonizadoras da mucosa gástrica, o que poderia indicar que a cavidade oral constitui um importante reservatório para a bactéria. Além de esclarecer uma possível rota de transmissão (ASQAH *et al.*, 2009; LOSTER *et al.*, 2006; CZESNIKIEWICZ-GUZIK *et al.*, 2003).

1.7.b Vesícula Biliar

Exemplares do gênero *Helicobacter* têm sido identificados na bile e associados à mucosa da vesícula biliar de pacientes com doenças biliares benignas e litíase biliar (PANDEY, 2007). Silva *et al.*, (2003) sugeriram que *Helicobacter ssp* presente na árvore biliar representa um importante elemento na patogênese de doenças biliares, uma vez que o microorganismo está presente na vesícula biliar de portadores de colelitíase e colecistite. O mesmo estudo apresenta uma associação significativa entre a *Helicobacter* e a inflamação da mucosa, bem como a proliferação do epitélio com posterior predisposição a carcinogênese (QUEIROZ *et al.*, 2002).

A infecção persistente causada pela *H.pylori*, classifica o patógeno como um carcinógeno em potencial. Em humanos e animais, tem sido relatada, a presença de *Helicobacter ssp* capazes de colonizar o fígado e induzir o surgimento de doenças hepáticas crônicas, tais como a cirrose e especialmente o carcinoma hepatocelular. (HUANG *et al.*, 2004).

1.8 PCR Quantitativo

A utilização de PCR para a detecção da *H.pylori* constitui uma importante e sensível ferramenta diagnóstica, todavia falsos negativos podem ocorrer devido ao polimorfismo genômico do microorganismo. A aplicação do PCR quantitativo (tempo-real ou qPCR) tem sido descrito como método para a análise populacional deste e de outros patógenos (MOLNAR *et al.*, 2008) e em estudo realizado por Liu *et al.*(2010), mostrou que a concentração do vírus Norwalk é importante para o desenvolvimento de enterites. Já Nayak & Rose (2007), mostraram que existe grande variação na densidade de populações de *H.pylori* em amostras de água coletada em diversas cidades dos Estados Unidos. Entretanto, os estudos relacionados à quantificação de *H.pylori* em tecido epitelial gástrico, ainda são

preliminares, sobretudo em relação à possibilidade de estabelecer relações quantitativas entre as afecções e a densidade de microorganismos existentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

O presente estudo objetiva a caracterização molecular de cepas de *H. pylori* em biópsias de pacientes com enfermidades gástricas inespecíficas, atendidos no Setor de Endoscopia do Hospital das Clínicas Luzia Pinho de Melo, município de Mogi das Cruzes/SP. Verificar a existência de correlações entre os diversos parâmetros individuais dos pacientes, entre eles as patologias gástricas com a diversidade genética e a densidade bacteriana.

2.2 Específicos

- Verificar o nível de prevalência de *H. pylori* entre pacientes atendidos no Setor de Endoscopia do Hospital das Clínicas Luzia Pinho de Melo, município de Mogi das Cruzes/SP;
- Em biópsias *H.pylori* positivas, identificar e caracterizar as cepas de acordo com genótipos marcadores;
- Determinar a frequência do gene marcador *cagA* nas cepas da *H.pylori*;
- Verificar a prevalência e a frequência de cepas de acordo com regiões distintas do gene *vacA* (s1 e s2; m1 e m2);
- Análise de correlação das cepas com seu hospedeiro de acordo com os parâmetros populacionais (etnia, sexo, idade, origem sócio-econômico);
- Análise de correlação das cepas com seu hospedeiro de acordo com os parâmetros anátomo-patológicos;
- Estimar a densidade populacional de *H. pylori* no tecido epitelial gástrico;
- Quantificar a cepa m1 de *H. pylori* através de marcador específico no tecido epitelial gástrico;
- Correlacionar a densidade populacional da cepa m1 com parâmetros patológicos gastrointestinais (úlceras pépticas, gastrite, pangastrite e esofagite).

3. MÉTODO

3.1 Seleção de Participantes

Foram selecionados 114 pacientes atendidos no Setor de Endoscopia do Hospital das Clínicas Luzia de Pinho Melo do Município de Mogi das Cruzes/SP, no período de março de 2008 a dezembro de 2009, que anteriormente ao exame não fizeram uso de medicamentos anti-histamínicos H₂, bloqueadores da Na⁺/H⁺ ATPase, antiácidos de uso crônico, antiinflamatórios não esteroidais e antibioticoterapia.

Os participantes foram selecionados de modo a preencher diversos parâmetros socioeconômicos de maneira equitativa, sendo eles: Sexo, etnia, idade e classe social. A triagem dos grupos amostrais foi realizada de forma a conter uma representatividade dos parâmetros acima citados para a construção de grupos estatisticamente significativos.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (UMC/HCLPM) e registrado junto ao CONEP, sob nº. 0120.0.237.000-07 (Anexos de I a IV).

3.1.1 Parâmetros analisados

Participaram do estudo 114 voluntários, os quais foram identificados e classificados de acordo com os seguintes parâmetros:

- Gênero: Homens (N = 36); mulheres (N = 78);
- Faixa etária: Crianças e adolescentes (menores de 18 anos; N = 7); adultos (entre 18 e 59 anos; N = 81) e idosos (60 anos ou mais; N = 26);
- Patologias gástricas: úlcera (N = 10); gastrite (N = 50); pangastrite (N = 19); metaplasia (N = 1); esofagite (N = 25); pólipos (N = 21); bulbite (N = 15).

A soma dos valores correspondentes às diferentes afecções (N=141) descritas entre os pacientes é superior ao número total de pacientes portadores de alguma patologia (N=99). Isto se deve a frequente ocorrência de múltiplos distúrbios gástricos em um mesmo paciente.

3.2 Anamnese dos grupos amostrais

Para os grupos amostrais foi formulado um questionário específico contendo informações sobre: idade, sexo, etnia, classe social, uso de bebidas alcoólicas e tabaco, uso de medicamentos anti-inflamatórios e atuantes no trato gastrointestinal, uso prolongado de antibióticos, existência de histórico familiar com patologias gástricas e biliares (Anexo V).

Em indivíduos sintomáticos atendidos no setor de Endoscopia do Hospital das Clínicas Luzia de Pinho Melo, foi solicitado o laudo endoscópico emitido pelo médico responsável, (Dr. Rui Afonso Bassani) para a triagem das patologias gástricas evidenciadas no paciente e o prontuário clínico do paciente.

Para todos os casos, somente foram considerados participantes do presente estudo, aqueles que após a leitura do termo de compromisso livre e esclarecido (Anexo VI), aceitaram participar deste estudo.

3.3 Coleta de material biológico

As biópsias foram coletadas no Setor de Endoscopia do Hospital das Clínicas Luzia Pinho de Melo de Mogi das Cruzes, sob supervisão clínica do Dr. Rui Afonso Bassani, em seguida foram transportadas ao Laboratório de Genética Aplicada a Hospedeiros e Simbiontes do Núcleo de Ciências Ambientais (NCA) da Universidade de Mogi das Cruzes, onde foram submetidas à análise.

O material biológico coletado constou de procedimento encaminhado por solicitação clínica para diagnóstico de possível enfermidade do paciente.

Para o presente estudo não houve qualquer solicitação que não aquela oriunda da solicitação médica. Assim, o material biológico foi obtido como parte do procedimento normal do exame endoscópico. Foram coletados quatro fragmentos, dois do corpo gástrico e dois do antro pilórico. De acordo com a necessidade, parte do material coletado foi objeto de análise clínico-patológica do paciente. O restante do material foi acondicionado em microtubos de 0,5mL, previamente identificados,

contendo 400µL de álcool 70% e transportadas até o Laboratório de Genética Aplicada a Hospedeiros e Simbiontes, Núcleo de Ciências Ambientais (NCA) da Universidade de Mogi das Cruzes onde foram analisados. Todas as amostras coletadas foram conservadas em freezer -20°C até o momento de seu uso.

3.4 Correlação de prevalência de *H. pylori* com patologias gástricas

Dentre as patologias gástricas, selecionamos grupos amostrais específicos para portadores de: (1) úlcera péptica, (2) gastrite (3) bulbite, (4) carcinoma gástrico, (5) esofagite e (6) pólipo.

3.5 Extração de DNA

Foi utilizado o protocolo de extração descrito por Martins *et al.*, (2005) para obtenção do DNA total, através de biopsias conservadas: 10µL de proteinase K, 500µL de tampão de lise (200mM de Tris-HCL, 25mM de EDTA, 300mM de NaCl, 1.2% de sódio dodecil sulfato) e 30µl de SDS 10% foram adicionados à biópsia. A solução foi incubada em 65°C por 3h à 800rpm. A seguir, após a amostra ser esfriada em temperatura ambiente, adicionado 5µl de RNase e incubado por 1h à 37°C (800 rpm). O produto da lise foi submetido à extração com um volume igual de fenol-clorofórmio (400µL de fenol e 200µl de clorofórmio), precipitado com etanol 100% e 30µl de acetato de sódio 3M e armazenado *overnight*. Posteriormente o precipitado foi lavado com álcool 70%. O *pellet* foi drenado e colocado em suspensão em 50µL de TE (Tris BASE-EDTA) O DNA extraído foi estocado à -20°C.

3.6 Amplificação por PCR e detecção do produto de DNA amplificado

Um conjunto de *primers* (p1 e p2) (HAMMAR *et al.*, 1992) utilizado para amplificação de um fragmento de 298pb relativo ao gene da enzima Urease C (26kDa) citoplasmática presente em todas as cepas de *H.pylori* foi usado como controle para a detecção da bactéria em material de biópsia gástrica.

Dois genes frequentemente relacionados ao nível de patogenicidade da bactéria, *vacA* e *cagA*, foram examinados nas biópsias obtidas. Variantes, genótipos e subtipos distintos têm sido descritos para esses *loci*, os quais são relacionados às diferentes patologias associadas ao microorganismo. A amplificação de seqüências marcadoras para o gene *vacA*, regiões sinal (s1 e s2) e média (m1 e m2), foi realizada através de *primers* específicos descritos por Atherton *et al.*, (1995). Os *primers* F1 e F2 previamente descritos por Tummuru *et al.*, (1993) foram utilizados para a detecção do gene *cagA*. Todos os *primers* mencionados são apresentados na Tabela 1.

As soluções utilizadas nos ensaios de PCR foram preparadas em um volume de 25µL contendo 0,5nM de cada *primer* em tampão PCR; 1,5nM de MgCl₂; água estéril; 0,2nM de deoxinucleosídeo; 1,25µL de *Taq* e 1µL de amostra de DNA.

As condições para amplificação do PCR foram preparadas seguindo os seguintes parâmetros: desnaturação inicial à 95°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação à 95°C por 1 min, anelando e amplificando por 1 min, e a amplificação final à 72°C por 10 min. As temperaturas de anelamento para os *primers* VA3-F/VA3-R, VA4-F/VA4-R, F1/B1 foram de 58°C.

A visualização dos produtos de PCR foi feita em sistema eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio, e examinado sob luz UV.

Tabela 1: *Primers* utilizados para amplificação dos alelos do gene *vacA* e do gene *cagA* da *Helicobacter pylori*.

Região ampliada	<i>Primer</i>	Seqüência do <i>primer</i>	Tamanho do produto (pb)
Ag	P1	TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC	289
	P2	CCTGCTGGGCATACTTCACCATG	
m1	VA3-F	GGTCAAATGCGGTCATGG	199
	VA3-R	CCATTGGTACCTGTAGAAAC	
m2	VA4-F	CCATTGGTACCTGTAGAAAC	290
	VA4-R	GGAGCCCCAGGAAACATTG	
s1 e s2	VA1-F	ATGGAAATACAACAAACCACAC	259 e 281
	VA1-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	
cagA	F1	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG	349
	B1	CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA	

3.7 qPCR

A seqüência m1 do gene *vacA*, descrito por Atherton *et al.*, (1995), foi utilizada como marcador específico de cepa *H. pylori* durante o processo de amplificação em sistema qPCR (os *primers* para a amplificação da seqüência m1 estão descritos na tabela 1). O sistema qPCR, ABI 7500 (Applied biosystem®) foi realizado a partir de cada amostra, utilizando os protocolos de amplificação quantitativa SYBR green conforme descrição do fabricante (Invitrogen – Califórnia). O programa de amplificação e a detecção dos produtos de PCR foram efetuados através do programa convencional de amplificação do aparelho ABI 7500 (Applied biosystem®).

A verificação do produto amplificado foi realizada por dissociação das seqüências amplificadas, sendo consideradas sem contaminação aquelas que apresentaram temperatura de melting (TM) entre 79,4 °C a 80,4 °C para o *loci* m1.

3.7.1 Determinação da curva de diluição

Inicialmente, a concentração de DNA foi estimada em espectrofotômetro (Nanodrop) por absorbância na faixa de comprimento de onda de 260nm. Diluições seriadas (1:1 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) iniciadas a partir de 200ng de DNA inicial foram realizadas para do *loci* m1 da cepa de *H. pylori*, para determinação da integridade do material e a da concentração relativa de DNA por intermédio da análise do valor limiar do ciclo de amplificação (Cycle Threshold - CT) da amostra. A densidade bacteriana é inversamente proporcional ao número de CT obtido, de modo que cada ciclo correspondente ao dobro do valor do ciclo anterior.

3.8 Análises Estatísticas

Com o objetivo de prever a ocorrência de patologias gástricas em função de um conjunto de variáveis, dentre elas idade do paciente, gênero e a diversidade alélica da *H.pylori*, foi utilizada a análise de Regressão Logística Binária (RLB), tendo como variáveis dependentes cada uma das diferentes manifestações patológicas gástricas. As variáveis independentes foram selecionadas entre os parâmetros do hospedeiro, idade (variável não categórica) e o gênero, e a diversidade alélica do microorganismo (todas indicadas como variáveis categóricas).

Para as estimativas, utilizamos o *software* SPSS que fornece diversos relatórios a partir dos dados inseridos na planilha (idade, gênero e alelos da *H.pylori*) e adotamos os procedimentos propostos por Corrar e colaboradores (2009), para executar a regressão utilizando o *software* citado.

Por motivos de ordem operacional e principalmente para facilitar a interpretação dos resultados, é necessário obter valores que possam ser interpretados em termos de probabilidade e para isso utiliza-se a seguinte equação logística:

$$P(\text{evento}) = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1 + b_2 + \dots + b_x)}}$$

Onde:

P , é a probabilidade de um evento ocorrer;

e , é uma constante matemática gerada pelo *software* a partir dos dados inseridos;

$b_0, b_1, b_2 \dots b_x$, são os coeficientes estimados para as variáveis independentes.

4. RESULTADOS

4.1 Descrição do nível de prevalência de *H. pylori*.

Foram coletadas 114 amostras de biopsias gástricas de pacientes atendidos no setor de Endoscopia do Hospital Luzia Pinho de Melo. Destas amostras, 87 (76,3%) foram identificadas como biopsias positivas para o gene da urease C, o que identifica os pacientes portadores de *H. pylori* (Hp+) e 27 (23,7%) foram identificadas como negativas para o microorganismo (Hp-). Portanto, um elevado nível de prevalência da bactéria ocorre entre os pacientes atendidos naquele setor.

As sequências amplificadas, de acordo com os diferentes alelos examinados, são apresentadas na figura 4.

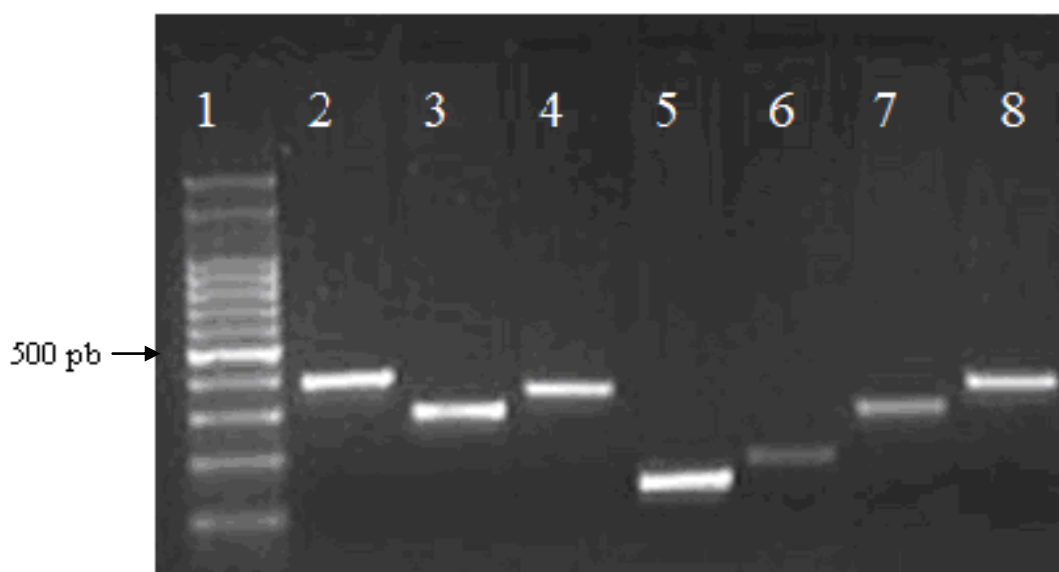


Figura 4: Gel de agarose (2%): padrão de bandas relativo a diferentes genes e *loci* em *Helicobacter pylori*. (1) Marcador 100pb; (2) Marcador humano: β -actina; (3) urease C; (4) *cagA*; (5) *vacA* - s1a; (6) *vacA* - s1b; (7) *vacA* - m1; (8) *vacA* - m2.

Em virtude do perfil dos indivíduos examinados no presente estudo, cuja maioria possui algum tipo de afecção gástrica, obtivemos um reduzido número de biopsias provenientes de pacientes, nos quais não foi diagnosticada qualquer

afecção (N=13). Todavia, mesmo assim, em cinco deles (38,5%) foi constatada a presença da *H. pylori*.

A frequência da infecção pela *H. pylori* entre os pacientes portadores de algum tipo de afecção gástrica foi superior a 70% (Figura 5). Entretanto, não foi verificada diferença significativa ($p = 0,65$) no nível prevalência do microorganismo, quando foram comparados os pacientes portadores de diferentes patologias gástricas.

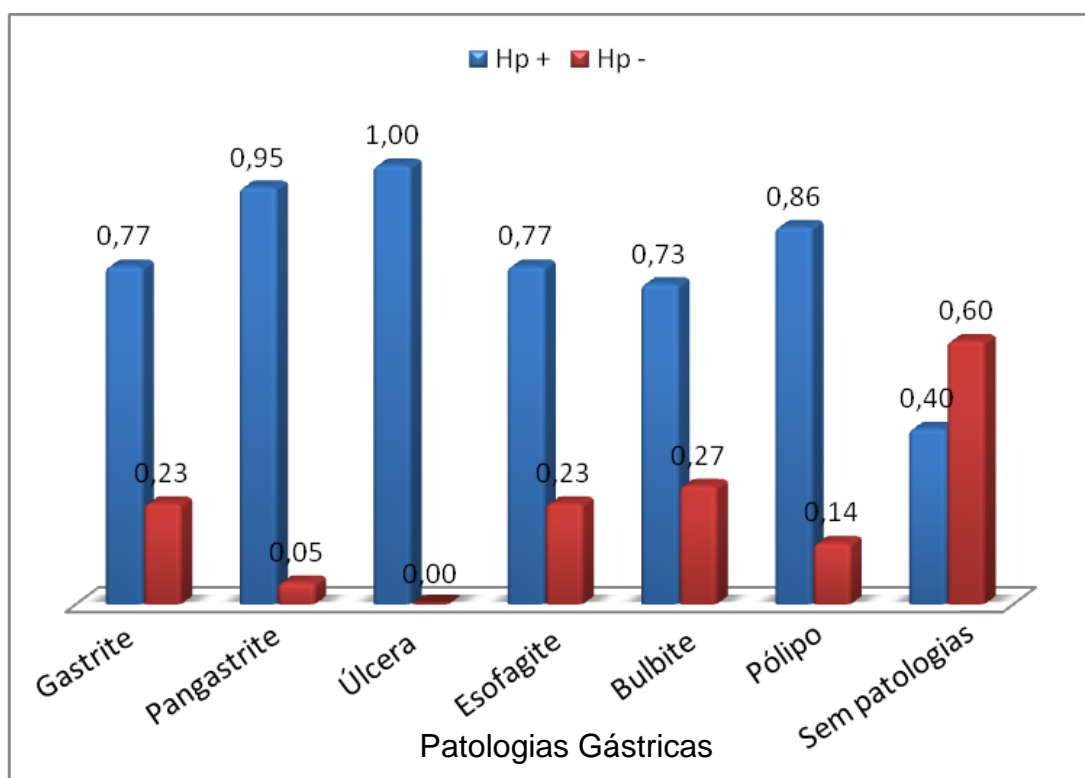


Figura 5: Nível de prevalência de *Helicobacter pylori* entre os pacientes atendidos no setor de Endoscopia do Hospital Luzia Pinho de Melo MC/SP, no período de março/2008 a dezembro/2009.

Em relação à faixa etária dos pacientes, a maior prevalência ocorreu em pacientes com idade entre 26 e 36 anos (0,90). A curva de distribuição da prevalência entre as faixas etárias consideradas indicou uma menor prevalência da infecção em pacientes com idade inferior a 18 anos. Há um significativo aumento do nível de infecção naqueles pacientes com idade superior a 18 anos. Entretanto, entre os pacientes com mais de 50 anos de idade, examinados neste estudo,

verificamos uma redução no nível de infecção, o que resultou em uma significativa diminuição da taxa de prevalência. Esses dados evidenciam que a infecção inicia-se de modo expressivo na infância, atinge o seu ápice no início da vida adulta e tende a regredir à medida que a idade progride; a cronicidade da infecção é ilustrada na figura 6.

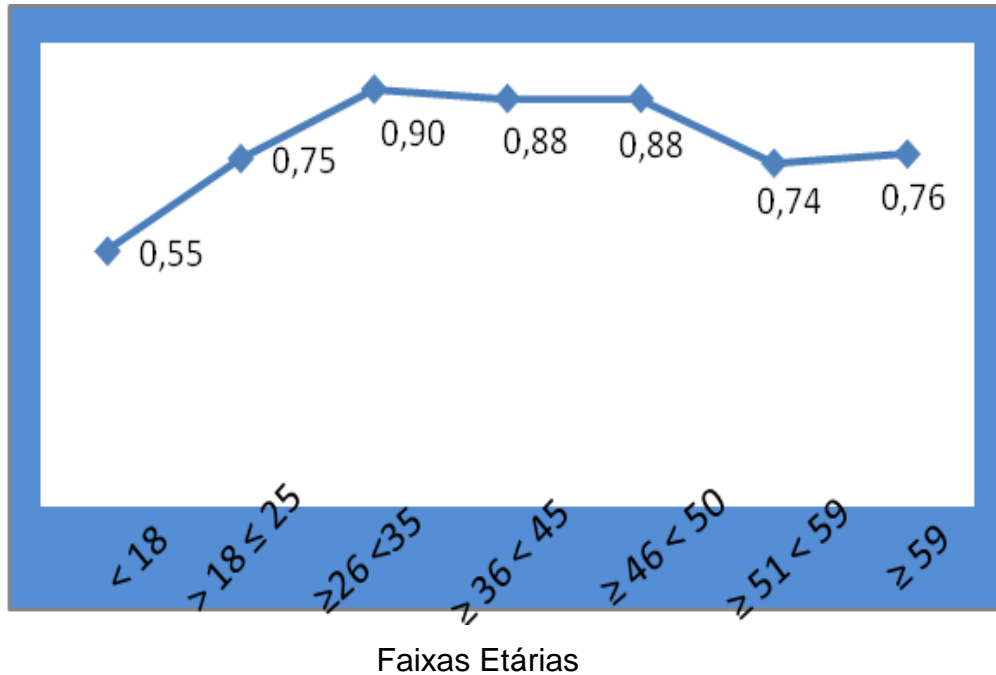


Figura 6: Frequência de distribuição de *Helicobacter pylori* de acordo com as idades dos pacientes atendidos no setor de Endoscopia do Hospital Luzia Pinho de Melo MC/SP.

A distribuição da prevalência entre os sexos foi examinada e não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,44$) (figura 7).

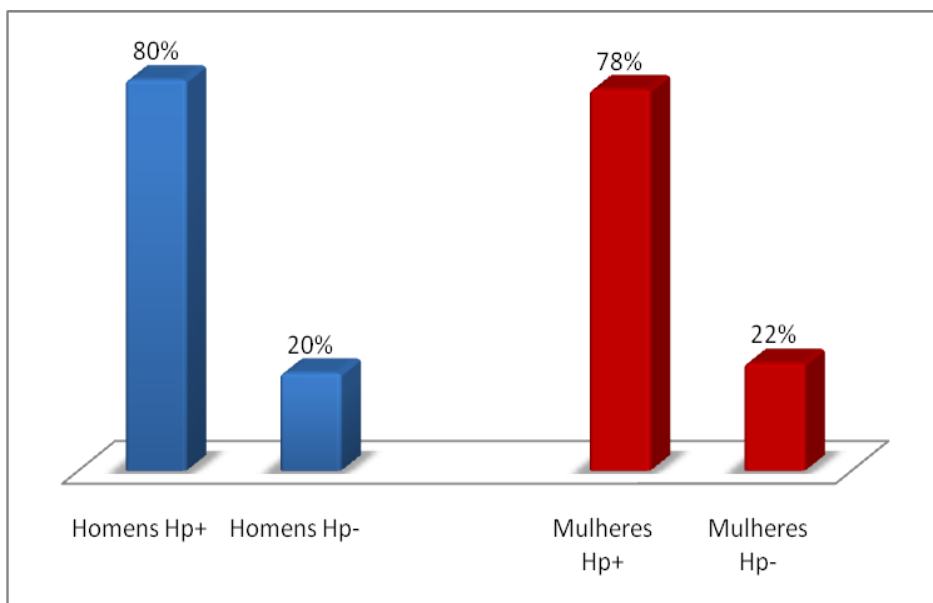


Figura 7: Frequência de distribuição de *Helicobacter pylori* de acordo com o sexo dos pacientes atendidos no setor de Endoscopia do Hospital Luzia Pinho de Melo MC/SP, no período de março/2008 a dezembro/2009.

4.2 Identificação e caracterização das cepas de *H. pylori*.

A seguir são apresentados os padrões de amplificação dos diferentes *loci* marcadores das diferentes cepas de *H. pylori*. A sequência marcadora relativa ao gene *cagA*, determinante da presença da “ilha de patogenicidade” é apresentado em comparação ao fragmento marcador do gene *urease C* (Figura 8), os quais possuem 349pb e 289pb, respectivamente. As sequências *s1* e *s2* (*s1* com tamanho de 259 pb e *s2* com 281 pb) são apresentadas na figura 9, enquanto que as sequências *m1* e *m2* são apresentadas na figura 10. O fragmento amplificado referente ao alelo *m1* possui um tamanho de 199 pb e o alelo *m2* 290 pb. A sequência marcadora do genoma humano β -*actina* foi utilizada como controle das extrações do DNA das amostras.

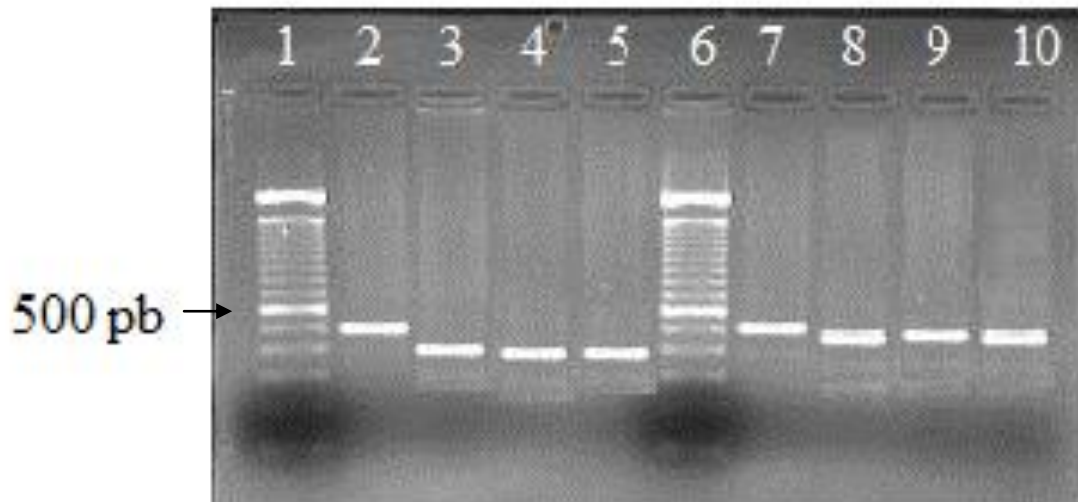


Figura 8: Padrão de seqüências amplificadas em gel de agarose (2%) relativo aos genes *urease C* e *cagA*. (1) e (6) Marcador 100pb; (2) e (7) β -actina; (3) a (5) *urease C*; (8) e (10) *cagA*.

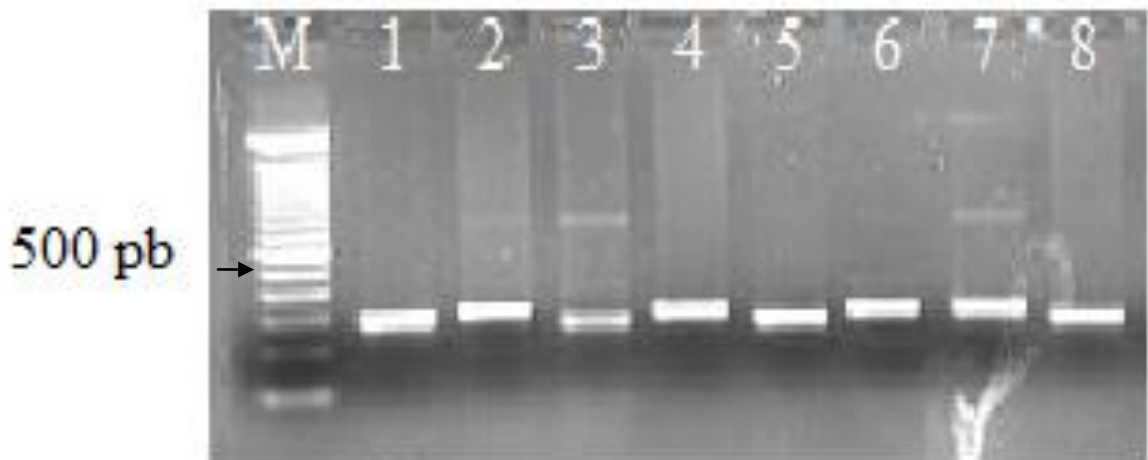


Figura 9: Padrão de seqüências amplificadas em gel de agarose (2%) relativo às seqüências *s1* e *s2*. (M) Marcador 100pb; (1) ,(3), (5) e (8) *vacA-s1*; (2), (4),(6) e (7) *vacA-s2*.

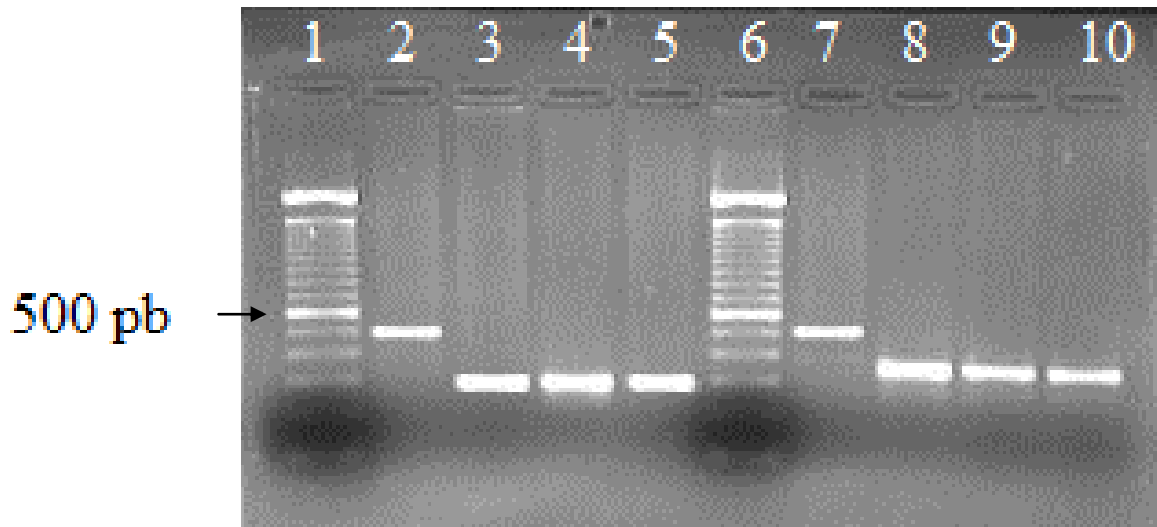


Figura 10: Padrão de seqüências amplificadas em gel de agarose (2%) relativo às seqüências *m1* e *m2*. (1) e (6) Marcador 100pb; (2) e (7) β -actina; (3) a (5) *vacA-m1*; (8) e (10) *vacA-m2*.

4.3 Diversidade de cepas

4.3.1 Nível de prevalência das diferentes cepas

Seqüências sinalizadoras s1 e s2. Foram inicialmente registradas as freqüências de cepas *s1* e *s2* de *H. pylori* entre os pacientes examinados. As cepas *s1+* foram as mais frequentes entre os pacientes. Presente em 59% dos indivíduos analisados, essa cepa foi descrita em 70% daqueles portadores de úlcera péptica.

Marcadores da ilha de patogenicidade cagA. Entre os pacientes Hp+, 45% deles apresentaram cepas portadoras da ilha de patogenicidade, o que foi evidenciado através da detecção do alelo marcador *cagA*. Do mesmo modo que a cepa *s1+*, houve uma significativa incidência das cepas *cagA+* entre os pacientes portadores de úlcera péptica, dentre os quais 70% apresentaram a ilha de patogenicidade.

Variantes do loco vacA. Entre os portadores de úlcera péptica foram verificados que os *loci* *m1* (*m1+*) e *m2* (*m2+*) apresentaram igual prevalência (50%) entre os pacientes examinados, contudo em um (1) portador desta patologia evidenciamos a presença de ambas as sequências (*m1* e *m2*), o que assinalou a ocorrência de casos de pacientes infectados simultaneamente por duas cepas diferentes de *H. pylori*. O mesmo aconteceu em outros grupos de patologias estudadas, onde cepas *m1+* e cepas *m2+* ocorreram juntas em um portador de pangastrite, em um (1) portador de esofagite, em dois portadores de pólipos, em três portadores de bulbite e em quatro portadores de gastrite.

A frequência dos diferentes *loci*, examinados entre os pacientes identificados como portadores de *H. pylori* (N= 99) está ilustrada na figura 11.

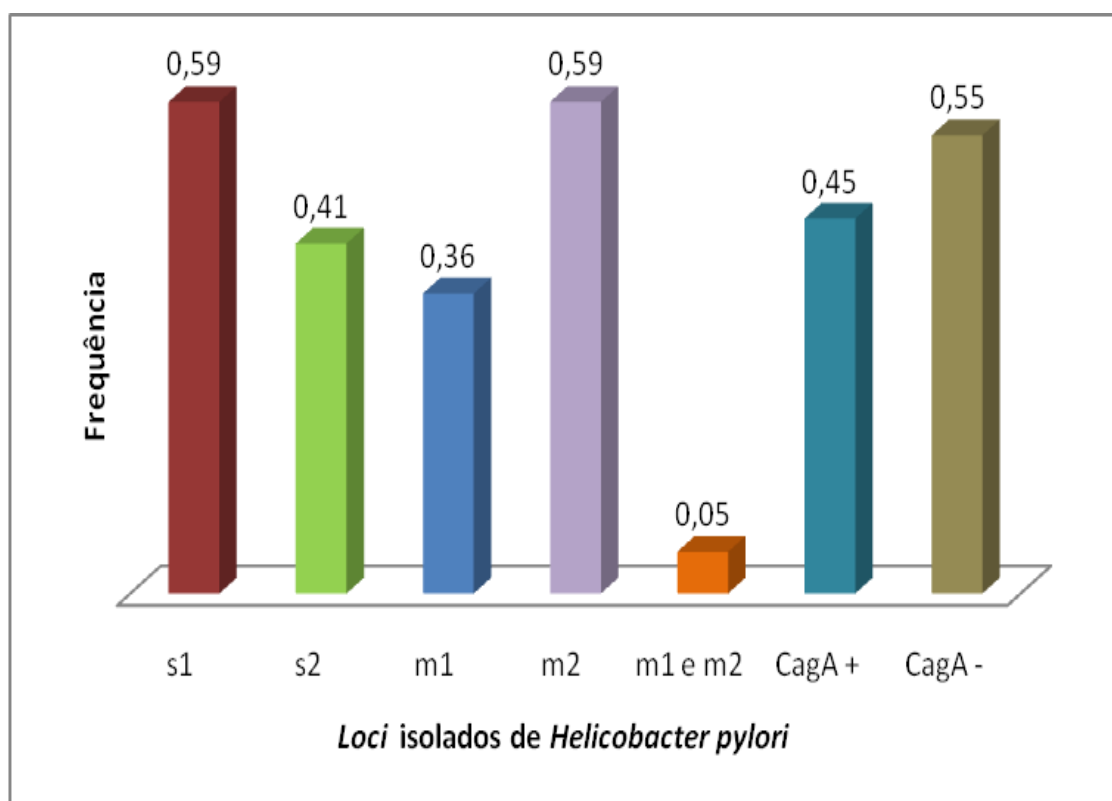


Figura 11: Frequência de distribuição dos *loci* isolados de *Helicobacter pylori* entre os pacientes atendidos no setor de Endoscopia do Hospital Luzia Pinho de Melo MC/SP, no período de março/2008 a dezembro/2009.

Na tabela 2 são apresentadas as frequências de distribuição dos *loci* de *H. pylori* de acordo com as diferentes patologias descritas para os pacientes examinados no presente estudo. Ressaltamos que na presente tabela, a soma dos valores correspondentes às diferentes afecções (N=141) descritas entre os pacientes é superior ao número total de pacientes portadores de alguma patologia (N=99). Isto se deve a frequente ocorrência de múltiplos distúrbios gástricos em um mesmo paciente.

As combinações entre as sequências de diferentes *loci* foram consideradas na descrição das cepas de *H. pylori* presentes entre os indivíduos examinados. Ambas as combinações *s1/m1* e *s2/m2* ocorreram em 37% dos pacientes, independente da patologia apresentada. Entre os portadores de úlcera e bulbite as combinações *s1/m1* e *s1/m2* aparecem em 45% das amostras analisadas. Entretanto, entre os portadores de gastrite e esofagite, a combinação *s1/m1* ocorreu com maior frequência, sendo que a incidência nestas patologias foi de 39% e 52%, respectivamente. As sequências *s2/m2* ocorreram com elevada prevalência nos portadores de pangastrite (39%) e pólipos (31%), contudo nestes últimos, as sequências *s1/m1* também ocorreram com incidência elevada, 31%. As combinações entre os alelos dos *loci* “s” e “m” nas diversas patologias avaliadas são apresentadas na figura 12.

Tabela 2: Frequência de distribuição dos *loci* de *Helicobacter pylori* de acordo com as patologias dos pacientes atendidos no setor de Endoscopia do Hospital Luzia Pinho de Melo MC/SP, no período de março/2008 a dezembro/2009.

Alelos	Patologias					
	Úlcera (n=10)	Gastrite (n = 62)	Esofagite (n = 21)	Bulbite (n = 11)	Pangastrite (n = 18)	Pólipo (n = 19)
s1+	0,90 (9)	0,61 (38)	0,67 (14)	0,64 (7)	0,50 (9)	0,58 (11)
s2+	0,10 (1)	0,39 (24)	0,33 (7)	0,36 (4)	0,50 (9)	0,42 (8)
m1+	0,45 (5)	0,36 (26)	0,47 (11)	0,19 (5)	0,39 (8)	0,31 (8)
m2+	0,45 (5)	0,58 (40)	0,48 (11)	0,54 (9)	0,55 (11)	0,58 (13)
m1 e m2	0,10 (1)	0,06 (4)	0,05 (1)	0,27 (3)	0,05 (1)	0,11 (2)
cagA+	0,70 (7)	0,47 (29)	0,52 (11)	0,54 (6)	0,50 (9)	0,53 (10)

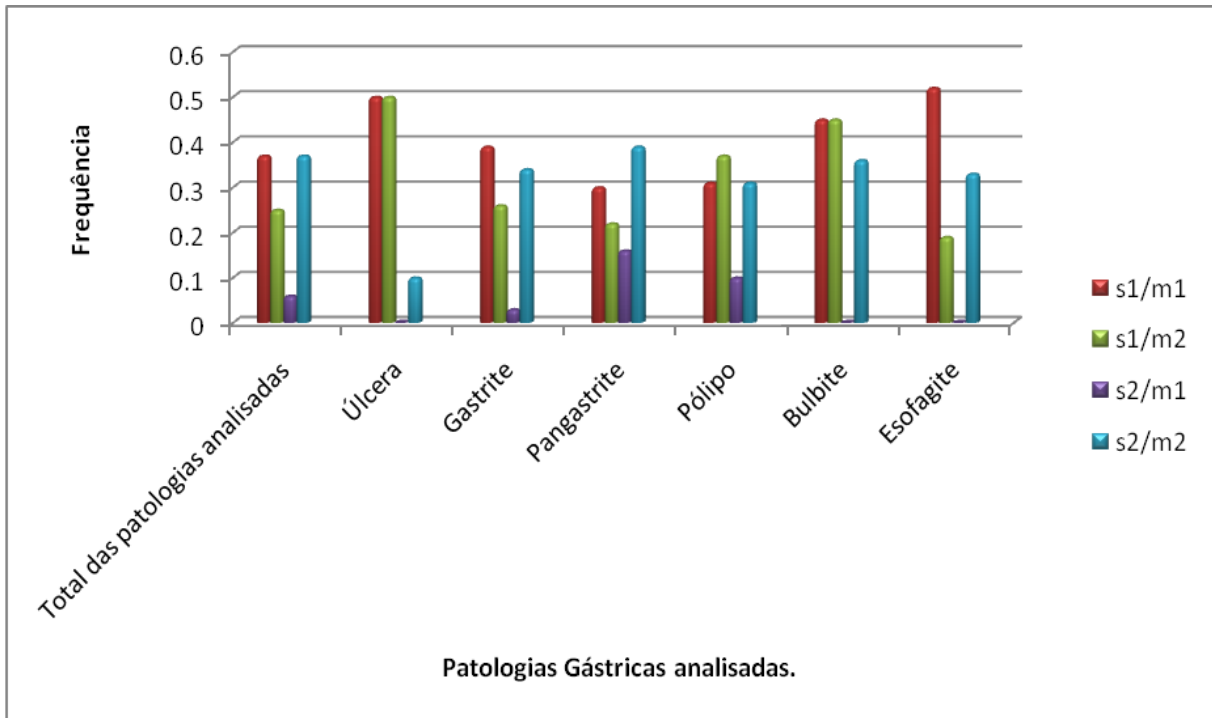


Figura 12: Frequência de distribuição das combinações entre os *loci* “s” e “m” de *Helicobacter pylori* nos pacientes atendidos no setor de Endoscopia do Hospital Luzia Pinho de Melo MC/SP, no período de março/2008 a dezembro/2009.

Quando incluímos o marcador de patogenicidade *cagA* na análise combinada dos *loci*, verificamos que as combinações *s1/m1/cagA+* e *s2/m2/CagA-*, apresentam uma frequência de 25% no total de pacientes examinados. A combinação alélica *s1/m2/cagA+* é a mais frequente entre os portadores úlcera e bulbite (50% e 36%), embora entre os pacientes diagnosticados com bulbite, as combinações *s1/m1/cagA+* e *s2/m2/cagA+* também ocorreram com frequência igual a 36%. Entre os portadores de gastrite, a combinação *s2/m2/cagA-* é a mais frequente (39%), enquanto que entre os portadores de esofagite, a combinação *s1/m1/cagA+* ocorre em 38% dos pacientes. Entre os portadores de pólipo, as combinações *s1/m1/cagA+*, *s1/m2/cagA-* e *s2/m2/cagA-* ocorrem com frequência de 26%. As combinações entre os alelos dos *loci* “s”, “m” e *cagA*, são apresentadas na figura 15.

É possível verificar que da figura 13, algumas combinações entre as sequências destacam-se uma vez associadas a certas patologias examinadas. Para verificar a significância da correlação entre as múltiplas cepas de *H. pylori* e os distúrbios gástricos, efetuamos análises relativas às múltiplas combinações entre os alelos (1), aspectos relativos aos pacientes (2) com as patologias descritas entre os indivíduos da amostra estudada.

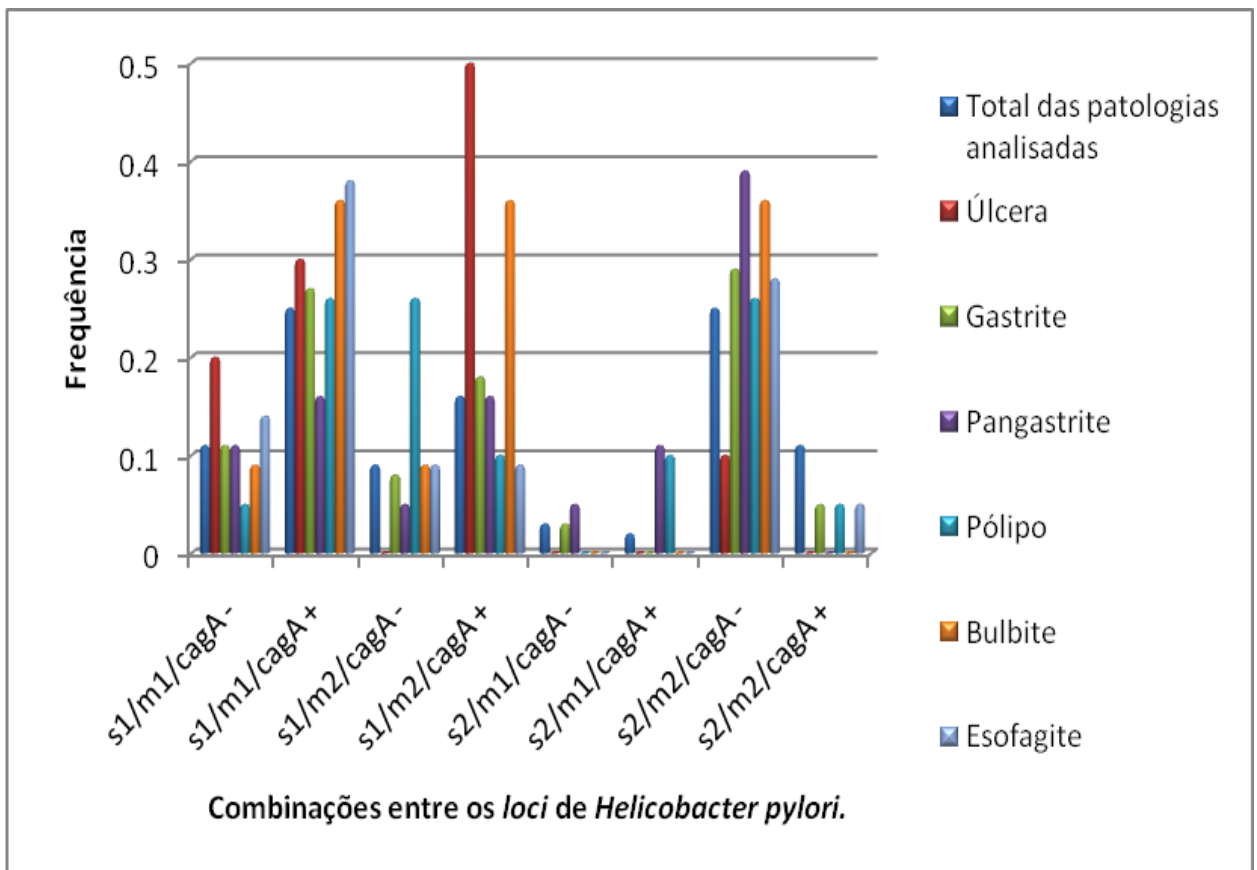


Figura 13: Frequência de distribuição das combinações entre os *loci* de *Helicobacter pylori* dos pacientes atendidos no setor de Endoscopia do Hospital Luzia Pinho de Melo MC/SP, no período de março/2008 a dezembro/2009.

4.3.2 Análise de correlação da diversidade de cepas com a ocorrência das diferentes afecções gástricas.

As tabelas a seguir, numeradas de 3 a 9, resumem os resultados obtidos através da aplicação da análise de Regressão Logística Binária (RLB), tendo como variáveis dependentes cada uma das diferentes manifestações patológicas gástricas. As variáveis independentes foram selecionadas entre os parâmetros do hospedeiro, idade (variável não categórica) e o gênero, e a diversidade alélica do microorganismo (todas indicadas como variáveis categóricas).

Inicialmente, foram reunidas as patologias de natureza ulcerativa em um grupo único de afecções gástricas (tabela 3). Podemos verificar na tabela 3 que o parâmetro “idade do paciente” apresentou o maior nível de significância ($p=0,000$) como fator *preditivo* em relação ao desenvolvimento das patologias ulcerativas. O coeficiente de regressão logística obtido foi maior do que zero, o que significa que, quanto maior a idade, maiores são as chances de desenvolvimento de ulcerações gástricas. Referente à infecção por *H. pylori* (urease+), bem como em relação à prevalência das cepas s1+ e cagA+, foram obtidos níveis significativos de correlação com o conjunto de patologias ulcerativas, $p=0,004$, $p= 0,046$ e $p=0,016$, respectivamente. Todavia, o parâmetro idade foi aquele que apresentou maior significância na capacidade preditiva das patologias consideradas. Todas as demais variáveis apresentaram valores de correlação preditiva não significativamente diferente de zero ($p > 0,05$). O mesmo ocorreu quando foi considerada a capacidade preditiva das múltiplas combinações das variáveis ($p = 0,068$), inclusive aquelas que separadamente foram estatisticamente significativas.

Tabela 3: Capacidade preditiva dos parâmetros relacionados aos portadores de patologias ulcerativas (gastrite, pangastrite e úlcera) e a diversidade alélica da *Helicobacter pylori* em pacientes atendidos no Setor de Endoscopia do Hospital Luzia de Pinho Melo MC/SP.

Parâmetros	Capacidade Preditiva dos Parâmetros		Coeficiente estatístico de Regressão Logística	
	<i>H. pylori</i> Escore (p)	Paciente Escore (p)	<i>H. pylori</i>	Paciente
Idade	-	19,86 (0,000)*	-	0,086 ±0,027
Gênero	-	3,11 (0,078)	-	-1,686 ±0,927
Etnia	-	1,62 (0,620)	-	1,422 ±1,002
HP+	8,40 (0,004)*	-	2,731 ±2,505	-
S1	3,99 (0,046)*	-	0,645 ±2,663	-
S2	0,19 (0,661)	-	0,514 ±2,503	-
M1	1,22 (0,269)	-	1,743 ±1,562	-
M2	1,72 (0,189)	-	0,889 ±1,424	-
cagA	5,82 (0,016)*	-	1,559 ±1,255	-
Total HP	13,39 (0,077)	-	-	-
Total Geral	-	14,56 (0,068)	-	-

(Gênero: 0 = feminino; 1 = masculino); *estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Na figura 14 está indicado o nível de probabilidade preditiva estimada pela RLB, para o paciente desenvolver algum tipo de patologia ulcerativa de acordo com

a prevalência individual de cada um dos parâmetros categóricos considerados e da variação da idade (não categórico). Na figura é possível verificar a significativa influência da idade no desenvolvimento dessas patologias. Os demais aspectos apresentaram níveis de probabilidade, os quais não foram significativamente diferentes de zero ($p > 0,05$).

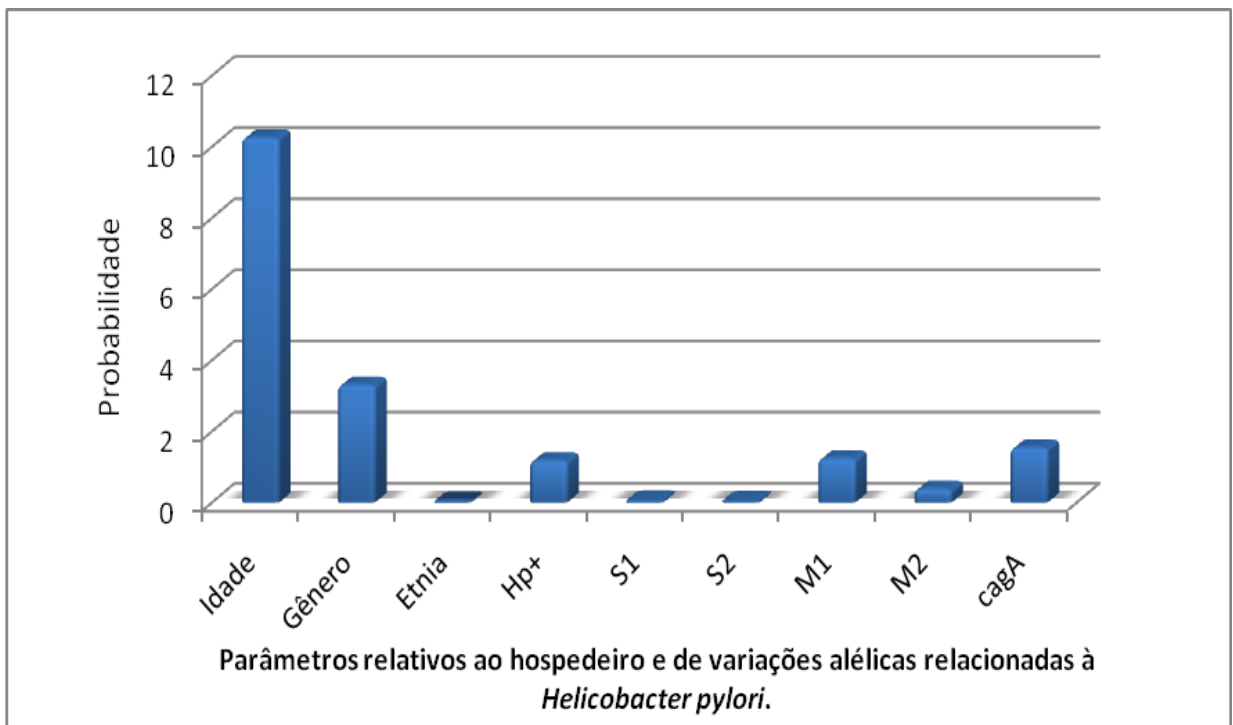


Figura 14: Estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver patologias ulcerativas de acordo com a presença de parâmetros relativos ao hospedeiro e de variações alélicas relacionadas à *Helicobacter pylori*. (*) Significativamente diferente de zero.

A seguir realizamos as mesmas análises, porém cada uma das patologias ulcerativas foi considerada isoladamente. Verificamos diferenças significativas nos resultados obtidos para RLB entre os pacientes portadores de úlcera. A tabela 4 indica que a idade permaneceu como parâmetro estatisticamente significativo ($p=0,004$), porém o gênero também apresentou níveis preditivos significantes ($p=0,001$). O sexo feminino apresentou um fator de probabilidade preditiva equivalente 7,03% maior de desenvolver úlcera (Figura 15). A prevalência de *H.*

pylori não foi indicado como fator significativo para o desenvolvimento de úlcera ($p=0,065$), embora o valor estimado esteja próximo ao limite de significância estatístico. As cepas portadoras do *loci s1* e *cagA* permaneceram como parâmetros relevantes na predição de úlcera $p=0,002$ e $p=0,013$, respectivamente (Tabela 4).

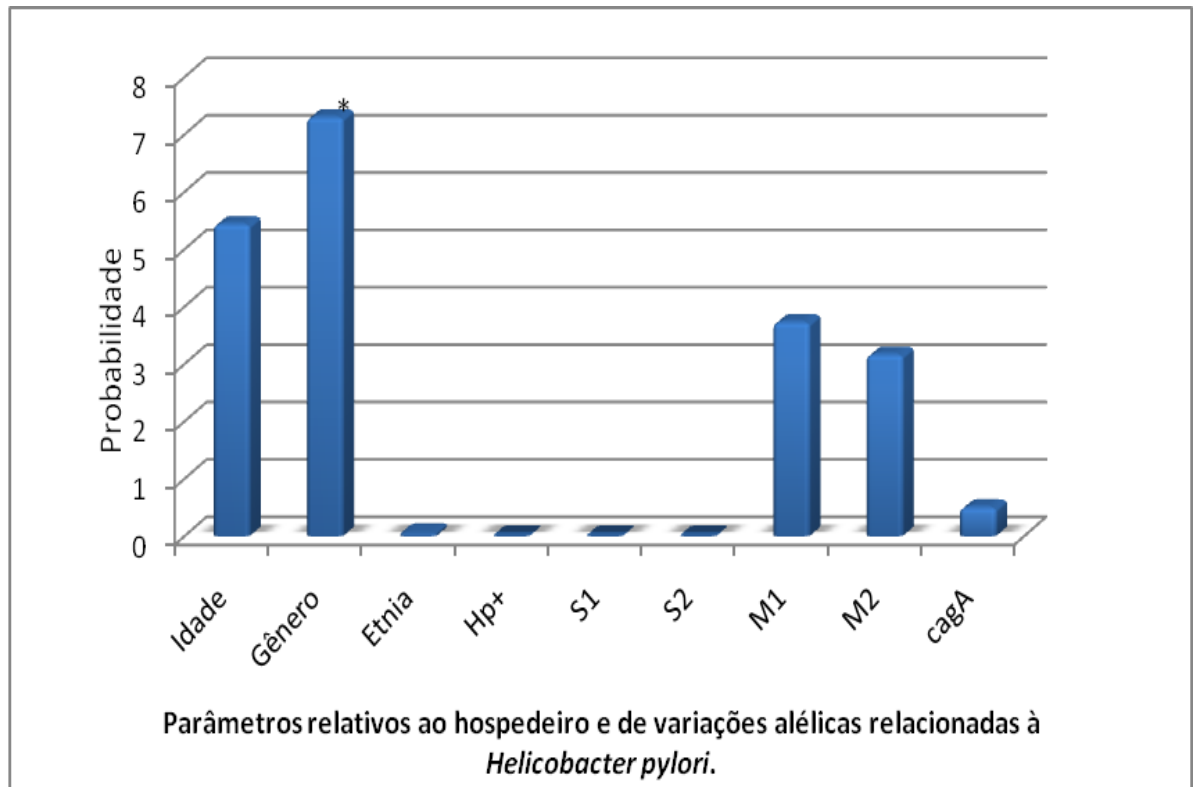


Figura 15: Estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver úlcera de acordo com a presença de parâmetros relativos ao hospedeiro e de variações alélicas relacionadas à *Helicobacter pylori*. (*) Significativamente diferente de zero.

Tabela 4: Capacidade preditiva dos parâmetros relacionados aos portadores de úlcera e a diversidade alélica da *Helicobacter pylori* em pacientes atendidos no Setor de Endoscopia do Hospital Luzia de Pinho Melo MC/SP.

Parâmetros	Capacidade Preditiva dos		Coeficiente de Regressão	
	Parâmetros		Logística	
	<i>H. pylori</i> Escore (p)	Paciente Escore (p)	<i>H. pylori</i>	Paciente
Idade	-	8,20 (0,004)*	-	0,130 ±0,056
Gênero	-	10,74 (0,001)*	-	-3,162 ±1,170
Etnia	-	3,00 (0,620)	-	1,002 ±0,853
HP+	3,40 (0,065)	-	14,381 ±20,660	-
S1	9,48 (0,002)*	-	-13,903 ±21,270	-
S2	2,36 (0,124)	-	-12,546 ±21,270	-
M1	1,54 (0,215)	-	3,667 ±1,899	-
M2	0,52 (0,471)	-	-3,028 ±1,702	-
cagA	6,24 (0,013)*	-	0,791 ±1,116	-
Total HP	11,43 (0,077)	-		
Total Geral	-	23,46 (0,003)*		

(Gênero: 0 = feminino; 1 = masculino); *estatisticamente significativa (p < 0,05)

Entre os portadores de gastrite, o único parâmetro que apresentou significância estatística está relacionado ao paciente, trata-se novamente da idade

do paciente ($p=0,041$), o aumento da idade ocasiona um aumento da probabilidade preditiva do desenvolvimento de gastrite de apenas 3,13% (figura 16). Todos os parâmetros relacionados à *H. pylori* não apresentaram, neste caso, significância estatística, como ilustra a tabela 5.

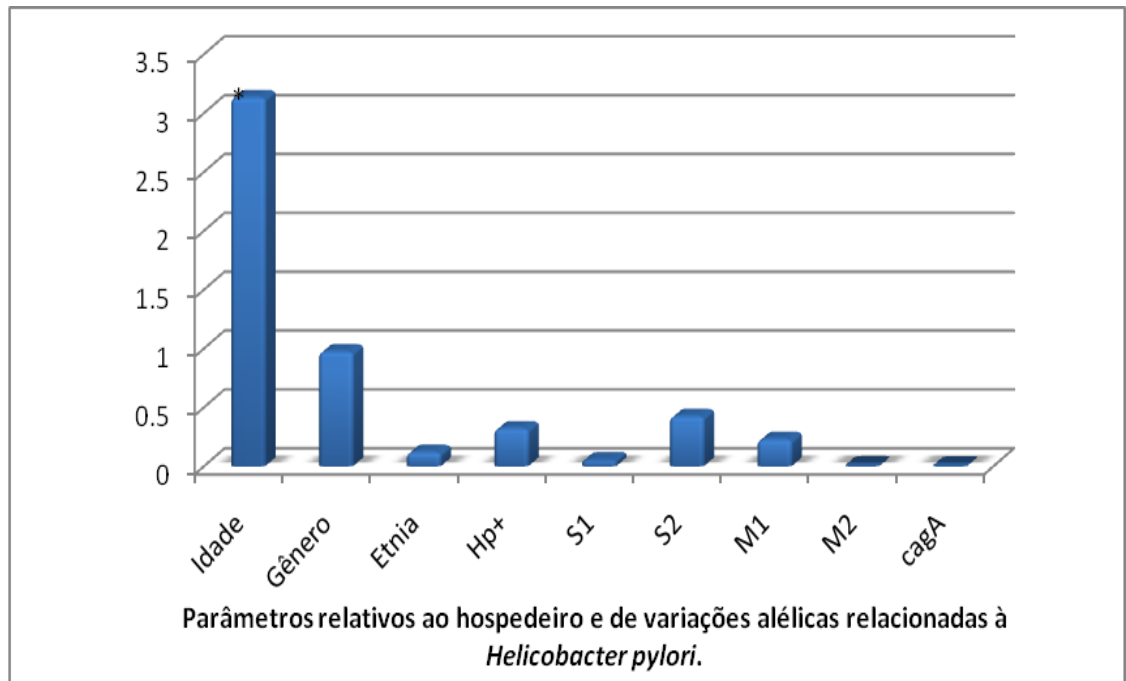


Figura 16: Estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver gastrite de acordo com a presença de parâmetros relativos ao hospedeiro e de variações alélicas relacionadas à *Helicobacter pylori*. (*) Significativamente diferente de zero.

Tabela 5: Capacidade preditiva dos parâmetros relacionados aos portadores de gastrite e a diversidade alélica da *Helicobacter pylori* em pacientes atendidos no Setor de Endoscopia do Hospital Luzia de Pinho Melo MC/SP.

Parâmetros	Capacidade Preditiva dos		Coeficiente de Regressão	
	Parâmetros		Logística	
	<i>H. pylori</i> Escore (p)	Paciente Escore (p)	<i>H. pylori</i>	Paciente
Idade	-	4,20 (0,041)*	-	0,026 ±0,015
Gênero	-	0,52 (0,469)	-	0,443 ±0,449
Etnia	-	1,81 (0,711)	-	0,884 ±0,812
HP+	0,21 (0,648)	-	0,900 ±1,587	-
S1	1,44 (0,230)	-	0,373 ±1,646	-
S2	0,99 (0,319)	-	1,016 ±1,560	-
M1	0,00 (0,988)	-	0,508 ±1,061	-
M2	0,08 (0,774)	-	0,047 ±1,061	-
cagA	0,50 (0,481)	-	0,011 ±1,919	-
Total HP	2,41 (0,88)	-		
Total Geral	-	6,51 (0,590)		

(Gênero: 0 = feminino; 1 = masculino); *estatisticamente significativa (p < 0,05)

Entretanto, entre os portadores de pangastrite, o sexo do paciente apresentou significância para o desenvolvimento da patologia ($p=0,013$) e novamente, mulheres apresentam maior propensão à patologia (tabela 6).

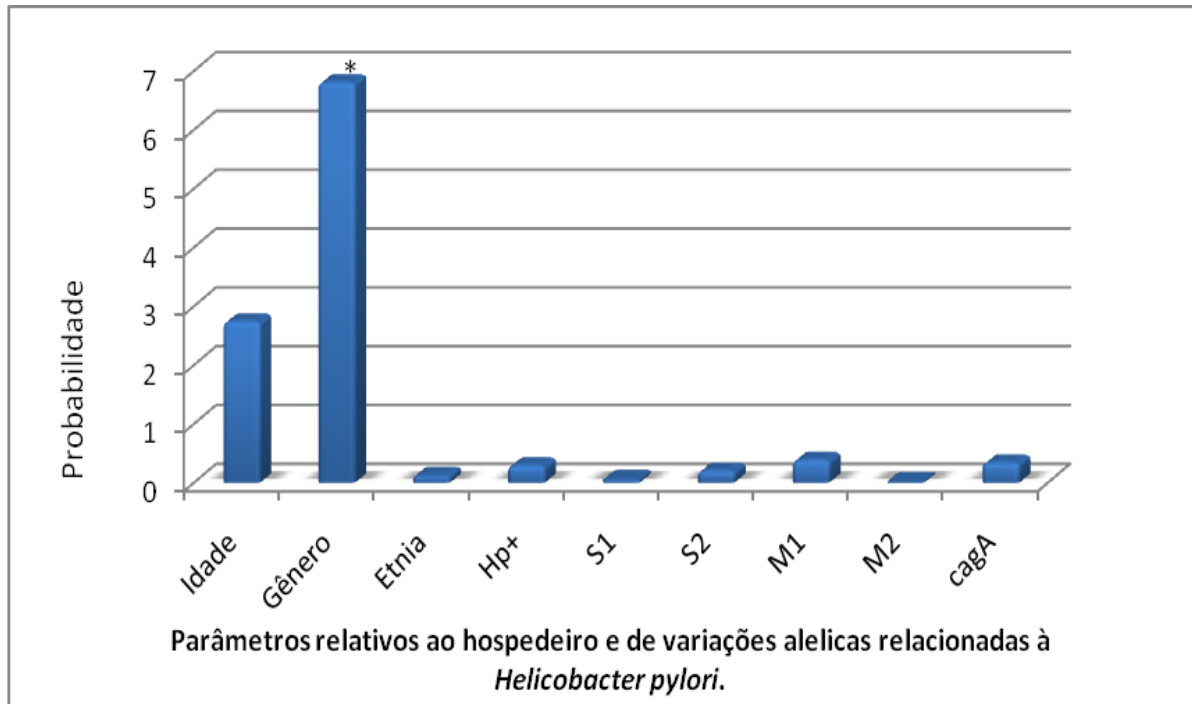


Figura 17: Estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver pangastrite de acordo com a presença de parâmetros relativos ao hospedeiro e de variações alélicas relacionadas à *Helicobacter pylori*. (*) Significativamente diferente de zero.

Quando comparamos a probabilidade dos parâmetros predizerem o desenvolvimento da pangastrite, o gênero é o único parâmetro relacionado, cuja capacidade preditiva (6,81%) é significativamente diferente de zero. Todos os demais indicadores apresentam valores preditivos inferiores e não significativamente diferentes de zero (Figura 17).

Tabela 6: Capacidade preditiva dos parâmetros relacionados aos portadores de pangastrite e a diversidade alélica da *Helicobacter pylori* em pacientes atendidos no Setor de Endoscopia do Hospital Luzia de Pinho Melo MC/SP.

Parâmetros	Capacidade Preditiva dos		Coeficiente de Regressão	
	Parâmetros		Logística	
	<i>H. pylori</i> Escore (p)	Paciente Escore (p)	<i>H. pylori</i>	Paciente
Idade	-	2,34 (0,127)	-	0,039 ±0,024
Gênero	-	6,19 (0,013)*	-	-1,527 ±0,585
Etnia	-	0,51 (0,440)	-	1,940 ±1,111
HP+	4,28 (0,339)	-	1,341 ±2,454	-
S1	0,11 (0,736)	-	0,634 ±2,556	-
S2	2,63 (0,105)	-	-1,112 ±2,432	-
M1	0,97 (0,325)	-	-0,857 ±1,371	-
M2	0,70 (0,402)	-	0,112 ±1,325	-
cagA	1,75 (0,185)	-	0,417 ±0,710	-
Total HP	7,11 (0,311)	-		
Total Geral	-	15,41 (0,052)		

(Gênero: 0 = feminino; 1 = masculino); *estatisticamente significante (p < 0,05)

Relativo aos portadores de bulbite, o único parâmetro cuja capacidade preditiva foi significativa corresponde a idade do paciente ($p=0,041$), contudo verificamos que a estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver a bulbite não é significativamente diferente do que zero (Tabela 7). Todavia, a presença de cepas portadoras do *loci m2* resultou em uma estimativa significativa de ocorrência desta afecção. Embora a probabilidade preditiva para o desenvolvimento da patologia é reduzida, cerca de 3,29% (Figura 18).

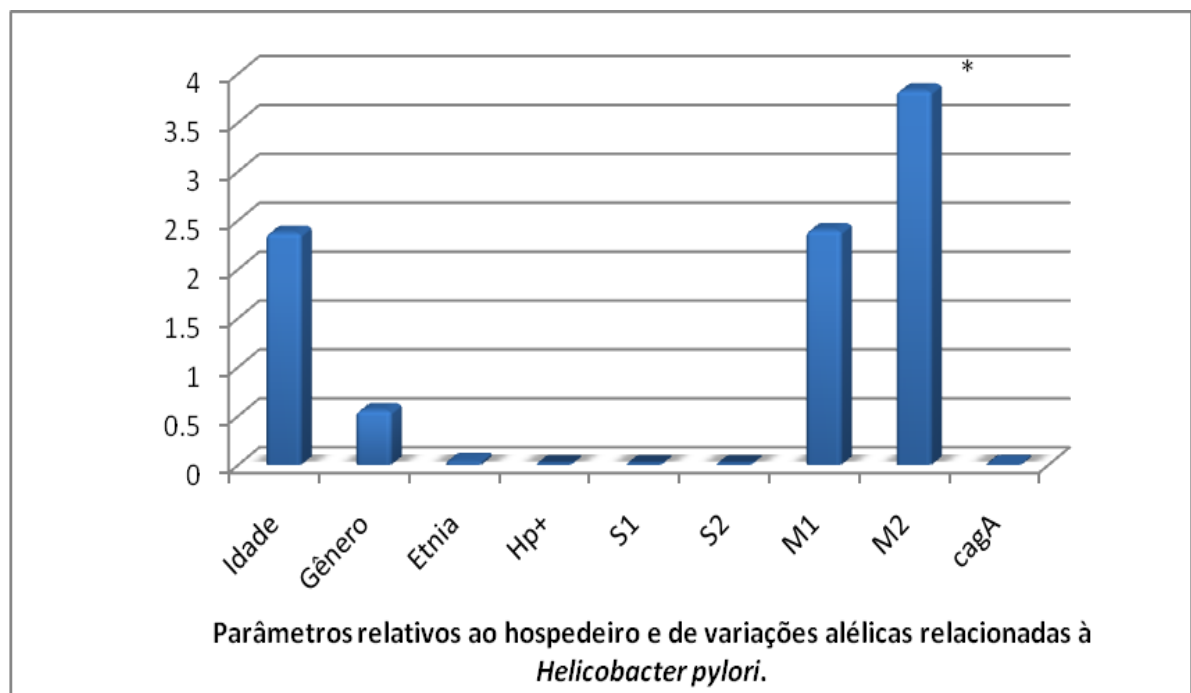


Figura 18: Estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver bulbite de acordo com a presença de parâmetros relativos ao hospedeiro e de variações alélicas relacionadas à *Helicobacter pylori*. (*) Significativamente diferente de zero.

Tabela 7: Capacidade preditiva dos parâmetros relacionados aos portadores de bulbite e a diversidade alélica da *Helicobacter pylori* em pacientes atendidos no Setor de Endoscopia do Hospital Luzia de Pinho Melo MC/SP.

Parâmetros	Capacidade Preditiva dos		Coeficiente de Regressão	
	Parâmetros		Logística	
	<i>H. pylori</i> Escore (p)	Paciente Escore (p)	<i>H. pylori</i>	Paciente
Idade	-	4,19 (0,041)*	-	0,036 ±0,023
Gênero	-	0,35 (0,557)	-	0,470 ±0,629
Etnia	-	0,20 (0,821)	-	1,054 ±1,087
HP+	0,09 (0,771)	-	21,919 ±73,725	-
S1	0,63 (0,428)	-	-19,830 ±73,777	-
S2	0,19 (0,661)	-	-19,364 ±21,725	-
M1	0,01 (0,938)	-	-1,748 ±1,128	-
M2	0,82 (0,366)	-	-2,213 ±1,131	-
cagA	0,26 (0,612)	-	0,049 ±0,813	-
Total HP	10,85 (0,09)	-		
Total Geral	-	13,71 (0,090)		

(Gênero: 0 = feminino; 1 = masculino); *estatisticamente significante (p < 0,05)

A análise dos pacientes portadores de esofagite indicou que a idade do paciente continua sendo um parâmetro com significativa capacidade preditiva ($p=0,05$) para a doença (Tabela 8). A probabilidade de que a idade constitua favoreça o desenvolvimento de esofagite é de 3,29% (Figura 19).

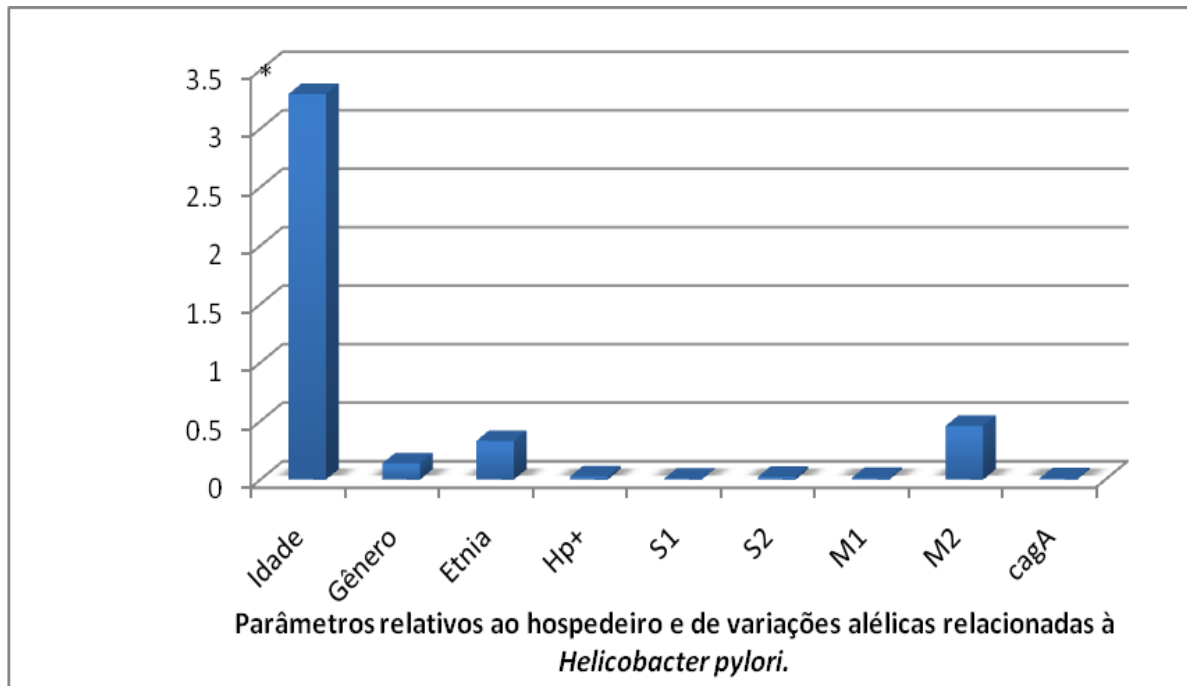


Figura 19: Estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver esofagite de acordo com a presença de parâmetros relativos ao hospedeiro e de variações alélicas relacionadas à *Helicobacter pylori*. (*) Significativamente diferente de zero.

Tabela 8: Capacidade preditiva dos parâmetros relacionados aos portadores de esofagite e a diversidade alélica da *Helicobacter pylori* em pacientes atendidos no Setor de Endoscopia do Hospital Luzia de Pinho Melo MC/SP.

Parâmetros	Capacidade Preditiva dos		Coeficiente de Regressão	
	Parâmetros		Logística	
	<i>H. pylori</i> Escore (p)	Paciente Escore (p)	<i>H. pylori</i>	Paciente
Idade	-	3,80 (0,050)*	-	0,030 ±0,017
Gênero	-	0,22 (0,640)	-	-0,183 ±0,489
Etnia	-	0,36 (0,550)	-	0,041 ±0,191
HP+	0,04 (0,838)	-	0,289 ±1,743	-
S1	0,92 (0,338)	-	-0,158 ±1,808	-
S2	0,52 (0,469)	-	-0,267 ±1,716	-
M1	1,11 (0,293)	-	0,165 ±1,295	-
M2	1,00 (0,319)	-	0,831 ±1,225	-
cagA	0,67 (0,413)	-	-0,064 ±0,600	-
Total HP	2,18 (0,903)	-		
Total Geral	-	5,54 (0,699)		

(Gênero: 0 = feminino; 1 = masculino); *estatisticamente significante (p < 0,05)

A única patologia estudada em que nenhum dos parâmetros analisados teve capacidade preditiva para o desenvolvimento de pólipos na mucosa gástrica (Tabela 9). Da mesma forma, nenhum dos fatores avaliados foi capaz de estimar uma probabilidade de desenvolvimento desta patologia significativamente diferente de zero (figura 20).

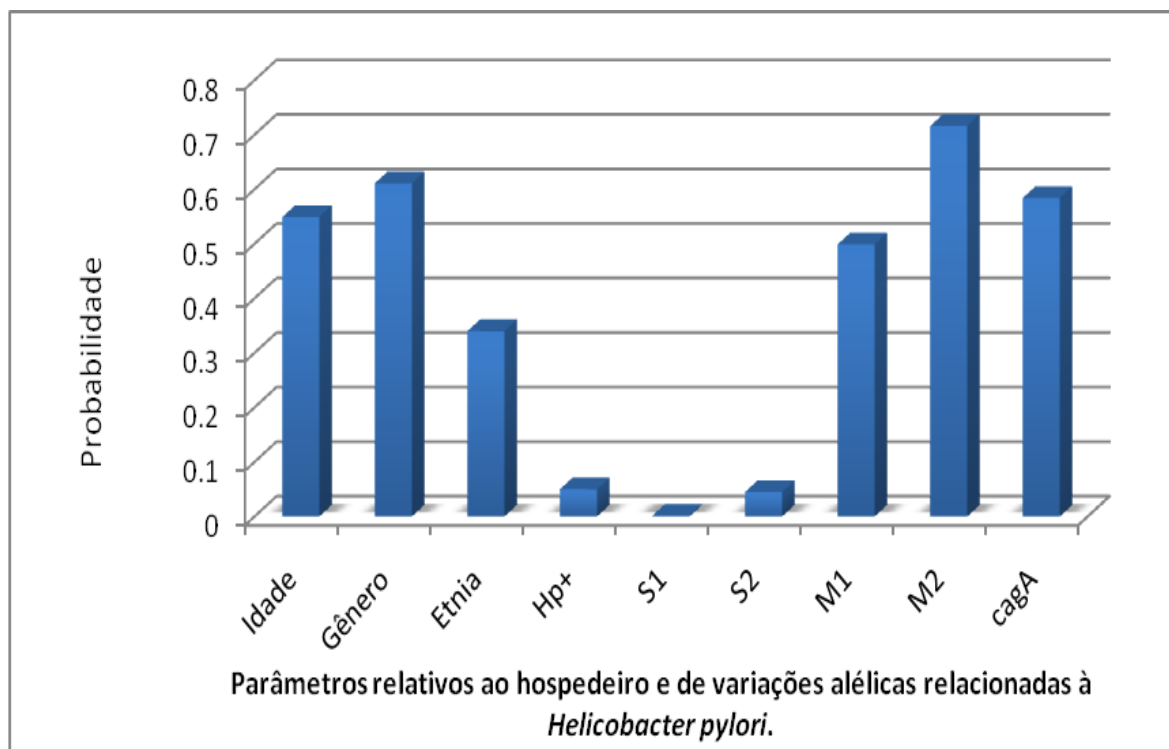


Figura 20: Estimativa da probabilidade de um paciente desenvolver pólipos de acordo com a presença de parâmetros relativos ao hospedeiro e de variações alélicas relacionadas à *Helicobacter pylori*. (*) Significativamente diferente de zero.

Tabela 9: Capacidade preditiva dos parâmetros relacionados aos portadores de pólipos e a diversidade alélica da *Helicobacter pylori* em pacientes atendidos no Setor de Endoscopia do Hospital Luzia de Pinho Melo MC/SP.

Parâmetros	Capacidade Preditiva dos		Coeficiente de Regressão	
	Parâmetros		Logística	
	<i>H. pylori</i> Escore (p)	Paciente Escore (p)	<i>H. pylori</i>	Paciente
Idade	-	1,03 (0,311)	-	0,013 ±0,018
Gênero	-	0,70 (0,401)	-	-0,401 ±0,513
Etnia	-	0,25 (0,841)	-	-0,160 ±0,132
HP+	1,52 (0,217)	-	0,362 ±1,623	-
S1	0,42 (0,518)	-	0,082 ±1,693	-
S2	0,29 (0,591)	-	-0,336 ±1,582	-
M1	0,19 (0,663)	-	-0,737 ±1,044	-
M2	1,08 (0,298)	-	-0,847 ±1,001	-
cagA	1,53 (0,216)	-	-0,489 ±0,640	-
Total HP	3,34 (0,765)	-		
Total Geral	-	4,43 (0,816)		

(Gênero: 0 = feminino; 1 = masculino); *estatisticamente significante (p < 0,05)

4.4 Estimativa da densidade relativa inicial de populações *H. pylori* em pacientes com diferentes afecções gástricas

4.4.1 Padronização da metodologia

Para a aplicação da metodologia de amplificação de sequências marcadoras do genoma do microorganismo em sistema qPCR, foi necessário antes determinar, entre os *loci* examinados, as sequências adequadas para a análise quantitativa do DNA bacteriano. Para tanto, foi necessário verificar a total especificidade da sequência marcadora ao genoma do microorganismo e a unicidade intragenômica - ausência de sequências análogas presentes no genoma. Essas condições são excludentes para a aplicação da metodologia de quantificação. A especificidade e unicidade do produto amplificado foram demonstradas para o *loci m1*. Por intermédio do sistema SYBR Green (Invitrogen) foi obtida a curva de dissociação do produto alélico amplificado da amostra. As amostras dissociadas apresentaram um único pico de fluorescência o que indica a especificidade dos *primers* em relação à sequência amplificadas. No intervalo da temperatura de melting entre 79,8°C a 80,2°C foi obtida a amplificação da sequência (Figura 21).

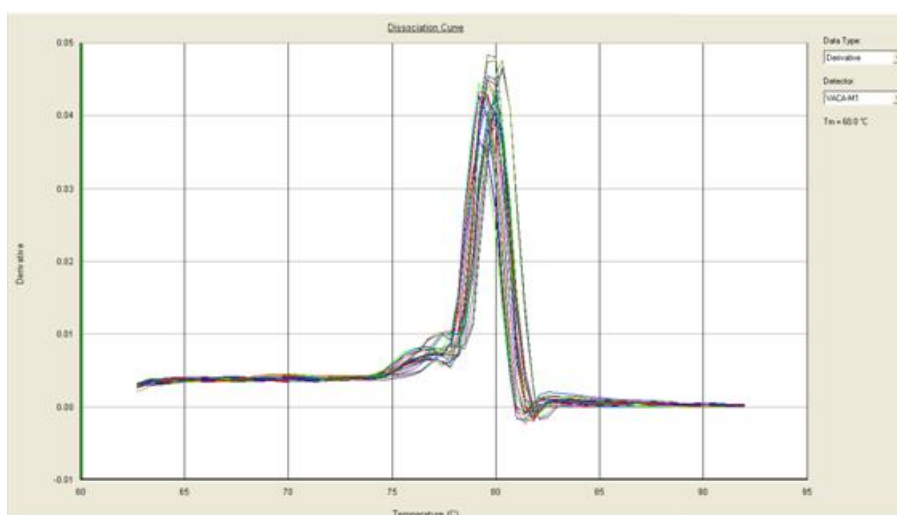


Figura 21: Curva de dissociação das amplificações efetuadas através da aplicação dos *primers* VA3-F e VA3-R para o *loci m1* de *Helicobacter pylori*.

4.1.2 Comparação entre as amostras, referente à densidade relativa das populações de *H. pylori*.

O *loci m1*, marcador cepa m1-específica foi selecionado para os experimentos relativo à análise comparativa da densidade bacteriana em pacientes infectados com essa cepa e portadores de diferentes afecções gástricas. Inicialmente, uma amostra controle foi preparada em duplicata e diluída em série 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10.000 para verificar a coerência e a reprodutibilidade do experimento. Os produtos amplificados obtidos, a partir da amostra-controle de biópsia Hpm1+, apresentaram elevada eficiência de amplificação e reprodutibilidade (Figura 22). As curvas de amplificação obtidas a partir da diluição seriada do material apresentaram distância entre si de aproximadamente 3,16 ciclos, sendo condizente com o esperado para a diluição realizada.

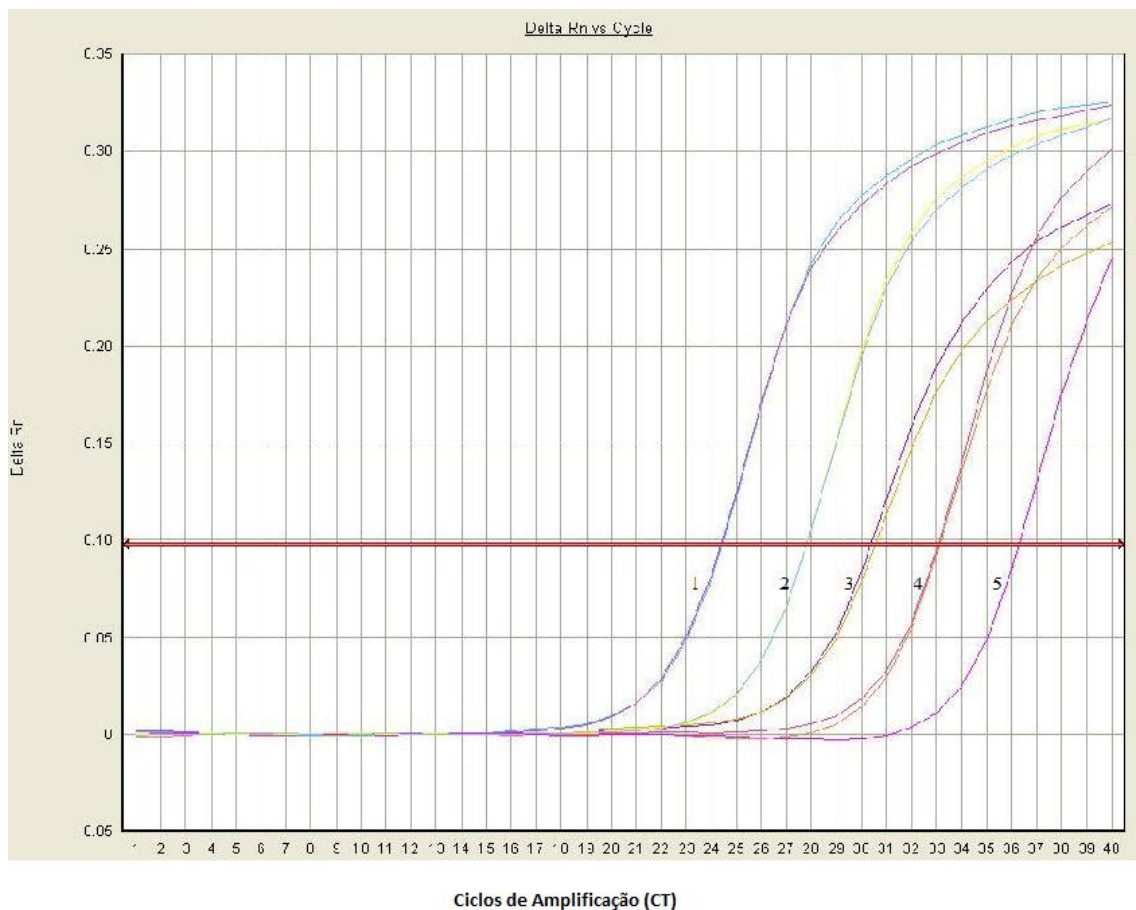


Figura 22: Curva exponencial de amplificação do gene m1 de *Helicobacter pylori*, evidenciando a diluição do produto amplificado. Curvas de amplificação para as diluições: 1 – 1:1; 2 – 1:10; 3 – 1:100; 4 – 1:1.000; 5 – 1:10.000.

A seguir foram efetuadas as análises semi-quantitativas do DNA bacteriano. Biopsias de indivíduos com úlcera (N = 3), gastrite (N = 8), esofagite (N = 3), pólipo (N = 1), e portadores de metaplasia intestinal (N = 1) foram analisadas em comparação com indivíduos, cujo laudo médico indicou ausência de qualquer afecção gástrica (N = 1). Algumas dessas amostras são apresentadas na figura 23.

Os valores correspondentes ao número de ciclos de amplificação (CT) foram determinados na fase linear (Tabela 11). Foi possível verificar que a amostra oriunda do paciente portador de metaplasia intestinal e aquele sem qualquer afecção gástrica apresentaram CT significativamente maiores, o que indica uma densidade bacteriana consideravelmente menor (Figura 24).

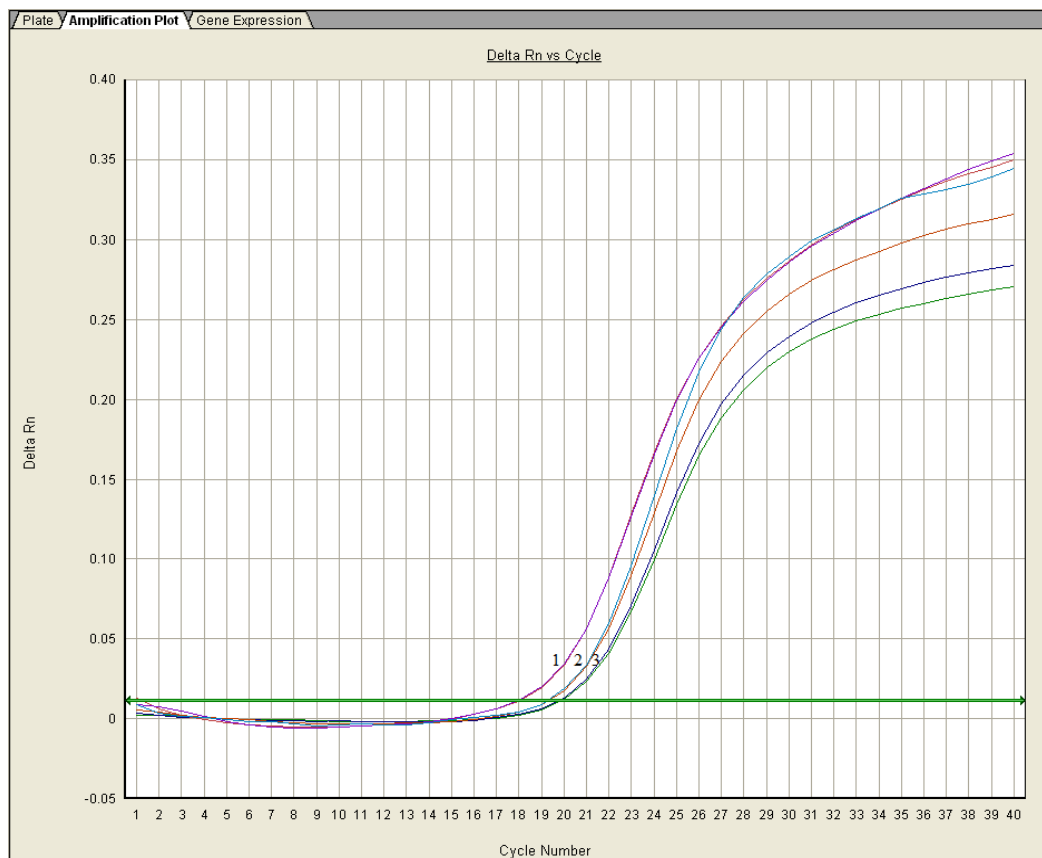


Figura 23: Curva exponencial de amplificação do *loci m1* de *Helicobacter pylori*, evidenciando a diluição do produto amplificado. Curvas de amplificação para as patologias: (1) Úlcera, (2) Gastrite e (3) Paciente sem patologias gástricas.

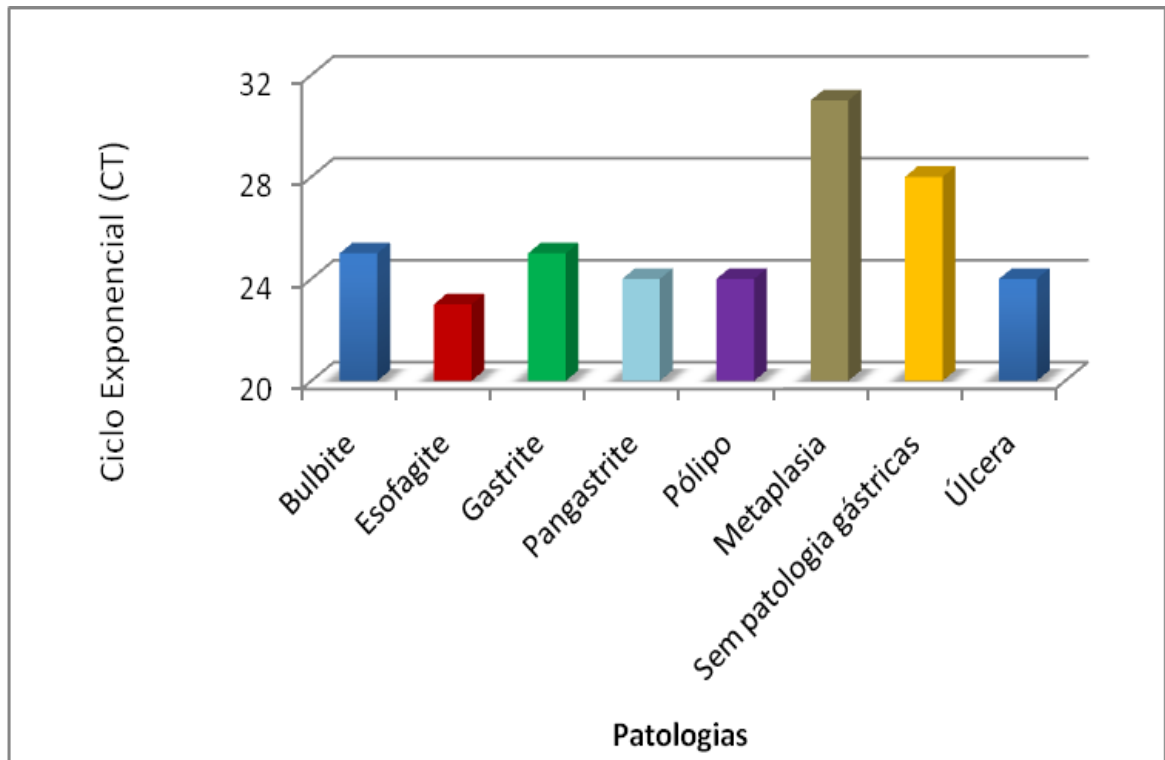


Figura 24: Média dos valores relativos ao número de ciclos de amplificação (CT) obtidos a partir de biópsias de pacientes portadores de diferentes quadros patológicos, atendidos no setor de Endoscopia do Hospital Luzia de Pinho Melo MC/SP.

Tabela 10: Número de ciclos na fase linear de amplificação (CT) do *loci m1* em sistema qPCR, obtidos em amostras de diferentes pacientes portadores de diferentes quadros clínicos relativos às afecções gástricas, e atendidos no setor de Endoscopia do Hospital Luzia Pinho de Melo MC/SP.

Pacientes	Idade	Patologia (s)	CT	Haplótipo
P011 (S.A.S.)	35	Esofagite leve Gastrite leve	23.020	S1/m1/CagA +
P014 (M.A.P.)	47	Pangastrite leve	24.680	S1/m1/CagA+
P016 (A.V.S.N.)	37	Metaplasia intestinal	31.268	S1/m1/CagA-
P025 (T.B.)	46	Gastrite moderada Úlcera Bulbite moderada	22.297	S1/m1/m2/CagA+
P031(N.B.P.F.)	63	Esofagite leve Pangastrite moderada	23.663	S1/m1/CagA+
P035 (J.S.)	48	Gastrite leve Úlcera	21.507	S1/m1/m2/CagA+
P050 (A.P.M)	32	Pólipo Pangastrite leve	24.758	S2/M1/CagA+
P064 (M.R.S.)	33	Esofagite leve Gastrite moderada	23.269	S1/m1/CagA-
P065 (M.M.K.)	49	Exame compatível com a normalidade	28.376	S1/m1/CagA+
P066 (L.M.S.)	49	Gastrite moderada Bulbite moderada Úlcera	28.430	S1/m1/m2/CagA +
P071 (L.P.S.)	55	Gastrite leve	25.355	S1/m1/cagA+
P077 (I.R.S.)	41	Gastrite leve	22.895	S1/m1/cagA+

De acordo com o manual do fabricante (Qiagen) é possível estimar a densidade relativa inicial do DNA de acordo com o número de ciclos de amplificação. A expressão logarítmica da curva de amplificação, ($y = 1,9999\ln(x) - 5,9906$), possibilita estabelecer uma correlação inversa entre um coeficiente de densidade inicial das amostras e o número de ciclos (Figura 25).

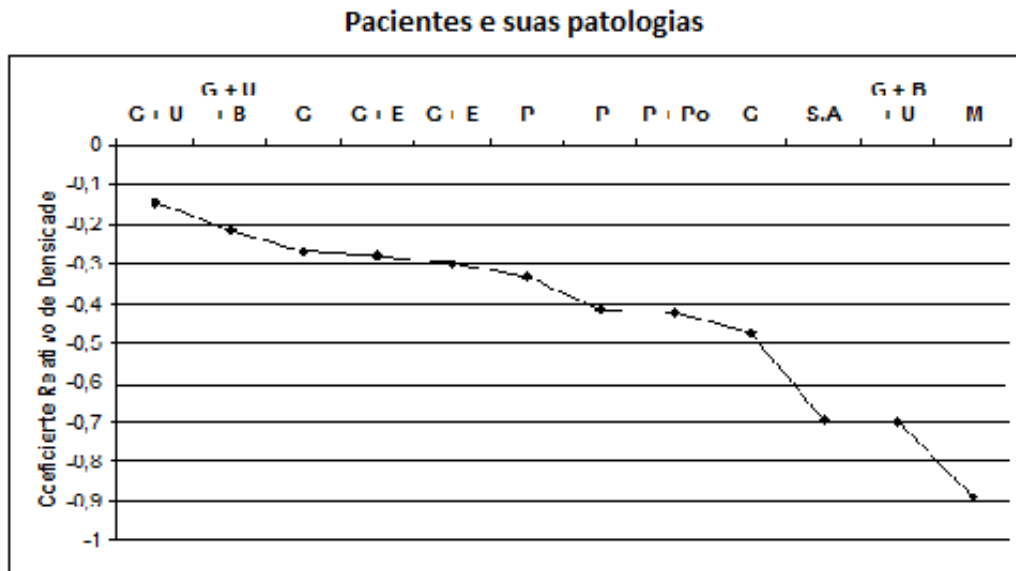


Figura 25: Coeficiente de densidade relativa inicial entre diferentes amostras oriundas de pacientes portadores de diferentes quadros clínicos. (G) gastrite; (U) úlcera; (B) bulbite; (E) esofagite; (P) pangastrite; (Po) pólipos; (S.A) sem afecção e (M) metaplasia intestinal.

Desse modo, foi possível verificar que pacientes portadores de doenças ulcerativas, exceto o paciente P066 (L.M.S.), apresentaram densidade de *H. pylori* elevadas, enquanto que os pacientes portadores de metaplasia intestinal e sem afecção apresentaram reduzida densidade bacteriana.

5. DISCUSSÃO

A infecção por *H. pylori* atinge cerca de 50% da população mundial, entretanto, apenas 15% da população desenvolve patologias gástricas em decorrência desta infecção (COVACCI *et al.*, 1999).

Os dados sobre a prevalência da infecção por *H.pylori* em todo o mundo são bastante numerosos. Comunidades, grupos étnicos e etários são avaliados quanto ao nível de infecção (YAMAOKA *et al.*, 2002). Todavia, o tamanho das amostras examinadas em cada estudo, é bastante variável. Além de diferenças em relação ao número de pacientes investigados, observa-se que diferentes métodos são empregados nas análises relativas à determinação da infecção.

Cartágenes (2009) realizou um levantamento epidemiológico com crianças e para isto, utilizou amostras de sangue e fezes de 100 pacientes entre 2 e 12 anos, onde detectou anticorpos anti-*H.pylori* em 43% das amostras e antígenos da bactéria nas fezes de 54% das crianças avaliadas. Diferente do estudo realizado por Zaterka em 2007, no qual testes sorológicos foram utilizados para a detecção da infecção por *H.pylori* (Elisa) em amostras de doadores de sangue da cidade de São Paulo. Neste estudo foram examinados 1008 pacientes, independentemente de possuírem ou não algum desconforto gástrico e 65% deles teve teste sorológico positivo para *H.pylori*. Dong-Hong (2009) realizou estudo epidemiológico similar, porém utilizou 1029 amostras de biópsias gástricas coletadas entre os anos de 1990 e 2006. O método utilizado para a pesquisa da bactéria foi realizado através da coloração por prata do material biopsiado e cerca de 51% da população analisada apresentou infecção pela *H.pylori*.

Os métodos empregados para a detecção de *H. pylori* e a sensibilidade destes em relação ao tipo de material biológico reduzem a confiabilidade dos níveis de prevalência obtidos. Além disso, estudos nos quais os períodos de obtenção das amostras são consideravelmente prolongados, como no estudo realizado por Dong-Hong, na China, cujas amostras de biópsias gástricas foram coletadas durante 16 anos, não devem refletir o nível de prevalência da população estudada.

As amostras estudadas aqui foram obtidas a partir de pacientes que apresentavam algum tipo de desconforto gástrico, com diferentes graus de morbidade. Todos os pacientes, *H. pylori* positivos ou não, foram encaminhados por indicação médica ao exame endoscópico. Desse modo, a frequência de pacientes assintomáticos, não portadores de qualquer afecção gástrica foi consideravelmente menor do que aqueles portadores de alguma disfunção gástrica. Afinal, a investigação endoscópica não é indicada como exame clínico preventivo (DANI & CASTRO, 1993). Desse modo, podemos prever que o nível de prevalência da infecção por *H. pylori* nos indivíduos examinados no presente estudo, pode resultar em valores maiores do que a prevalência na população em geral.

A possibilidade de obtermos um número equivalente de amostras oriundas de pacientes com e sem desconforto gástrico, melhoraria a qualidade das nossas análises estatísticas, porém, isto não foi possível devido ao plano metodológico estabelecido em conformidade com os preceitos éticos da pesquisa envolvendo seres humanos. Ressaltamos que em nosso estudo não houve indicação para a realização de coletas, a não ser aquelas previamente resultantes de indicações clínicas.

A taxa de infecção média obtida para *H. pylori* encontrada no presente estudo (76,3%), embora elevada, é similar ao verificado em estudos anteriores, como o realizado por Makristathis e colaboradores na França (2004) que encontrou uma taxa de infecção de 78% utilizando a mesma metodologia. A elevada prevalência obtida entre os pacientes examinados neste estudo pode estar relacionada ao fato de que todos os pacientes apresentam algum tipo de afecção e também devido às condições sócio-econômicas da população analisada.

Diversos estudos procuram esclarecer as formas de contaminação pela *H.pylori*. As rotas mais prováveis de infecção são fecal-oral, oral-oral e gastro-oral, pois antígenos da bactéria têm sido detectados na cavidade oral, nas fezes e também em conteúdos de vômitos (LEUNG *et al.*, 2004; PARSONNET *et al.*, 2000). Entretanto, estes dados ainda são bastante controversos e não existe um consenso na literatura sobre a principal forma de contaminação. O fato de haver a possibilidade de contaminação fecal-oral justifica a elevada prevalência da infecção em países em desenvolvimento, uma vez que nestes a taxa de infecção pode atingir

cerca de 90% da população (ROCHA *et al.*, 1995). Isso reafirma a hipótese de que as populações humanas sujeitas às condições de saneamento básico precário apresentam maior probabilidade de infecção pela *H. pylori* (BRONW *et al.*, 2000).

A maior frequência de prevalência verificada em nosso estudo ocorreu em pacientes entre 26 e 35 anos de idade e a curva de distribuição nas faixas etárias indicou uma menor prevalência da infecção em pacientes com idade inferior a 18 anos. Portanto, há um significativo aumento do nível de infecção a partir de pacientes com idade superior a 18 anos. Admitimos que a parcela examinada da população no presente estudo é representativa do perfil sócio-econômico D e E, então o aumento verificado no nível de infecção de pacientes com mais de 18 anos de idade, pode indicar que a contaminação por *H. pylori* prossegue na população adulta. Essa evidência, ainda que indireta, contraria resultados obtidos em outros estudos que salientam que a contaminação é predominante na fase inicial da vida (CARTÁGENES *et al.*, 2009). Alguns estudos (ZHANG *et al.*, 2009; ZATERKA *et al.*, 2007) apresentam valores de prevalência semelhantes aos obtidos aqui, contudo reiteram a precocidade da infecção por *H. pylori*.

Desse modo, a infecção que muitas vezes tem início na infância se prolongará por toda a vida. O persistente quadro infeccioso exercido pela *H. pylori* em seres humanos pode indicar uma estabilidade adaptativa entre o “parasita” e o hospedeiro. Diversos estudos procuram considerar algumas associações hospedeiro-simbionte como um estado de equilíbrio, no qual as defesas imunológicas do hospedeiro são contidas, ao mesmo tempo que a agressão causada pelo microorganismo é minimizada ou até mesmo eliminada da associação (DESSAINT & CAPRON, 1993; DAMIAN, 1997). Desse modo, podemos compreender que em certas associações entre o hospedeiro e o microorganismo, estados patológicos poderiam surgir mediante alterações no equilíbrio adaptativo entre o hospedeiro e o simbiote. As alterações podem ser devidas a mudanças no metabolismo tanto do hospedeiro, quanto do simbiote durante o processo infeccioso (COMBES *et al.*, 1989). Outros estudos ressaltam a possibilidade de que cepas oportunistas ou variantes genéticas poderiam apresentar maior probabilidade de produzir modificações no equilíbrio adaptativo e assim provocar distúrbios na associação.

A partir dessas considerações procuramos verificar se a hipótese de que certas cepas de *H. pylori* portadoras de padrões alélicos específicos, ou combinações entre as sequências de diferentes *loci*, poderiam aumentar a probabilidade de desenvolvimento de quadros patológicos específicos nos hospedeiros humanos. Os *loci* selecionados para as nossas análises, a partir do genoma do microorganismo, foram baseados em estudos anteriores, que indicaram cepas mais agressivas ou correlacionadas aos maiores níveis de morbidade das afecções gástricas (RICCI *et al.*, 1996).

Além dos aspectos relacionados às variantes genéticas de *H. pylori*, incluímos também parâmetros relativos ao hospedeiro. As análises de correlação entre os diferentes padrões patológicos consideraram aspectos relativos à idade, ao sexo e a etnia dos pacientes. Entretanto, as análises efetuadas consideraram a possibilidade de que os fatores determinantes das patologias poderiam resultar da combinação entre fatores decorrentes do hospedeiro e de fatores decorrentes do microorganismo. Portanto, o modelo estatístico empregado, a regressão logística binária, para a análise de correlação multivariada, procurou correlacionar às combinações das variáveis com os quadros de afecção gástrica identificados entre os pacientes examinados.

Ao contrário do que tem sido frequentemente obtido em estudos epidemiológicos (MATTAR *et al.*, 2007), não verificamos correlações positivas entre a infecção por *H. pylori*, nem tampouco de qualquer variante genética da bactéria com grupos de pacientes portadores de patologias específicas. Exceto, para certas circunstâncias que analisaremos a seguir, o fator cuja correlação apresentou maior significância estatística está relacionado com certos aspectos do hospedeiro. Os resultados obtidos não são extraordinários, contudo questionam hipóteses, nas quais o microorganismo possui papel destacado como fator determinante dos distúrbios gástricos (WU *et al.*, 2005). Nossos resultados indicaram que a presença do microorganismo não constitui fator determinante da maioria das doenças observadas. A probabilidade preditiva obtida para pacientes portadores de *H. pylori* desenvolverem algum tipo de doença gástrica não foi significativamente diferente de

zero. Entretanto, alguns parâmetros do hospedeiro apresentaram-se significativamente relacionados aos distúrbios gástricos.

As seguintes patologias identificadas, úlcera, gastrite e esofagite foram correlacionadas de forma positiva com a idade do paciente e eventualmente com o gênero. Nessas patologias, verificamos que quanto maior a idade do paciente, maiores são as chances para o desenvolvimento das patologias gástricas. Esse fato é frequentemente mencionado em diferentes estudos. Manfredini (2010) e Carmolinga-Ponce (2008) relatam elevados índices de patologias gástricas em pacientes idosos, em especial, úlceras pépticas. Segundo esses autores, um dos fatores que justificam a relação entre a idade e a patologia gástrica, é o uso sistemático e intenso de medicamentos, em especial anti-inflamatórios, por pacientes mais velhos. Vale ressaltar que após os 60 anos, inicia-se um processo de atrofia gástrica, cuja etiologia ainda é bastante discutida. Alguns autores (KIM *et al.*, 2010) sugerem que a atrofia gástrica é o resultado do processo natural de envelhecimento, outros estudos associam a atrofia à infecção pela *H. pylori* (KARAMAN, *et al.*, 2008). Entretanto, observamos uma redução acentuada nos índices de infecção pela bactéria, após os 60 anos, os quais podem resultar da própria atrofia gástrica. Estudos relatam que a *H.pylori* utiliza-se da célula epitelial gástrica para extrair metabólitos, de modo que a hipotrofia desta reduz a oferta de nutrientes ao microorganismo (TAKEUCHI *et al.*, 2006).

Outras patologias (úlcera e pangastrite) foram correlacionadas positivamente com o sexo do hospedeiro, a maior probabilidade preditiva para o desenvolvimento de úlceras foi observada entre pacientes do sexo feminino. Resultado semelhante foi obtido por Manfredini (2010), o qual relatou a maior predisposição de mulheres para o desenvolvimento de úlceras, contudo não há indicações de quais os fatores envolvidos nessa correlação.

Relativo à correlação da virulência com as diferentes variantes gênicas de *H. pylori*, há relatos de cepas de *H. pylori* as quais foram propostas como causadoras de patologias severas no hospedeiro (ATHERTON *et al.*, 1995). Estas cepas são portadoras da inserção s1 (alelo s1) do loco *vacA* e a presença do gene *cagA*, o que poderia potencializar a ação patogênica da *H. pylori*.

No presente estudo, evidenciamos em diferentes amostras os fragmentos alélicos amplificados correspondentes aos *loci* “s”, “cagA” e “m”, os quais estão de acordo com os demais estudos que evidenciaram o produto amplificado desses alelos (LAGE *et al.*, 1995; COVACCI & RAPPUOLI, 1996; ATHERTON *et al.*, 1999; THOMAZINI *et al.*, 2006).

Verificamos a prevalência da cepa s1+ em 90% dos pacientes com úlcera péptica, similar ao descrito em outros estudos (THOMAZINI *et al.*, 2006; ASHOUR *et al.*, 2002; ATHERTON *et al.*, 1995). Entre os portadores de úlcera péptica, verificamos que os *loci* m1 e m2 possuem freqüências similares de prevalência, igualmente distribuídos em 45% dos pacientes examinados, sendo que 10% dos pacientes eram portadores de ambos os *loci* m1 e m2, o que indica uma possível infecção múltipla por duas cepas distintas de *H.pylori*. Resultado similar foi relatado por Yakoob *et al.* (2009). O *loci* cagA apresentou positividade em 70% dos pacientes (ARGENT *et al.*, 2008; MATTAR *et al.*, 2007). A tabela 11 apresenta uma comparação entre as freqüências de cada *loci* observada neste estudo com resultados obtidos em outros estudos.

A freqüência obtida dos alelos estudados foi similar com os estudos realizados por Ghose (2005) na Venezuela. Nimri (2006) relatou uma freqüência maior do *loci* s2 o que difere substancialmente dos resultados obtidos neste estudo, além de uma freqüência significativamente menor do *loci* marcador cagA em seus pacientes. A comparação de nossos resultados com aqueles de Wong (2001), também foram substancialmente diferentes. A prevalência do *loci* s1 (59%) e do *loci* cagA (45%) entre os pacientes examinados neste estudo diferem daqueles relatados por Wong 96% e 89%, respectivamente.

Tabela 11: Prevalência de cepas de *Helicobacter pylori* em diferentes países.

<i>Loci</i>	Resultados			
	HCLMP (Mogi das Cruzes)	Jordânia (NIMRI <i>et al</i> , 2006)	Venezuela (GHOSE <i>et al</i> , 2005)	Hong-Kong (WONG <i>et al</i> , 2001)
	n=87	n=110	n=121	n=72
VacA-s1	0,59	0,45	0,53	0,96
VacA-s2	0,41	0,55	0,47	0,04
VacA-m1	0,36	0,49	0,40	0,32
VacA-m2	0,59	0,51	0,60	0,64
CagA+	0,45	0,26	0,61	0,89

Embora o *loci s1* se apresente prevalente nos pacientes estudados, não houve correlação positiva deste como a maioria das patologias analisadas, exceto para a análise agrupada das patologias ulcerativas (úlceras, gastrite e pangastrite agrupadas; $p=0,046$) e para a úlcera péptica ($p=0,002$). Para todas as demais patologias (gastrite, pangastrite, bulbite, esofagite e pólipos) o *loci s1* não apresentou significância estatística e nem ao menos a capacidade preditiva para a presença do *loci* foi significativa para as afecções relatadas anteriormente.

Resultado similar foi obtido para a prevalência do *loci m1* e as múltiplas afecções. Entretanto, alguns autores relatam a importância desse *loci*, o qual frequentemente foi relacionado com o potencial de patogenicidade das cepas de *H.*

pylori (AVILES-JIMENEZ *et al.*,2004). A prevalência dos *loci* *s2* e *m2* também não apresentaram correlação significativa com nenhuma das patologias estudadas.

O marcador da ilha de patogenicidade *cagA* quando presente, está associado a síntese de uma proteína (citotoxina associada ao gene *A*) que aumenta o poder de patogenicidade da *H.pylori* e por esta razão, as cepas *cagA* + são descritas como mais patogênicas do que as cepas *cagA* - (CENSINI *et al.*, 1996). Em nosso estudo, a presença do *loci cagA* no genoma das cepas identificadas em biopsias de pacientes com o desenvolvimento de patologias ulcerativas foi estatisticamente significante ($p=0,016$). O que confirmou os resultados obtidos nos estudos relatados acima. Entretanto, a análise das patologias ulcerativas (úlcera, gastrite e pangastrite) isoladamente indicaram significância da capacidade preditiva desse alelo, apenas em relação aos portadores de úlcera ($p=0,013$). De acordo com nossos resultados, a presença do *loci cagA* no genoma do microorganismo indica uma chance de 6,24% maior de desenvolver úlcera péptica do que na ausência deste. Para a bulbite, a esofagite e o pólipos, o marcador *cagA* não indicou capacidade preditiva significativamente diferente de zero.

A presença da *H. pylori* não foi determinante para a maioria das patologias analisadas, apenas apresentou significância entre aquelas aqui denominadas de patologias ulcerativas ($p = 0,004$). Este efeito pode ser justificado pela quantidade de pacientes portadores da bactéria sem que estes apresentassem sinais específicos de alguma patologia gástrica. Estudos clínicos frequentemente precipitam suas conclusões, devido a análises estatísticas parciais (PROUZET-MAULE, *et al.*, 2005). A elevada prevalência do microorganismo, ou de uma variante alélica entre aqueles pacientes portadores de algum distúrbio não evidencia necessariamente a correlação entre as duas variáveis. É necessário verificar a hipótese alternativa, ou seja, se há significativa prevalência do microorganismo em pacientes não portadores de distúrbios gástricos.

Nossos resultados indicaram que não é apenas a presença da *H.pylori* a única responsável pelo desenvolvimento de patologias como gastrite, úlcera, pangastrite ou esofagite. Do mesmo modo que, alguns dos *loci* avaliados não respondem sozinhos como fatores diretamente relacionados ao surgimento das

patologias. É possível que para o desenvolvimento de qualquer uma das patologias citadas, seja necessária uma combinação de elementos, alguns relacionados à *H.pylori* e principalmente alguns elementos relacionados ao hospedeiro. Nesse estudo, avaliamos três fatores relacionados ao hospedeiro: idade, etnia e sexo dos pacientes, contudo é possível que outros aspectos não considerados aqui tenham igual ou maior relevância, tais como os hábitos alimentares, o tabagismo, o etilismo, certos metabólicos e fatores genéticos do hospedeiro.

Outros *loci* além daqueles estudados aqui, têm sido relatados como associados ao desenvolvimento de patologias gástricas específicas. É o caso do *ulcer promoting gene A* (*dupA*), o qual é indicado como um fator associado a úlceras duodenais (LU *et al.*, 2005). Outro marcador da ilha de patogenicidade, o *cagE*, tem sido proposto como elemento responsável pela elevação no nível de produção de interleucina 8 pelo epitélio gástrico, o que poderia estimular a migração de neutrófilos para o local, favorecendo a atividade inflamatória (ARGENT, *et al.*, 2008); o *cagE* pode estar presente no genoma mesmo na ausência do marcador *cagA* (QUEIROZ, *et al.*, 1998). Outro gene da *H. pylori* denominado *induced by contact with epithelium* (*iceA*) tem a sua expressão associada à úlcera péptica e ao câncer gástrico (CANER, *et al.*, 2007). Possivelmente, esses *loci* tenham papéis importantes no desenvolvimento de diversas patologias, principalmente se somados aos fatores avaliados neste estudo.

Embora a fisiopatologia do produto gênico dos *loci cagA* e *vacA* estejam bem estabelecidas (KUSTERS, *et al.*, 2006; COVER, *et al.*, 2005; SILVEIRA, *et al.*, 2005), ainda há desconhecimento sobre os mecanismos desencadeadores da agressão.

Nossas análises indicaram que não houve combinações entre elementos do hospedeiro e da bactéria que tenham significativa capacidade preditiva para qualquer uma das afecções gástricas. Associações positivas foram verificadas entre alguns fatores isolados e algumas patologias específicas. Esses resultados parecem indicar a existência de uma complexa combinação de fatores muito além daqueles considerados aqui ou em outros estudos. Rejeitamos a perspectiva de que um ou poucos elementos estejam envolvidos no desencadeamento das patologias

gástricas. Principalmente porque a associação entre a bactéria *H. pylori* e o ser humano constitui um exemplo de associação duradoura e que durante a maior parte desse tempo não há evidências de distúrbios importantes.

Em razão da ausência de indicadores gênicos que evidenciassem o desenvolvimento de patologias específicas procuramos verificar a hipótese de que a densidade bacteriana poderia estar relacionada com o desenvolvimento patológico. Consideramos que o eventual aumento da população no ambiente gástrico do paciente poderia prenunciar o surgimento de um distúrbio gástrico. Para tanto, desenvolvemos no presente estudo um protocolo para a quantificação da população bacteriana a partir de biopsias gástricas.

A aplicação da metodologia de amplificação em sistema qPCR, diferentemente do PCR convencional, depende da especificidade do produto amplificado. O nível de fluorescência emitida pela amostra, à medida que o número de cópias do DNA-alvo se eleva, é utilizado como parâmetro quantitativo da amostra original. Entretanto, o sistema não é capaz de diferenciar produtos amplificados diferentes em um mesmo ciclo de amplificações, devido às diferenças de temperatura de melting de cada produto (RADONIC *et al.*, 2004). Inicialmente, nossos experimentos objetivaram a determinação da sequência-alvo que apresentasse as condições necessárias de especificidade e unicidade para a correlação direta desta com o tamanho (densidade) da população de *H. pylori* em amostras de biopsias. Verificamos que a sequência relativa ao *loci m1* do *locus vacA* constituiu-se em um marcador adequado para ser utilizado em procedimentos de PCR quantitativo. Entretanto, limitado aos pacientes portadores de cepas m1+ de *H. pylori*. Futuros experimentos poderão identificar outros marcadores, os quais possam ser utilizados para as diferentes cepas do microorganismo.

A seguir procuramos verificar a hipótese da existência de variações significativas na densidade bacteriana de acordo com diferentes patologias gástricas. Estudo similar foi realizado por Molnar (2008). Todavia, um estudo realizado por Dunn *et al.* (1997) indicou que uma parcela das *H. pylori* que colonizam a mucosa, morrem e liberam enzimas urease para o uso das *H. pylori*

remanescentes. Em razão disso, esses autores propuseram que uma densidade bacteriana estável deve ser mantida na mucosa gástrica infectada.

Em nosso estudo verificamos que há variação significativa da densidade bacteriana em pacientes que apresentam diferentes patologias gástricas, o que contrariou o estudo anterior.

Identificamos uma densidade bacteriana elevada em todos os indivíduos portadores de úlcera, gastrite e esofagite. Uma possível relação entre a elevada densidade bacteriana em portadores de úlcera péptica foi proposta por Bittencourt *et al.* (2006). Segundo esses autores, os microorganismos aumentam em número, devido à maior adesão destes às células epiteliais gástricas, pois não há quantidade de muco suficiente para proteção das células.

Em indivíduos portadores de gastrite houve discreta variação na densidade bacteriana entre os indivíduos examinados. Neste caso, o estado inflamatório da mucosa pode variar de leve até enantematosa, a qual correspondente a uma gastrite mais severa (MAGALHÃES *et al.*, 2005). Uma vez que a *H. pylori* necessita de uma resposta inflamatória para poder aderir-se com maior facilidade à mucosa, isto pode justificar a variação da densidade bacteriana obtida, em indivíduos com essa patologia.

Verificamos que no indivíduo portador de metaplasia intestinal o valor da densidade bacteriana apresentou-se reduzido em relação a todas as demais patologias analisadas. *H. pylori* é caracterizada como agente carcinogênico do tipo I (PARSONNET *et al.*, 1993), no entanto, não há relatos na literatura sobre densidade bacteriana em indivíduos com metaplasia.

Os experimentos realizados no presente estudo tiveram sucesso na elaboração de um protocolo experimental bem como na identificação e a seleção de marcadores para a análise quantitativa de *H. pylori* através do sistema qPCR.

Evidenciamos significativa variação da densidade bacteriana em diferentes pacientes portadores de afecções gástricas. Naqueles distúrbios caracterizados pela

existência de um foco inflamatório ou ulceração da mucosa gástrica, evidenciamos significativo aumento da população do microorganismo nas biopsias examinadas. Entretanto, desconhecemos os fatores que precedem o aumento da população de bactérias e se há relação direta desta última como o distúrbio gástrico. Todavia, é promissora a hipótese de que variação da densidade bacteriana possa constituir um indicador fisiopatológico. O mesmo não foi verificado para a identificação de linhagens específicas do microorganismo, em relação aos *loci* marcadores selecionados no presente estudo. Embora, correlações positivas entre certos marcadores alélicos e determinadas patologias foram identificadas, houve considerável distribuição dos fatores correlatos entre os parâmetros do hospedeiro e do microorganismo

A associação entre a bactéria *H. pylori* e o ser humano parece caracterizar-se por uma interação estável e duradoura, cujos distúrbios dependam, sobretudo de desequilíbrios complexos e ocasionais.

6. CONCLUSÕES

- Há um elevado nível de prevalência de *Helicobacter pylori* entre os pacientes atendidos no setor de Endoscopia do Hospital Luzia de Melo Pinho;
- A *H.pylori* está presente em indivíduos sem afecções gástricas;
- A maior prevalência ocorreu em pacientes com idade entre 26 e 36 anos;
- Não existe diferença entre os níveis de prevalência em diferentes etnias ou entre os sexos;
- Cepas *s1+* e *m2+* foram aquelas que apresentaram maior prevalência na população examinada;
- A sequencia *s1* significativa capacidade preditiva para o desenvolvimento de úlcera, gastrite e esofagite;
- O marcador da ilha de patogenicidade *cagA* tem significativa capacidade preditiva apenas para o desenvolvimento de úlcera;
- Fatores relacionados ao hospedeiro como idade e gênero apresentaram a maior probabilidade preditiva para o desenvolvimento de várias das patologias gástricas estudadas;
- Para o desenvolvimento de afecções gástricas é necessária uma combinação de fatores relacionados ao paciente e à bactéria;
- Existe variação na densidade bacteriana de acordo com a patologia desenvolvida;
- O alelo *m1* constitui marcador apropriado para a determinação da densidade relativa de populações de *H.pylori* em sistema experimental qPCR.

7. REFERÊNCIAS

AGUILAR, G.R.; AYALA, G; FIERROS-ZÁRATE, G. *Helicobacter pylori*: Recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. **Salud Pública México** 43(3):237-247, Maio-Junho 2001.

ALBERTSON, N.; WENNGREN, I.; SJOSTROM, J.E. Growth and Survival of *Helicobacter pylori* in Defined Medium and Susceptibility to Brij 78. **Journal of Clinical Microbiology**, 36(5):1232–1235, Maio 1998.

ALMEIDA, C.R.P.; ALVES, F.P.; ROCHA, A.M.; ROCHA, G.A.; CAMARGO, L.M.; NOGUEIRA, P.O.; CAMARGO, E.P.; QUEIROZ, D.M. Prevalence and risk factors associated with *Helicobacter pylori* infection in native populations from Brazilian Western Amazon. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, 97(4):382-6, 2003.

ANDERI, J.R.E.; PESSOTTI, J.R.D.; XIMENES, C.F.; RIO, J.C.E. Presença do *Helicobacter pylori* em sítios extraesofágicos. **Revista Brasileira de Medicina**, 59(1/2):69-72, 2002.

ARGENT, R.H.; THOMAS, R.J.; LETLEY, D.P.; RITTIG, M.G.; HARDIE, K.R.; ATHERTON, J.C. Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors VacA and CagA. **Journal of Medical Microbiology**, 57:145–150, 2008.

ASHOUR, A.A.R.; et al. Associação entre cagA e alelos do vacA de *Helicobacter pylori* e úlcera duodenal em crianças no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 38(2):79-85, 2002.

ASHOUR, A.A.R. et. al. iceA Genotypes of *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Brazilian Children and Adults. **Journal of Clinical Microbiology**, 39:1746-1750, Agosto 2001.

ASQAH, A.M.; HAMOUDI, A.N.; ANIL, S.; JEBREEN, A.A.; AL-HAMOUDI, W.K. Is the presence of *Helicobacter pylori* in dental plaque of patients with chronic

periodontitis a risk factor for gastric infection? **Canadian Journal of Gastroenterology**, 23(3): 177-9, 2009.

ASSUMPÇÃO, M.B.; MARTINS, L.C.; MELO, B.H.P.; BARILE, K.A.S.; ALMEIDA, S.S.; ASSUMPÇÃO, P.P.; CORVELO, T.C.O. *Helicobacter pylori* in dental plaque and stomach of patients from Northern Brazil. **World Journal of Gastroenterology**, 16(24): 3033-3039, Junho 2010.

ATHERTON, J.C.; BLASER, M.J. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. **Journal of Clinical Investigation**, 119:2475–2487, Setembro 2009.

ATHERTON, JC; CAO, P; PEEK JR, RM; TUMMURU, MK; BLASER, MJ; COVER, TL. Mosaicism in vacuolations alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. **The Journal of Biological Chemistry**, 270:17771-17777, 1995.

AVILES-JIMENEZ, F.; LETLEY, D.P.; GONZALEZ-VALENCIA, G.; SALAMA, N.; TORRES, J.; ATHERTON, J.C. Evolution of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin in a Human Stomach. **Journal of Bacteriology**, 186:5182–5185, Agosto 2004.

AZEVEDO, NF; ALMEIDA, C; CERQUEIRA, S; DIAS, C; KEEVIL, W; VIEIRA, MJ. Coccoid Form of *Helicobacter pylori* as a Morphological Manifestation of Cell Adaptation to the Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, 73:3423 – 3427, 2007.

BLASER, M.J.; ATHERTON, J.C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **Journal of Clinical Investigation**, 113:321–333, 2004.

BANATVALA, N. et al. 1993. The cohort effect and *Helicobacter pylori*. **Journal of Infection Disease**, 168:219–221, 1993.

BLUM, G.; OTT, M.; LISCHEWSKI, A.; RITTER, A.; IMRICH, H.; TSCHÄPE, H.; HACKER, J. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-

specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. **Infection and Immunity**, 62:606–614, Fevereiro 1994.

BITTENCOURT, P.F.; ROCHA, G.A.; PENNA, F.J.; QUEIROZ, D.M. Gastroduodenal peptic ulcer and *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. **Jornal de Pediatria**, 82:325-34, 2006

BODE, G.; MAUCH, F.; MALFERTHEINES, P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. **Epidemiology and Infection**, 111: 483-490, 1993.

BROWN, L.M. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. **Epidemiology Review**, 22(2), 2000.

BRZOZOWSKA, I.; PTAK-BELOWSKA, A.; PAWLIK, M.; PAJDO, R.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK S.J.; PAWLIK, W.W.; BRZOZOWSKI, T. Mucosal Strengthening Activity of Central and Peripheral Melatonin in the Mechanism of Gastric Defense. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 60(7):47-56, Dezembro 2009.

CALVINO-FERNÁNDEZ, M.; PARRA-CID, T. H. pylori and mitochondrial changes in epithelial cells. The role of oxidative stress. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, 102(1):41-50, 2010.

CANER, V.; YILMAZ, M.; YONETCI, N.; ZENCIR, S.; KARAGENC, N.; KALELI, I.; BAGCI, H. *H pylori iceA* alleles are disease-specific virulence factors. **World Journal of Gastroenterology**, 14; 13(18): 2581-2585, Maio 2007.

CARNIEL, E.; GUILVOLT, I.; PRENTICE, M. Characterization of a large chromosomal “high-pathogenicity island” in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Bacteriology**, 178:6743-6751, 1996.

CARTÁGENES, V.D.; MARTINS, L.C.; CARNEIRO, L.M.; BARILE, K.A.S.B.; CORVELO, T.C.C. *Helicobacter pylori* em crianças e associação de cepas CagA na transmissão mãe-filho na Amazônia brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42(3):298-302, 2009.

CECI, P.; MANGIAROTTI, L.; RIVETTI, C.; CHIANCONE, E. The neutrophil-activating Dps protein of *Helicobacter pylori*, HP-NAP, adopts a mechanism different from *Escherichia coli* Dps to bind and condense DNA. **Nucleic Acids Research** 35(7) 2247–2256, Março 2007.

CENSINI, S. et al. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proceedings of National Academy of Science**, 93:14648-53, 1996.

COMBES, C. When is a parasite a pathogen? In Pathology in marine aquaculture (eds T.C. Cheng and F. O. Perkins). **Academy Press**, New York, 1989.

CORRAR, L.J. et al. Análise Multivariada: para os cursos de Administração, Ciências Contábeis e Economia. Atlas 5:280-330, 2009.

COVER, T.L.; BLANKE, S.R. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. **Nature Reviews of Microbiology**. 3:320-32, Janeiro 1995.

COVER, TL; BLASER, NJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. **The Journal of Biological Chemistry**, 267:10570-10575, 1992.

COVER, T.L.; BLANKE, S.R. *Helicobacter pylori* vacA, a paradigm for toxin multifunctionality. **Nature Microbiology** AOP, published online 10 March 2005; doi:10.1038/nrmicro1095e Reviews.

CZENIKIEWCZ-GUZIŁ, M.; KARCZEWSKA, E.; BIELANSKI, W.; GUZIŁ, T.J.; KAPERA, P.; TARGOSZ, A.; KONTUREK, S.J.; LOSTER, B. Association of the presence the *Helicobacter pylori* in the oral cavity and in the stomach. **Journal of physiology and pharmacology**, 55(2):105-115, 2004.

DAMIAN, R.T. Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. **Parasitology** 115:S169-S175, 1997.

DONG-HONG, Z.; LI-YA, Z.; SAN-REN, L.; SHI-GANG, D.; YONG-HUI, H.; FANG, G.; LI, Z.; YUAN, L.; RONG-LI, C.; LING-MEI, M.; XIU-E, Y.; JING, Z. Recent changes in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection among children and adults in high- or low-incidence regions of gastric cancer in China. **Chinese Medical Journal** 122(15):1759-1763, 2009.

DUNN, B.E.; VAKIL, N.B.; SCHNEIDER, B.G.; MILLER, M.M.; ZITZER, J.B.; PEUTZ, T.; PHADNIS, S.H. Localization of *Helicobacter pylori* Urease and Heat Shock Protein in Human Gastric Biopsies. **Infection and Immunity**. 1181-1188, Abril 1997

EATON, K.A.; DEWHIRST, F.E.; RADIN, M.J.; FOX, J.G.; PASTER, B.J.; KRAKOWKA, S.; MORGAN, D.R. *Helicobacter acinonyx* sp. nov., isolated from cheetahs with gastritis. **International Journal of Systematical Bacteriology**, 43(1):99-106, 1993.

EVANS JR., D.J et al. Characterization of *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. **Infection and Immunity**, 63(6): 2213-20, Junho 1995.

FIEDOREK, S.C; MALATY, H.M; EVANS, D.L; PUMPHREY, C.L; CASTEEL, H.B; EVANS, D.J-JR; GRAHAM, D.Y. Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. **Pediatrics**, 88:578-82, 1991.

FISCHER, W; JU"RGEN, P.L; BUHRDORF, R; GEBERT, B; ODENBREIT, S; HAAS, R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for cagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. **Molecular Microbiology**, 42:1337-1348, 2001.

FOX, J.G.; BOUTIN, S.R.; HANDT, L.K.; TAYLOR, N.S.; XU, S.; RICKMAN, B.; MARINI, R.P.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; MOTZEL, S.; KLEIN, H.J. Isolation and Characterization of a Novel *Helicobacter* Species, "*Helicobacter macacae*," from Rhesus Monkeys with and without Chronic Idiopathic Colitis. **Journal of Clinical Microbiology**, 45(12): 4061-4063, 2007.

FOX, J.G.; SHEN, Z.; XU, S.; FENG, Y.; DANGLER, C.A.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; CULLEN, J.M. *Helicobacter marmotae* sp. nov. Isolated from Livers of Woodchucks and Intestines of Cats. **Journal of Clinical Microbiology**, 40(7): 2513-2519, 2002.

FOX, J.G.; YAN, L.L.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; SHAMES, B.; MURPHY, J.C.; HAYWARD, A.; BELCHER, J.C.; MENDES, E.N. *Helicobacter bilis* sp. nov., a Novel *Helicobacter* Species Isolated from Bile, Livers, and Intestines of Aged, Inbred Mice. **Journal of Clinical Microbiology**, 33(2): 445–454, 1995.

FOX, J.G. Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 2:93-103, 1995.

FOX, J.G.; DEWHIRST, F.E.; TULLY, J.G.; PASTER, B.J.; YAN, L.; TAYLOR, N.S.; COLLINS, M.J. JR., GORELICK, P.L.; WARDS, J.M. *Helicobacter hepaticus* sp. Nov., a Microaerophilic Bacterium Isolated from Livers and Intestinal Mucosal Scrapings from Mice. **Journal of Clinical Microbiology**, 32(5): 1238-1245, 1994.

FRANKLIN, C.L.; BECKWITH, C.S.; LIVINGSTON, R.S.; RILEY, L.K.; GIBSON, S.V.; BESCH-WILLIFORD, C.L.; HOOK, R.R. JR. Isolation of a Novel *Helicobacter* Species, *Helicobacter cholecystus* sp. nov., from the Gallbladders of Syrian Hamsters with Cholangiofibrosis and Centrilobular Pancreatitis. **Journal of Clinical Microbiology**, 34(12): 2952–2958, 1996.

GEBOES, K.; DEKKER, W.; MULDER, C.J.J.; NUSTELING, K. Long-term lansoprazole treatment for gastro-oesophageal reflux disease: clinical efficacy and influence on gastric mucosa. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 15: 1819-1826, 2001.

GHOSE, C; PEREZ, GIP; VAN DOORN, LJ; BELLO, MGD; BLASER, MJ. High Frequency of Gastric Colonization with Multiple *Helicobacter pylori* Strains in Venezuelan Subjects. **Journal of Clinical Microbiology**, 43(6):2635-2641, 2005.

GOODWIN CS; ARMSTRONG JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). **European Journal of Clinical Microbiology**, 9:1-13,1990.

GOTO, K.; OHASHI, H.; EBUKURO, S.; ITOH, K.; TOHMA, Y.; TAKAKURA, A.; WAKANA, S.; ITO, M.; ITOH, T. Isolation and characterization of *Helicobacter* species from the stomach of the house musk shrew (*Suncus murinus*) with chronic gastritis. **Current Microbiology**, 37(1):44-51, Julho 1998.

GRAHAM, D.Y; MALATY, H.M; GO, M.F. Are there susceptible host to *Helicobacter pylori* infection? **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, 29 Suppl 205:6-10, 1994.

GRAHAM, D.Y; MALATY, H.M; EVANS, D.G; EVANS, D.J.-JR; KLEIN, P.D; ADAM, E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in asymptomatic population in the United States. **Gastroenterology**, 100:1495-501, 1991.

GUANG, W.; DING, H.; CZINN, S.J.; KIM, K.C.; BLANCHARD, T.G.; LILLEHOJ, E.P. Muc1 Cell Surface Mucin Attenuates Epithelial Inflammation In Response to a Common Mucosal Pathogen. **JBC Papers in Press**. Published on April 29 as Manuscript M110.121319, 2010.

HACKER, J.; CARNIEL, E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. **EMBO reports**, 51(2):376-381, 2001.

HAJJ, I.I.; HAWCHAR, M.; SOWEID, A.; MAASRI, K.; TAWIL, A.; BARADA, K.A. Giant sporadic fundic gland polyp: Endoscopic and endosonographic features and management **World Journal of Gastroenterology**, 14(42): 6593-6595, Novembro 2008.

HAMMAR, M; TYSKIEWICZ, T; WADSTRON, T; O'TOOLE, P.W. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, 30:54-58, 1992.

HANDT, LK; FOX, JG; DEWHIRST, FE; FRASER, GJ; PASTER, BJ; YAN, LL. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. **Infection and Immunology**, 62:2367-74, 1994.

HIRATA, Y.; MAEDA, S.; MITSUNO, Y. *Helicobacter pylori* CagA protein activates serum response element – driven transcription independently of tyrosine phosphorylation. **Gastroenterology**, 123(6):1962-71, 2002.

HOCHHUT, B.; JAHREIS, K.; LENGELER, J.W.; SCHMID, K. CTNSCR94, a conjugative transposon found in enterobacteria. **Journal of Bacteriology**, 179, 2097–2101, 1997.

ILVER, D.; ARNQVIST, A.; OGREN, J.; FRICK, I.M.; KERSULYTE, D.; INCECIK, E.T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood antigens revealed by retagging. **Science**, 279:373-7, 1998.

ISHIDA, Y; GOTO, Y; KONDO, T; KURATA, M; NISHIO, K; KAWAI, S; OSAFUNE, T; NAITO, M; HAMJIMA, N. Eradication rate of *Helicobacter pylori* according to genotypes of CYP2C19,IL-1B, and TNF-A. **International Journal of Medical Science**, 3:135-140, 2006.

JEON, W.; YUN, Y.; PARK, J.; LEE, Y.; SEONG, J. Isolation of urease positive *Helicobacter spp* from *Apodemus agrarius*. **Journal of the Korean Society of Microbiology**, 35(5):354-354, Outubro 2000.

JUNG, H.; CHOUNG, R.S.; TALLEY, N.J. Gastroesophageal Reflux Disease and Sleep Disorders: Evidence for a Causal Link and Therapeutic Implications. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, 16(1), Janeiro 2010.

KAGUE, E.; THOMAZINI, C.M.; PARDINI, M.I.C.M.; CARVALHO, F.; LEITE, C.V.; PINHEIRO, N.A. Methylation status of CDH1 gene in samples of gastric mucous from Brazilian patients with chronic gastritis infected by *Helicobacter pylori* **Arquivos de Gastroenterologia**, 47(1):7-12, 2010

KARAMAN, A.; BINICI, D.N.; KABALAR, M.E.; DURSUN, H.; KURT, A. Alteration of sister chromatid exchange frequencies in gastric cancer and chronic atrophic gastritis patients with and without *H pylori* infection. **World Journal of Gastroenterology** 14(16): 2534-2539, Abril 2008.

KAUSER,F; KHAN, AA; HUSSAIN, MA; CARROLL, MI; AHMAD, M; TIWARI, S; SHOUCHE. Y; DAS,B; ALAM, M; ALI, M; HABIBULLAH, M; SIERRA, R; MEGRAUD, F; SECHI, LA; AHMED, N. The *cag* Pathogenicity Island of *Helicobacter pylori* is Disrupted in the Majority of Patients Isolates from Different Human Populations. **Journal of Clinical Microbiology**, 42:5302-5308, 2004.

KIM, Y.J.; CHUNG, J.W.; LEE, S.J.; CHOI, K.S.; KIM, J.H.; HAHM, K.B.; Progression from Chronic Atrophic Gastritis to Gastric Cancer; Tangle, Toggle, Tackle with Korea Red Ginseng. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, 46(3): 195–204, Maio 2010.

KODAIRA, M.S; ESCOBAR, A.N.U; GRISI,S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. **Revista de Saúde Pública**, 36(3):356-69, 2002.

KORWIN, J.D. Advantages and limitations of diagnostic methods for *H. pylori* infection. **Gastroenterology Clinical and Biology**, 27:380-90, 2003.

KUSTERS, J.G.; VAN VLIET, A.H.M.; KUIPERS, E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, 19 (3): 449-450, 2006.

LADEIRA, M.S.P.; SALVADORI, D.M.F.; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 39(4), 2003

LEE, A. et al. *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 42(1):27-36, 1992.

LEUNG, W.K.; SIU, K.L.K.; KWOK, C.K.L.; CHAN, S.Y.; SUNG, R.; SUNG, J.J.Y. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. **The American Journal of Gastroenterology**, 94:2881-2884, 2004.

LI, Z.; WU, Y.; SUN, Y.; LIU, L.; TIAN, M.; FENG, G.; YOU, W.; LI, J. Inflammatory cytokine gene polymorphisms increase the risk of atrophic gastritis and intestinal metaplasia. **World Journal of Gastroenterology**, 16(14): 1788-1794, 2010.

LOPES, A; JARBRINQ, MQ; PALHA, A; RUIVO, J; MONTEIRO, L; OLEASTRO, M; SANTOS, A; FERNANDES, A. Citokine Expression in Pediatric *Helicobacter pylori* Infection. **Clinical and Diagnostic Laboratorial Immunology**, 12:994-1002, 2005.

LOSTER, B.W.; MAJEWSKI, S.W.; CZE.NIKIEWICZ-GUZIK, M.; BIELANSKI, W.; PIERZCHALSKI, P.; KONTUREK, S. J. The relationship between the presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric in the somach. **Journal of physiology and pharmacology**, 57(3):91-100, 2006.

LU, H.; HSU, P.I.; GRAHAM, D.Y.; YAMAOKA, Y. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, 128:833-48, Outubro 2005.

LYRA, A.C. et al. Seroprevalence and Risk Factors associated with *Helicobacter pylori* Infection in Blood Donors in Salvador, Northeast-Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 7(5):339-345, 2003.

MABE, K.; TAKAHASHI, M.; OIZUMI, H.; TSUKUMA, H.; SHIBATA, A.; FUKASE, K.; MATSUDA, T.; TAKEDA, H.; KAWATA, S. Does *Helicobacter pylori* eradication therapy for peptic ulcer prevent gastric cancer? **World Journal of Gastroenterology**, 15(34): 4290-4297, 2009.

MACHIDA, M. A; SASAZUKI, S; INOUE, S; NATSUKAWA, S; SHAURA, K; KOIZUMI, Y; KASUGA, Y; HANAOKA, T; TSUGANE, S. Association of *Helicobacter pylori* infection and environmental factors in non-cardia gastric cancer in Japan. **Gastric Cancer**, 7:46–53, 2004

MAGALHÃES, A.F.; CORDEIRO, F.T.; QUILICI, F.A.; MACHADO, G.; AMARANTE, H.M.; PROLLA, J.C. et al. SOBED – Endoscopia digestiva Diagnóstico e Terapêutica. 4ª ed. São Paulo: Revinter; 2005

MAGALHÃES, A.F.N. Úlcera péptica. **Revista Brasileira de Medicina**, 57(11):1203-04, 2000.

MAKRISTATHIS, A.; HIRSCHL, A.M.; LEHOURS, P.; MÉGRAUD, F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, 9(1), Setembro 2004

MANFREDINI, R.; GIORGIO, R.; SMOLENSKY, M.H.; BOAR, B.; SALMI, R.; FABBRI, D.; CONTATO, E.; SERRA, M.; BARBARA, G.; STANGHELLINI, V.; CORINALDESI, R.; GALLERANI, M. Seasonal pattern of peptic ulcer hospitalizations: analysis of the hospital discharge data of the Emilia-Romagna region of Italy. **BMC Gastroenterology**, 10:37, 2010.

MARSHALL, B.J.; WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, 16;1(8390):1311-5, Junho 1984.

MARTINEZ, JG; Caracterización molecular de cepas de *Helicobacter pylori*. Reproducción del modelo animal en ratones y estudio de los mecanismos de la inflamación. Tese de Doutorado, 2-51, 2001.

MARTINS, LC; CORVELO, TCO; DEMCHKI,S; ARAUJO, MTF; ASSUMPÇÃO, MB; VILAR, SCAJ; FREITAS, FB; BARBOSA, HPMB; FECURY, AA; AMARAL, RKC; SANTOS, SEB. Clinical and pathological importance of vacA allele heterogeneity and cagA status in peptic ulcer disease in patients from North Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100(6):875-881, 2005.

MATTAR, R.; MARQUES, S.B.; MONTEIRO, 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. **Journal of Medical Microbiology**, 56: 9–14, 2007.

McNULTY, C.A.M.; DENT, J.C.; CURRY, A.; UFF, J.S.; FORD, G.A.; GEAR, M.W.L.; WILKINSON, S.P. New spiral bacterium in gastric mucosa. **Journal of Clinical Pathology**, 42:585-591, 1989.

MELITO, P.L.; MUNRO, C.; CHIPMAN, P.R.; WOODWARD, D.L.; BOOTH, T.F.; RODGERS, F.G. *Helicobacter winghamensis* sp. nov., a Novel *Helicobacter* sp. Isolated from Patients with Gastroenteritis. **Journal of Clinical Microbiology**, 39(7): 2412–2417, 2001.

MENDALL MA, NORTHFIELD TC. Transmission of *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, 37:1-3, 1995.

MENDES, E.N.; QUEIROZ, D.M.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; MOURA, S.B.; FOX, J.G. *Helicobacter trogontum* sp. nov., isolated from the rat intestine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, 46(4):916-21, 1996.

MEYER-TER-VEHN, T; COVACCI, A; KIST, M; PAHL, H.L. *Helicobacter pylori* activates MAP kinase cascades and induces expression of the protooncogenes c-fos and c-jun. **The Journal of Biological Chemistry**, 275:16064–16072, 2000.

MIWA, H; GO, M.F; SATO, N. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: the Asian enigma. **American Journal of Gastroenterology**, 97:1106–1112, 2002.

MILLER, M.L.; ANDRINGA, A.; ZAVROS, Y.; BRADFORD, E.; SHULL, G.E. Volume Density, Distribution, and Ultrastructure of Secretory and Basolateral Membranes and Mitochondria Predict Parietal Cell Secretory (Dys)function. **Journal of Biomedical and Biotechnology**, Article ID 394198, 2010.

MÓDENA, J.L.P.; ACRANI, G.O.; MICAS, A.F.D.; CASTRO, M.; SILVEIRA, W.D.; OLIVEIRA, R.B.; BROCCHI, M. Correlation Between *Helicobacter pylori* Infection, Gastric Diseases and Life Habits Among Patients Treated at a University Hospital in Southeast Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, 11(1):89-95, 2007.

MOLNAR, B.; SZOKE, D.; RUZSOVICS, A.; TULASSAY, Y. Significantly elevated *Helicobacter pylori* density and different genotype distribution in erosions as compared with normal gastric biopsy specimen detected by quantitative real-time PCR. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 20(4):305-13, 2008.

MONTECCUCO, C.; DE BERNARD, M. Immunosuppressive and proinflammatory activities of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*. **The Journal of Experimental Medicine**, 198:1767-71, 2003.

MONTECUCCO, C.; RAPPUOLI, R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. **Nature Reviews**, (2) 457-466, 2001.

MOYAERT, H.; DECOSTERE, A.; VANDAMME, P.; DEBRUYNE, L.; MAST, J.; BAELE, M.; CELEN, L.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. *Helicobacter equorum* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from horse faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 57(2):213-8, 2007.

NIMRI, L. F.; MATALKA, I.; HANI, K.B.; IBRAHIM, M. *Helicobacter pylori* genotypes identified in gastric biopsy specimens from Jordanian patients. **BMC Gastroenterology**, 6:27, 2006.

OTTEMANN, K.M.; LOWENTHAL, A.C. *Helicobacter pylori* Uses Motility for Initial Colonization and To Attain Robust Infection. **Infection and Immunity**, 70(4) 1984–1990, 2002.

PANDEY, M. *Helicobacter* species are associated with possible increase in risk of biliary lithiasis and benign biliary diseases. **World Journal of Surgic Oncology**, 5:94, Agosto 2007.

PARSONNET, J.; SAMLOFF, I.M.; NELSON, L.M.; ORENTREICH, M.; VOGELMAN, J.H.; FRIEDMAN, G.D. *Helicobacter pylori*: Pepsinogen and Risk for Gastric Adenocarcinoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, 461-466, Setembro 1993.

PARSONNET, J.; SHMUELY, H.; HAGGERTY, T. Excreção fecal e oral de *Helicobacter pylori* por adultos sadios infectados. **Journal of American Medical Association – Brasil**, 4:2935-2944, 2000.

PASTER, B.J.; LEE, A.; FOX, J.G.; DEWHIRST, F.E.; TORDOFF, L.A.; FRASER, G.J.; O'ROURKE, J.L.; TAYLOR, N.S.; FERRERO, R. Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. **International Journal of Systematical Bacteriology**, 41:31-38, 1991.

PATTERSON, M.M.; SCHRENZEL, M.D.; FENG, Y.; XU, S.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; THIBODEAU, S.A.; VERSALOVIC, J.; FOX, J.G. *Helicobacter aurati* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species cultured from the gastrointestinal tissues of Syrian hamsters. **Journal of Clinical Microbiology**, 38:3722-8, 2000.

PEEK, R.M. et al. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. **Cancer Research**, 59: 6124-31, 1999.

PEREZ, GIP; GONZALEZ, EG; PORTAL, C; OLIVARES, AZ. Role of Cytokine Polimorphisms in the Risk of Distal Gastric Câncer Development. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, 14(8):1869-1873, 2005.

PROUZET-MAULEON, V.; HUSSAIN, M.A.; LAMOULIATTE, H; KAUSER, F.; MEGRAUD, F.; AHMED, N. Pathogen Evolution *In Vivo*: Genome Dynamics of Two Isolates Obtained 9 Years Apart from a Duodenal Ulcer Patient Infected with a Single

Helicobacter pylori Strain. **Journal of Clinical Microbiology**, 43(8): 4237-4241, 2005.

QUEIROZ, D.M.M. et al. CagA-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. **International Journal of Cancer**, 78: 135-9, Janeiro 1998.

RADONIC, A.; THULKE, S.; MACKAY, I.M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemistry and Biophysic Research Communications**, 313:856-862, 2004.

RICCI, V.; CIACCI, C.; ZARRILLI, R.; SOMMI, P.; TUMMURU, M.K.R. BLANCO, C.D.V. BRUNI, C.B.; COVER, T.L.; BLASER, ROMANO, M.J. Effect of *Helicobacter pylori* on Gastric Epithelial Cell Migration and Proliferation In Vitro: Role of VacA and CagA. **Infection and Immunity**, 64(7) 2829-2833, 1996.

ROBERTSON, B.R.; O'ROURKE, J.L.; VANDAMME, P.; ON, S.L.; LEE, A. *Helicobacter ganmani* sp. nov., a urease-negative anaerobe isolated from the intestines of laboratory mice. **International Journal of Systematical Bacteriology**, 51(5):1881-9, 2001.

ROOSENDAAL, R; KUIPERS, EJ; BUITENWERF, J; VAN UFFELEN, C; MEUWISSEN, SGM; VAN KAMP, GJ; VAN DEN BROUCKE GRAULS, CMJE. *Helicobacter pylori* and the birth cohort effect: evidence of a continuous decrease in infection rates in childhood. **American Journal of Gastroenterology**, 92:1480-2, 1997.

SAMARAS, V.; RAFAILIDIS, P.I.; MOURTZOUKOU, E.G.; PEPPAS, G.; FALAGAS, M.E. Chronic bacterial and parasitic infections and cancer: a review. **Journal of Infection in Developing Countries**, 4(5):267-281, 2010.

SAMUELSON, L.C.; DLUGOSZ, A.; MERCHANT, J.L. Reduced Pepsin A Processing of Sonic Hedgehog in Parietal Cells Precedes Gastric Atrophy and Transformation. **The Journal of Biological Chemistry**, 282(46):33265–33274, 2007.

SANTOS, I.S. et al. *Helicobacter pylori* and anemia: a community-based cross-sectional study among adults in Southern Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, 25(12):2653-2660, 2009.

SATHAR, M; SIMJEE, A; WITTENBURG, F. Seroprevalence for *Helicobacter pylori* infection in Natal. Kwazulu, South Africa. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 6:37-41, 1994.

SELBACH, M.; MOESE, S.; HURWITZ, R.; HAUCK, C.R.; MEYER, T.F.; BACKERT, S. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. **EMBO Journal**, 22:515-528, 2002.

SOYLU, A.; DOLAPCIOGLU, C.; DOLAY, K.; CILTAS, A.; YASAR, N.; KALAYCI, M.; ALIS, H.; SEVER, N. Endoscopic and histopathological evaluation of acute gastric injury in high-dose acetaminophen and nonsteroidal anti-inflammatory drug ingestion with suicidal intent. **World Journal of Gastroenterology**, 14(43): 6704-6710, Novembro 2008.

SILVEIRA, J.A.; FILHO, J.E.S.; SOUZA, L.E.O.; SOUZA, L.B.S.; SANTANA, W.J.; COUTINHO, H.D.M. Fatores de virulência e características epidemiológicas de *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**, 58(4), 2005.

SIMMONS, J.H.; RILEY, L.K.; BESCH-WILLIFORD, C.L.; FRANKLIN, C.L. *Helicobacter mesocricetorum* sp. nov., a Novel *Helicobacter* isolated from the Feces of Syrian Hamsters. **Journal of Clinical Microbiology**, 38(5): 1811–1817, Maio 2000.

SUAREZ, G.; REYES, V.E.; BESWICK, E.J. Immune response to H pylori. **World Journal of Gastroenterology**, 21; 12(35): 5593-5598, Setembro 2006.

SZCZEPANIK, M. Interplay between *Helicobacter pylori* and the immune system. Clinical implications. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 57 Suppl 3:15-27, Setembro 2006.

TAGUCHI, A; OHMIYA, N; SHIRAI, K; MABUCHI, N; ITOH,A; HIROOKA, Y; NIWA, Y; GOTO, H. Interleukin-8 Promoter Polymorphism Increases the Risk of Atrophic Gastritis and Gastric Cancer in Japan. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, 14(11):2487-2493, Novembro 2005.

TAKEUCHI, H.; NAKAZAUA, T.; OKAMOTO, T.; SHIRAI, M.; KIMOTO, M.; NISHIOKA, M.; KON, S.A.; MORIMOTO, N.; SUGIURA, T. Cell elongation and cell death of *Helicobacter pylori* is modulate by the disruption of cdrA (Cell Division-Related Gene A). **Microbiology and Immunology**, 50 (7):487-497, 2006.

TEPES, B. Can Gastric Cancer be Prevented? **Journal of Physiology and Pharmacology**, 60(7):71-77, 2009.

TESTERMAN, T.L.; Mc GEE, D. J.; MOBLEY, H.L.T. *Helicobacter pylori* Growth and Urease Detection in the Chemically Defined Medium Ham's F-12 Nutrient Mixture. **Journal of Clinical Microbiology**, 39:3842-3850, Dezembro 2001.

THOMAZINI, C.M.; PINHEIRO, N.A.; PARDINI, M.I.; NARESSE, L.E.; RODRIGUES, M.A.M.R. Infecção por *Helicobacter pylori* e câncer gástrico: frequência de cepas patogênicas cagA e vacA em pacientes com câncer gástrico. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**, 42(1):25-30, 2006.

TOMB, J. F., ET AL. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, 388: 539–547, 1997.

TOTTEN, P.A.; FENNELL, C.L.; TENOVER, F.C.; WEZENBERG, J.M.; PERINE, P.L.; STAMM, W.E.; HOLMES, K.K. *Campylobacter cinaedi* (sp. nov.) and *Campylobacter fennelliae* (sp. nov.): two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. **Journal of Infectious Diseases**, 151(1):131-9, Janeiro 1985.

TRABULSI, L. Microbiologia 3. Ed. São Paulo – SP: Atheneu; 2002.

UNEMO, M.; ASPHOLM-HURTIG, M.; ILVERT, D.; BERGSTRÖM, J.; BORÉN, T.; DANIELSSON, D.; BORÉN, T. The sialic binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. **Journal of Biology and Chemistry**, 280:15390-7, 2005.

VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; VANDAMME, P.; MAST, J.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. *Helicobacter cynogastricus* sp. nov., isolated from the canine gastric mucosa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56(7):1559-64, 2006.

VERGUEIRO, C.S.V; CORDIOLLI, R; MARTUCCI, D; PERES, V; KIYAMU, A.R; RIBEIRO, K.C.B; CHIATTONE, C.S. Soroprevalência e fatores associados à infecção pelo *Helicobacter pylori* em doadores de medula óssea de São Paulo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 11(2): 196-203, 2008.

VERSALOVIC, J.; FOX, J.G. En: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. *Helicobacter*. Manual of Clinical Microbiology. ASM. Washington 727-738,1999.

VINALL, L.E. et al. Altered expression and allelic association of the hypervariable membrane Mucin MUC1 in *Helicobacter pylori* gastritis. **Gastroenterology**, 123(1):41-49, 2002.

WON, Y.S.; VANDAMME, P.; YOON, J.H.; PARK, Y.H.; HYUN, B.H.; KIM, H.C.; ITOH, T.; TANIOKA, Y.; CHOI, Y.K. *Helicobacter callitrichis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from the feces of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **FEMS Microbiology Letters**, (2):239-44, 2007.

WON, Y.S.; YOON, J.H.; LEE, C.H.; KIM, B.H.; HYUN, B.H.; CHOI, Y.K. *Helicobacter muricola* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from the ceca and feces of Korean wild mouse (*Mus musculus molossinus*). **FEMS Microbiology Letters**, 19;209(1):45-51, 2002.

WONG, B.C.Y.; YIN, Y.; BERG, D.E.B.; XIA, H.H.; ZHANG, J.Z.; WANG, W.H.; WONG, W.M.; HUANG, X.R.; TANG, V.S.Y.; LAM, S.K. Distribution of Distinct *vacA*, *cagA* and *iceA* Alleles in *Helicobacter pylori* in Hong Kong. **Helicobacter**, 6: 317–324, 2001.

WU, CC; CHOU, PY; HU, CT; LIU, ZC; LIN,CY; TSENG, YH; LIN, NT. Clinical Relevance of the *vacA*, *iceA*, *cagA* and *flaA* Genes of *Helicobacter pylori* Strains Isolated in Eastern Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, 43:2913-2915, 2005.

WUERGES, J.; GEREMIA, S.; RANDACCIO, L. Structural study on ligand specificity of human vitamin B12 transporters. **Biochemistry**, J. 403, 431–440, 2007.

YAKOOB, J.; ABID, S.; ABBAS, Z.; JAFRI, W.; AHMAD, Z.; AHMED, R.; ISLAM, M. Distribution of *Helicobacter pylori* virulence markers in patients with gastroduodenal diseases in Pakistan. **BMC Gastroenterology**, 9:87, 2009.

YAMAZAKI, S.; YAMAKAWA, A.; OKUDA, T.; OHTANI, M.; SUTO, H.; ITO, Y.; YAMAZAKI, Y.; KEIDA, Y. HIGASHI, H.; HATAKEYAMA, M.; AZUMA, T. Distinct Diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* Genes of *Helicobacter pylori* Associated with Peptic Ulcer in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, 43(8):3906-3916, 2005.


YAMAOKAA, Y.; ORITOB, E.; MIZOKAMIC, M.; GUTIERREZD, O.; SAITOU, N.; KODAMAF, T.; OSATOA, M.S.; KING, J.G.; RAMIREZH, F.C.; MAHACHAI, V.; GRAHAM, D.Y. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. **FEBS Letters**, 517: 180-184, 2002.


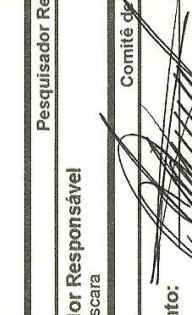
ZATERKA, S.; EISIG, JN; CHINZON, D; ROTHSEIN, W. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. **Helicobacter**, 12:82-88, 2007.

ZHANG, D.; ZHOU, L.; LIN, S.; DING, S.; HUANG, Y.; GU, F.; ZHANG, L.; LI, Y.; CUI, R.; MENG, L.; YAN, X.; ZHANG, J. Recent changes in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection among children and adults in high- or low-incidence regions of gastric cancer in China. **China Medical Journal**, 122(15):1759-1763, 2009.

8. ANEXOS

Anexo I
Número do Registro do Projeto no CONEP.


MINISTÉRIO DA SAÚDE
 Conselho Nacional de Saúde
 Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PROJETO RECEBIDO NO CEP		CAAE - 0120.0.237.000-07	
Projeto de Pesquisa Prevalência e variabilidade de genótipos associados aos fatores de virulência em isolados de <i>Helicobacter pylori</i> . Análise de correlação com diferentes aspectos do hospedeiro.			
Area(s) Temática(s) Especial(s) Não se aplica		Grupo	Fase Não se aplica
CPF 03276289873		Pesquisador Responsável	
Pesquisador Responsável Douglas Mascara		Assinatura 	
Data de Entrega 21/11/2007		Comitê de Ética	
Recebimento:		Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Assinatura Seres Humanos	
Nivaldo Camilo Neto			

<http://portal.saude.gov.br/sisnep/cep/caae.cfm?VCOD=166378>

21/11/2007

Anexo II Processo CEP.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Título: PREVALÊNCIA E VARIABILIDADE DE GENÓTIPOS ASSOCIADOS AOS FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *HELICOBACTER PYLORI*. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO COM DIFERENTES ASPECTOS DO HOSPEDEIRO

Área de conhecimento: 2.02 - Genética

Responsável pelo projeto: Prof. Douglas Mascara

Co-Responsável pelo projeto: Prof. Ivarne Luis dos Santos Tersariol

Autores: Fernando Francisco Pazello Mafra

Érika G. de Oliveira

Processo CEP: 119/2007

CAAE: 0120.0. 237.000-07

Em reunião de 13 de dezembro de 2007 o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos aprovou o parecer que segue aqui descrito.

Resumo

O projeto se propõe a realizar um levantamento das variações genotípicas entre isolados de *Helicobacter pylori* obtidos a partir de biópsias gástricas coletadas em pacientes do Hospital das Clínicas Luzia de Pinho Melo, em Mogi das Cruzes. Além de caracterizar os diferentes genótipos, os pesquisadores pretendem estabelecer análises de correlação entre a ocorrência de diferentes variedades genotípicas e algumas características dos pacientes, como idade, sexo, tipo de patologia, etc.

Parecer

O projeto encontra-se muito bem fundamentado e é descrito com precisão suficiente para que se faça uma apreciação técnica favorável. O único ponto a ressaltar, seria a brevidade com os autores descrevem o plano de análise estatística dos dados, que poderia ser mais bem desenvolvido, haja vista a grande quantidade de variáveis que se pretende analisar. Não obstante, o mero levantamento das principais variedades de *H. pylori* presentes na população de Mogi das Cruzes e arredores já caracteriza um aspecto interessante que justifica a realização da pesquisa e, para estes estudos, a metodologia é descrita de maneira satisfatória e adequada. O TCLE está muito bem elaborado, constituindo exemplo a ser seguido por outros projetos da área. O processo não apresenta, no entanto, documento manifestando anuência do responsável pelo hospital onde estarão sendo realizadas as coletas. Este documento deve ser encaminhado ao CEP antes que o projeto possa ser considerado aprovado.

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**

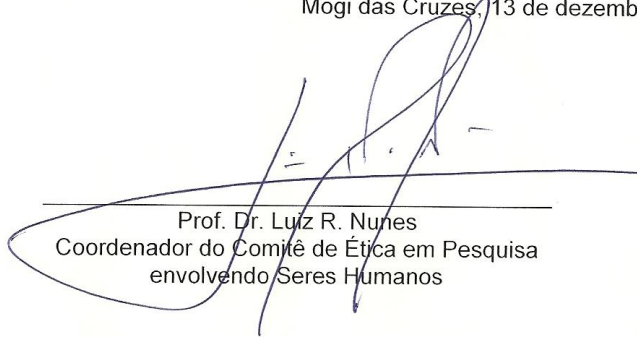
Cont.: Processo CEP: 119/2007 CAAE: 0120.0. 237.000-07

Conclusão

Projeto em diligência.

Obs: Os responsáveis têm 60 dias para responder aos quesitos formulados pelo CEP em seu parecer. Após esse prazo o projeto será considerado retirado e posteriormente havendo interesse, deverá ser apresentado novo protocolo e reiniciado o processo de registro (Resolução CNS 196/96). Caso haja alguma dúvida, procurar o CEP para maiores esclarecimentos.

Mogi das Cruzes, 13 de dezembro de 2007.



Prof. Dr. Luiz R. Nunes
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
envolvendo Seres Humanos

Av. Cândido Xavier de Almeida Souza, 200 – Prédio II – Sala 21-21 - CEP 08780-911
Telefone: (011) 4798-7085 e-mail: cep@umc.br
Mogi das Cruzes - São Paulo - Brasil

Anexo III
Parecer de aprovação pelo Comitê de Ética do projeto de pesquisa.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Título: PREVALÊNCIA E VARIABILIDADE DE GENÓTIPOS ASSOCIADOS AOS FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *HELICOBACTER PYLORI*. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO COM DIFERENTES ASPECTOS DO HOSPEDEIRO

Área de conhecimento: 2.02 - Genética

Responsável pelo projeto: Prof. Douglas Mascara

Co-Responsável pelo projeto: Prof. Ivarne Luis dos Santos Tersariol

Autores: Fernando Francisco Pazello Mafra

Érika G. de Oliveira

Processo CEP: 119/2007

CAAE: 0120.0. 237.000-07

O Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos aprovou "ad referendum" o parecer que segue aqui descrito.

Resumo

O projeto se propõe a realizar um levantamento das variações genotípicas entre isolados de *Helicobacter pylori* obtidos a partir de biópsias gástricas coletadas em pacientes do Hospital das Clínicas Luzia de Pinho Melo, em Mogi das Cruzes. Além de caracterizar os diferentes genótipos, os pesquisadores pretendem estabelecer análises de correlação entre a ocorrência de diferentes variedades genotípicas e algumas características dos pacientes, como idade, sexo, tipo de patogenia, etc.

Parecer

Em resposta ao parecer emitido em 13 de maio de 2008, os responsáveis enviaram a carta de anuência do responsável pelo Hospital das Clínicas Luzia de Pinho Melo onde serão realizadas as coletas do material e incorporaram ao projeto o método estatístico que será usado na análise dos dados. Com isso, o projeto está aprovado para sua execução.

Conclusão

Projeto Aprovado de acordo com as normas estabelecidas pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Obs.: O Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, de acordo com suas atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador responsável que encaminhe o relatório final (em CD ou disquete) ou cópia da publicação do artigo ou resumo (em papel) referentes a este projeto no mês de JUNHO de 2009 com carta de encaminhamento ao Coordenador do CEP-UMC. Caso contrário, deve ser entregue uma justificativa para que não haja complicações na entrega de projetos posteriores.

Mogi das Cruzes, 27 de Maio de 2008.

Prof. Dr. Carlos Marcelo Gurjão de Godoy
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
envolvendo Seres Humanos

Anexo IV
Termo de liberação de pesquisa científica a ser realizada no Hospital das
Clínicas Luzia de Pinho Melo.



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
LUZIA DE PINHO MELO



SPDM – Associação Paulista para o Desenvolvimento da Medicina

TERMO PARA LIBERAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA A SER REALIZADA NO
HCLPM

NOME DO PESQUISADOR: FERNANDO FRANCISCO PAZELLO MAFRA
 ÉRIKA G. DE OLIVEIRA.

ORIENTADOR: DR. RUI AFONSO BASSANI

ÁREA: MEDICINA

TÍTULO DO TRABALHO: PREVALÊNCIA E VARIABILIDADE DE GENÓTIPOS
ASSOCIADOS AOS FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE HELICOBACTER
PYLORI. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO COM DIFERENTES ASPECTOS DO
HOSPEDEIRO.

LOCAL DE PESQUISA: ENDOSCOPIA/ SADT

AValiação DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA:



UMC



UNIFESP

APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ENSINO E PESQUISA:



SIM



NÃO

PARECER DA COMISSÃO DE ENSINO: _____

liberado st reabrir qm

DATA: 15, 25, 08

[Signature]
 ASS. PRESIDENTE DA C.E.P. HCLPM

Dr. Su Bong Kim
 CRM SP 49953

Anexo V Formulário do participante.

Formulário do participante – Pesquisa *Helicobacter pylori*

Aspectos Gerais

Nome do Participante: _____

Data de nascimento: _____

Município onde mora: _____

Sexo: Masculino Feminino

Estado civil: Solteiro Casado Divorciado Viúvo

Possui filhos? Sim Não
 Se sim, quantos? _____ Moram com o participante? _____

Etnia Caucasiano Negro Oriental Pardo

Faixa Salarial ½ à 2 sm 5 à 10 sm 10 à 15 sm acima de 15 sm

Nome do entrevistador: _____

Data da entrevista: _____

Assinatura do Participante: _____

Aspectos sociais

Faz uso de tabaco? Sim Não
 Se sim, quanto tempo? _____

Faz uso de álcool? Frequentemente Socialmente Não
 Se sim, quanto tempo? _____

Possui alguma doença crônica? Sim Não
 Se sim, quais? _____

Aspectos clínicos

- Faz uso de remédio para dor de cabeça ou no corpo? Frequentemente Ocasionalmente raramente não
Se sim, qual(is)? _____
- Já teve algum problema de estômago? Sim Não
Se sim, qual e quanto tempo? _____
- Alguém da família já teve algum problema de estômago? Sim Não
Se sim, quem e quanto tempo? _____
- Faz ou já fez uso de remédio para o estômago? Sim Não
Se sim, qual(is) e quanto tempo? _____
- Fez uso de antibióticos recentemente? Sim Não
Se sim, qual(is) e quanto tempo? _____
- Já fez endoscopia alguma vez? Sim Não
Se sim, quantas e há quanto tempo? _____
- Alguém da família já fez endoscopia alguma vez? Sim Não
Se sim, quem e há quanto tempo? _____
- Já teve algum diagnóstico positivo para *Helicobacter pylori*? Sim Não
Se sim, há quanto tempo? _____

Aspectos clínicos

Alguém da família teve algum diagnóstico positivo para *Helicobacter pylori*? Sim Não
Se sim, quem há quanto tempo? _____

Já fez algum tratamento para *Helicobacter pylori*? Sim Não
Se sim, há quanto tempo? _____

Alguém da família já fez algum tratamento para *Helicobacter pylori*? Sim Não
Se sim, quem e há quanto tempo? _____

No seu caso, o tratamento teve efeito? Sim Não
Se não, por quê? _____

No caso da sua família, o tratamento teve efeito? Sim Não
Não, por quê? _____

***Somente para o grupo GES**

Qual motivo está fazendo endoscopia? _____

Quanto tempo sente dor de estômago antes de procurar o serviço médico? _____

Anexo VI Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Mogi das Cruzes pessoalmente ou através do telefone (x11) 4798-7085

Título da Pesquisa:

PREVALÊNCIA E VARIABILIDADE DE GENÓTIPOS ASSOCIADOS AOS FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *HELICOBACTER PYLORI*. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO COM DIFERENTES ASPECTOS DO HOSPEDEIRO.

Estamos realizando uma pesquisa sobre a ocorrência de uma bactéria no estômago de pessoas que apresentam algum tipo de desconforto gástrico, gastrite, úlcera entre outros. Por causa disso, iremos examinar os materiais obtidos de endoscopias – biopsias – e através delas determinar se a bactéria *Helicobacter pylori* está presente e qual é a variedade dessa bactéria. De acordo com o resultado iremos verificar se existe alguma correlação com o tipo de problema gástrico apresentado pelo paciente, com os hábitos dele, (por exemplo, se ele é fumante), com o sexo, com a idade, hábitos de higiene e com a sua origem ou nacionalidade. Muitos desses estudos têm sido realizados em diferentes regiões do mundo e a presença e o tipo dessa bactéria no estômago pode estar associada ao desenvolvimento de importantes doenças gástricas.

A pesquisa que realizaremos deverá utilizar parte do material coletado durante a endoscopia e, portanto não iremos realizar um exame diferente em nenhum paciente. Em um exame normal, são coletadas 4 amostras do tecido gástrico, em razão deste estudo iremos coletar 6 amostras. Somente serão convidadas para participar dessa pesquisa pessoas que foram encaminhadas ao exame de endoscopia devido a uma solicitação médica.

Parte do material coletado durante o exame será utilizado para a análise e diagnóstico, conforme solicitação médica e outra parte será utilizada para o estudo que descrevemos acima.

Não iremos solicitar nenhum exame adicional.

O exame será realizado no mesmo local, e será acompanhado pelos mesmos médicos e assistentes que fazem rotineiramente o exame endoscópico, um membro da nossa equipe poderá estar presente para auxiliar no acondicionamento do material coletado.

Será necessário examinar alguns dados clínicos presentes no prontuário médico do paciente, e se necessário solicitaremos diretamente ao voluntário ou ao seu representante legal

algumas informações que possam ser importantes para o nosso estudo. Todos os dados pessoais serão mantidos em sigilo e o nome de cada participante será ocultado durante toda a pesquisa.

Caso você tenha alguma dúvida quanto à pesquisa, eu Douglas Mascara coordenador da pesquisa, biólogo, Doutor em Genética Molecular, professor da Universidade de Mogi das Cruzes, situada à Av. Dr. Cândido Xavier de Almeida Souza, 200 fone 4798-7087 coloco-me a disposição para esclarecimentos, assim como pode ser procurado o Comitê de Ética em Pesquisa, que aprovou este projeto, situado à Av. Dr. Cândido Xavier de Almeida Souza, 200 Prédio II, Sala 21-21 1º andar, fone 4798-7085, e-mail: cep@umc.br

Você não terá nenhuma despesa nem receberá nenhum retorno financeiro. Os pesquisadores se comprometem a usar os dados da pesquisa somente para este fim.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "PREVALÊNCIA E VARIABILIDADE DE GENÓTIPOS ASSOCIADOS AOS FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *HELICOBACTER PYLORI*. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO COM DIFERENTES ASPECTOS DO HOSPEDEIRO". Eu discuti com o médico responsável pelo exame, ou com um membro da equipe de trabalho envolvido na presente pesquisa, ou mesmo com o coordenador da pesquisa sobre a minha decisão em autorizar a minha participação, ou do menor, ou do idoso de quem sou responsável legal, neste estudo. Ficaram claros para mim os propósitos da pesquisa, procedimentos que serão feitos, desconfortos e riscos, garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Também ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Autorizo participar desta pesquisa ou a do menor do qual sou responsável legal, e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante a pesquisa, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Data: ____/____/____

Assinatura do voluntário ou do representante legal

Assinatura da testemunha (para casos de menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento livre e esclarecido deste representante legal para participação na pesquisa.

assinatura do responsável pelo estudo

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)