



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS**

**DETECÇÃO DA *Helicobacter pylori* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM AMOSTRAS FECAIS DE
CRIANÇAS DA CIDADE DE BELÉM-PARÁ.**

VANESSA DE SOUZA GUIMARÃES

Belém-Pará
2007

VANESSA DE SOUZA GUIMARÃES

**DETECÇÃO DA *Helicobacter pylori* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM AMOSTRAS FECAIS DE
CRIANÇAS DA CIDADE DE BELÉM-PARÁ.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Doenças Tropicais, pelo Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientador: Dr. Artur Luiz da Costa da Silva.

Belém-Pará

2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) –

1 Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical, Belém-PA

Guimarães, Vanessa de Souza

Detecção da *Helicobacter pylori* através da técnica de reação em cadeia da polimerase em amostras fecais de crianças da cidade de Belém-Pará / Vanessa de Souza Guimarães; orientador, Artur Luiz da Costa da Silva. — 2007.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2007.

1. Infecção por *Helicobacter pylori*. 2. Crianças - doenças. 3. Pará .
I. Silva, Artur Luiz da Costa da, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 616.33098115

Ficha catalográfica elaborada por Marta G.Gonçalves NMT/UFPA – CRB2 1164

VANESSA DE SOUZA GUIMARÃES

DETECÇÃO DA *Helicobacter pylori* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM AMOSTRAS FECALIS DE CRIANÇAS DA CIDADE DE BELÉM-PARÁ.

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Doenças Tropicais, pelo Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Aprovado em 14 de Março de 2007

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva

Departamento de Genética, Universidade Federal do Pará – UFPA

Prof^a. Dr^a. Edna Aoba Yassui Ishikawa

Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará – UFPA

Prof^a. Dr^a. Luísa Caricio Martins

Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará – UFPA

Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina de Oliveira Corvelo

Departamento de Genética, Universidade Federal do Pará – UFPA

*Aos meus pais, Dinete e Heldimar,
pelo amor, carinho, dedicação,
compreensão e contribuição em todos os
momentos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar presente em minha vida e por me permitir chegar até aqui.

Ao Prof^o Dr. Artur Luiz da Costa da Silva, pela dedicação e disponibilidade na orientação deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Corvelo, pelas sugestões e atenção dispensada em todas as etapas da realização deste trabalho.

Aos pesquisadores, pós-graduandos, acadêmicos e técnicos do Laboratório de Polimorfismo de DNA da Universidade Federal do Pará, de modo especial ao amigo Thomaz Xavier, pela amizade, atenção, disponibilidade e apoio dispensado em todos os momentos deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Pará pela cooperação e colaboração essenciais para os resultados alcançados, em especial à Delia Aguiar, pelo fornecimento dos iniciadores, Iran e Clayton.

Às tias, tios, primas, primos, afilhados, vovó (in memoriam) e vovô, por todo apoio, carinho e amor que sempre me deram.

Às amigas Charliana Aragão e Vaniza Sá que me incentivaram a entrar neste curso de mestrado.

Às grandes amigas “gatas” Katarine, Hivana e Renata, pelo acolhimento, amizade, carinho, ajuda, apoio incondicional, conversas científicas e outras nem tanto assim ehueheuheu. Isso tudo seria muito mais difícil sem vocês!!!

Às amigas Ivana e Danica, pela amizade sincera e pelos momentos de descontração.

Às amigas Ana Rosa e Graça Carvalho, pelo enorme carinho e companheirismo.

Ao amigo Reginaldo Lira, pelo eterno incentivo, pelas oportunidades profissionais e pelas inúmeras demonstrações de afeto e amizade verdadeira.

Ao Prof^o. Dr. Manuel Ayres e ao amigo Erivelton Saldanha pelas contribuições nas análises estatísticas dos resultados.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

Ao Núcleo de Medicina Tropical e UFPA pela oportunidade de desenvolver esta dissertação de mestrado.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa de estudos que garantiu o sustento financeiro necessário para a realização deste trabalho.

Às diversas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o planejamento, execução e conclusão deste trabalho.

“Há momentos em que só saberemos como agir após termos dado o primeiro passo em direção ao desconhecido.”

Clarissa Pinkola Estés

RESUMO

A infecção pela *Helicobacter pylori* é uma das mais comuns em humanos, admite-se que é adquirida na infância e que é uma das principais causas de gastrite e úlcera gástrica na vida adulta. Entre os vários métodos de diagnósticos da infecção pela *H. pylori*, a reação e cadeia da polimerase (PCR) tem mostrado alta sensibilidade para a detecção desta bactéria em amostras gástricas, orais fecais. Com o objetivo de padronizar a técnica de PCR para detectar a presença da *H. pylori* nas fezes e comparar com o método de diagnóstico sorológico, utilizou-se uma amostra de 79 crianças provenientes de um estudo soropidemiológico realizado em Belém-Pará, no ano de 2003. O DNA total foi extraído das fezes através de um protocolo padronizado neste estudo baseado na associação dos métodos de fervura em resina quelante e digestão por proteinase, seguido por fenol-clorofórmio. Para a amplificação do DNA utilizou-se iniciadores para o gene *16S rRNA* para o gênero *Helicobacter* e para detecção específica da *H. pylori* utilizou-se iniciadores para trecho do gene *ureA*. O fragmento foi visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. A presença da *H. pylori* foi verificada em 69,62% (55/79) dos pacientes. A análise comparativa entre o ensaio sorológico e a PCR *ureA*, revelou que a técnica molecular apresenta um melhor desempenho no diagnóstico de *H. pylori* em fezes ($p = 0,0246$). A aplicação da técnica da PCR em amostras fecais de crianças, por ser um procedimento não invasivo e altamente eficiente pode ser utilizada para detecção da infecção pela *H. pylori* tanto na rotina laboratorial como em pesquisas de interesse epidemiológico.

Palavras chaves: *H. pylori*, crianças, fezes, PCR

ABSTRACT

The infection for the *Helicobacter pylori* is one of the most common in humans, it is admitted that is acquired in the childhood and that it is one of the main gastritis causes and peptic ulcer in the adult life. Among the several diagnosis methods for the *H. pylori* infection, the Polymerase Chain Reaction (PCR) has been showing high sensibility for the detection of this pathogen in gastric, oral and faecal samples. With the objective of standardizing the PCR technique to detect the presence of *H. pylori* of in stool samples and to compare this method with serologic diagnosis, we studied a samples of 79 children coming of a seroprevalence study realized in the city Belém-Pará in 2003. The genomic DNA was extracted of the feces through a protocol standardized in this research based on the association of quelator agents and proteinase digestion, followed by a phenol-chloroform procedure. For the DNA amplification it was used primers for the gene *16SrRNA* specific for *Helicobacter* genus and for specific detection of the *H. pylori* it was used primers for desigend for *ureA* gene. The visualization of the fragments was performed agarose 2% gels stained with ethidium bromide. The presence of the *H. pylori* was verified in 69,62% (55/79) of the patients. The comparative analysis between the serologic research and the *ureA* PCR revealed that the molecular technique presents a better acting in the diagnosis of *H. pylori* in feces ($p = 0,0246$). The application of the technique of PCR in children's fecal samples, for being a non invasive highly efficient procedure, can be used for detection of the infection by *H. pylori* in the laboratorial routine as well as in researches of epidemiologic interest.

Keywords: *H. pylori*, children, faecal samples, PCR

LISTA DE ABREVIATURAS

nm	Nanômetro
µL	Microlitro
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
kDa	Quilo Daltons
BabA	Adesina da bactéria
CagA	Citotoxina associada ao gene <i>cagA</i>
dNTPs	Deoxinucleotídeos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Elisa	Ensaio imunoenzimático
Et al.	et alii, e outros
H ⁺	Íon Hidrogênio
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Helicobacter spp.</i>	Gênero <i>Helicobacter</i>
HCL	Ácido clorídrico
HspA	Proteína A do choque térmico
HUJBB	Hospital Universitário João Barros Barreto
IgG	Imunoglobulina de cadeia Y
KCl	Cloreto de potássio
LPS	Lipossacarídeos
MALToma	Linfoma de tecido linfóide associado à mucosa
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
pmoles	picomoles
PCR	Reação em cadeia mediada pela polimerase
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogênico

q.s.p	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
<i>RNAr</i>	<i>gene RNA ribossomal</i>
RNAse A	Enzima RNAse A
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
TE	Tampão Tris - EDTA
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
UV	Radiação Ultravioleta
VacA	Citotoxina vacuolizante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A BACTÉRIA <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.1.1 Histórico e Taxonomia Atual	1
1.1.2 Aspectos Epidemiológicos	3
1.1.2.1 Prevalência.....	3
1.1.2.2 Transmissão	5
1.1.3 Morfologia	6
1.1.4 Genoma	8
1.1.5 Fatores de virulência	12
1.1.5.1 Fatores de colonização	13
1.1.5.2 Fatores de persistência	15
1.1.5.3 Fatores indutores de doenças	16
1.1.6 Resposta Imunológica	18
1.1.7 Patologias associadas à infecções pela <i>H. pylori</i>	21
1.1.8 Diagnósticos	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	26
3.1 TIPO DE ESTUDO	26
3.1.1 Casuística	26
3.1.2 Critérios de Inclusão	26
3.1.3 Critérios de Exclusão	26
3.2 QUESTÕES ÉTICAS.....	26
3.3 PROCEDIMENTOS.....	27
3.3.1 Coleta e processamento das amostras	27
3.4 TÉCNICAS LABORATORIAIS.....	27
3.4.1 Extração do DNA Bacteriano	27
3.4.2 Amplificação <i>in vitro</i> do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	28
3.4.3 Condições da PCR	31
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33

4 RESULTADOS	33
4.1 EXTRAÇÃO DO DNA DE AMOSTRAS FECAIS.....	33
4.2 PCR NAS AMOSTRAS DE FEZES	35
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÕES	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 A BACTÉRIA *Helicobacter pylori*

1.1.1 Histórico e Taxonomia Atual

Em 1983, o italiano Guilio Bizzozero relatou pela primeira vez a presença de organismos espiralados no estômago de cães. Apenas três anos depois, o alemão Hugo Salomon confirmou os achados de Bizzozero quando descreveu espiroquetas no estômago de cães e gatos (Salomon, citado por Marshall & Warren, 1984, p. 1311). Já no início do século XX, Krienitz detectou a presença de microorganismos similares em biópsias gástricas e em vômitos de pacientes com câncer gástrico (Dunn *et al*; 1997).

Palmer em 1950, através de uma técnica de sucção coletou espécimes da mucosa gástrica de pacientes, porém ao usar o método de coloração Hematoxilina-eosina (HE) não conseguiu identificar a bactéria. Então, acreditou-se que a presença da bactéria não passava de contaminação do muco, desmotivando a pesquisa e publicação nesta área (Palmer, 1954).

O patologista australiano Robin Warren, em 1979, notificou que tinha observado por várias vezes uma bactéria curva nas amostras de biópsias gástricas submetidas à análise histopatológica. Este microorganismo não era encontrado invadindo a mucosa gástrica, mas sim no muco ao redor do tecido. E mesmo Warren tendo encontrado relatos de um organismo similar descrito no final do século XI, não continuou seus estudos devido às dificuldades na época em se conseguir isolar a bactéria (Marshall & Warren, 1984; Dunn *et al*, 1997).

Em 1982, o médico Barry Marshall interessou-se nas observações de Warren e juntou-se a ele na tentativa de isolar a bactéria a partir de biópsias gástricas dos pacientes com gastrite crônica, aplicando métodos empregados no isolamento de espécies de *Campylobacter*. Somente em 1983, eles conseguiram cultivar esta bactéria através do aumento acidental do período de incubação das placas de cultura devido o feriado da Páscoa (Marshall & Warren, 1984; Marshall *et al.*, 1985; Marshall, 1994).

Inicialmente, as pesquisas concentraram-se na cultura *in vitro* da bactéria e sua classificação. Posteriormente, foram realizadas análises histopatológicas dos fragmentos de mucosa, e o microorganismo foi incluído no gênero *Campylobacter* pelas semelhanças com estas bactérias patogênicas intestinais, tais como seu aspecto quando corado por Gram e sua característica microaerófila para cultivo sendo denominado de *Campylobacter pyloridis* (Dunn *et al.*, 1997; Parsonnet, 2000).

Em 1985, Marshall e Warren estavam convencidos de que esta bactéria desempenhava importante papel na gênese dos processos inflamatórios no estômago e ingeriram voluntariamente caldo de cultura da bactéria, conseguindo comprovar a teoria de que ela seria a principal causa de inflamação gástrica e divulgaram seus resultados (Marshall *et al.*, 1986).

Análises posteriores, incluindo estudos moleculares de características ultraestruturais, propriedades enzimáticas, respiração e crescimento, detectaram diferenças em relação ao gênero *Campylobacter*. Então, em 1989, recebeu uma nova classificação taxonômica do gênero *Helicobacter*, inicialmente com duas espécies: *Helicobacter pylori*, patógeno gástrico do estômago humano e *Helicobacter mustale*, bactéria similar encontrada no estômago de furões (Dunn *et al.*, 1997; Degroote *et al.*; 1999).

TAXONOMIA	DA	BACTÉRIA
FILO		Proteobactéria
CLASSE		Epsilonproteobacteria
ORDEM		Campylobacterales
FAMÍLIA		Helicobacteraceae
GÊNERO		<i>Helicobacter</i>
ESPÉCIE		<i>H. pylori</i>

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy

Estas descobertas revolucionaram a gastroenterologia e a microbiologia, conduzindo a mudanças em condutas terapêuticas e diagnósticas (Suerbaum & Michetti, 2002). Sendo assim, em 1994 foi classificada como carcinógeno do tipo 1 para câncer do estômago pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC,

1994). No ano de 2005, Warren e Marshall receberam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia pela descoberta da relação entre a *H. pylori* e as doenças pépticas de estômago e duodeno (Ahmed, 2005).

1.1.2 Aspectos epidemiológicos

1.1.2.1 Prevalência

A *H. pylori* é um dos patógenos mais comuns em humanos, comprometendo cerca da metade da população mundial (Nakayama & Graham, 2004). Apresenta distribuição universal, sendo encontrada em habitantes dos cinco continentes (Go, 2002) (Figura1).

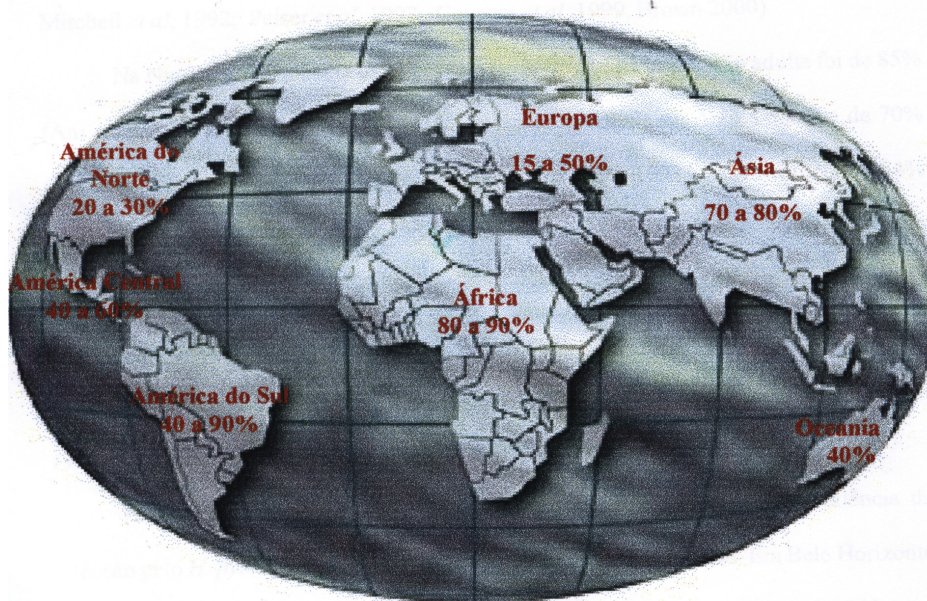


Figura1. Distribuição mundial da prevalência da infecção pela *H. pylori*.

Fonte: http://ww.helico.com/h_epidemiology.html

A prevalência da infecção pela *H. pylori* é significativamente maior entre países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos. Porém, independentemente da região, as diferenças parecem estar em função da condição

socioeconômica da população e sanitárias das regiões (Marshall, 2002; Perez-Perez *et al.*, 2004, Bures *et al.*, 2006; Queiroz & Luzza, 2006).

Outras condições também parecem influenciar a prevalência como a idade, fatores genéticos do hospedeiro e da bactéria, ou mesmo os fatores ambientais, como hábitos alimentares e consumo de bebidas alcoólicas e fumo (Namekata *et al.*, 2000; Brown, 2002; Hamajimi *et al.*, 2006; Rowland *et al.*, 2006; Zaterka *et al.*, 2007).

Em países desenvolvidos como Estados Unidos da América (EUA), Canadá e região ocidental da Europa cerca de 50% da população adulta esta infectada pela *H. pylori* (Everhart *et al.*, 2000; Jacobson, 2005, Bures *et al.*, 2006). Na população infantil a taxa de infecção é em torno de 5%, com uma incidência anual entre 0,3% e 2,7% para menores de 12 anos (Jacobson, 2005; Mourad-Baars & Chong, 2006).

Por outro lado, em países em desenvolvimento a prevalência é maior, atingindo 80% dos adultos e mais de 50% das crianças com menos de 10 anos de idade (Kodaira *et al.*, 2002; Nizami *et al.*, 2005; Halitim *et al.*, 2006). Estes dados parecem ter relação direta com precárias condições de higiene e saneamento, aglomerados humanos e por contato mais íntimo entre crianças e adultos, conseqüentemente facilitando a transmissão e contaminação infantil (Kodaira *et al.*, 2002; Al-Shamahy *et al.*, 2005; Bani – Hani *et al.*; 2006).

Estudos de soroprevalência em crianças no Brasil têm demonstrado uma variação na prevalência da infecção pela *H. pylori* em diferentes regiões. Em Belo Horizonte (MG) a prevalência observada foi de 34,1%, em Fortaleza (CE) foi de 39,2% e em Porto Alegre (RS) de 24,86% (Oliveira *et al.*, 1994; Sousa *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 2003).

Muitos estudos epidemiológicos têm demonstrado que a infância constitui o período de maior aquisição da *H. pylori* e que as taxas de prevalência da infecção pela *H. pylori* aumentam com a idade (Moraes & Silva, 2003; Rocha *et al.*, 2003; Nizami *et al.*, 2005; Mourad-Baars & Chong, 2006; Bani – Hani *et al.*, 2006).

Em Belém (PA) foi observada uma prevalência de 74% entre pacientes com gastrite (Aguiar *et al.*, 2002) e de 93% em pacientes com úlcera gástrica (Martins *et al.*, 2002). Em crianças essa prevalência também foi elevada, acometendo cerca de 80% dos indivíduos na faixa etária de 6 meses e 12 anos, quando comparada com as prevalências observadas nas regiões Sul e Sudeste (Guimarães, 2003).

Um outro trabalho realizado em Belém (PA) com dois grupos socioeconômicos diferentes, demonstrou uma prevalência de 91% da infecção pela

H. pylori em crianças de baixo nível sócio econômico. Já no grupo de melhor nível sócio econômico (médio e alto) observou-se uma taxa de infecção de 32% nas crianças (Barile, 2003).

1.1.2.2 Transmissão

Apesar da ampla distribuição mundial da infecção pela *H. pylori*, os mecanismos específicos de transmissão da bactéria seguem desconhecidos (Frenck *et al.*, 2003; Axon, 2006; Ahmed *et al.*, 2006). Podendo-se afirmar apenas que a bactéria por ser não-invasiva, só consegue alcançar a mucosa gástrica pela boca (Goodwin *et al.*; 1997; Kodaira *et al.*, 2002).

A transmissão de um agente infeccioso requer exposição e susceptibilidade do hospedeiro, a qual não está bem compreendida para a *H. pylori* (Everhart, 2000). A maior questão a se esclarecer é como a *H. pylori* passa do estômago de uma pessoa para o de outra (Dunn *et al.*, 1997).

As elevadas taxas de prevalência da infecção pela *H. pylori* em indivíduos que vivem em aglomeração intrafamiliar (Aguemon *et al.*, 2005; Konno *et al.*, 2005), assim como a similaridade entre os genótipos de cepas infectantes de membros da mesma família, propõe que um dos principais meios de transmissão seja de pessoa para pessoa (Drum *et al.*, 1990; Malaty *et al.*, 1991; Cartagenes, 2003). Porém, ainda não é possível determinar se a principal via de transmissão é oral-oral ou fecal-oral, provavelmente ambos atuem simultaneamente em níveis populacionais (Kodaira *et al.*, 2002).

A transmissão do tipo oral-oral propõe que a cavidade oral serviria de reservatórios da infecção e reinfecção pela *H. pylori*, pois a regurgitação do suco gástrico pode contaminar a boca. O isolamento da *H. pylori* de amostras da placa dentária, saliva e vômitos indicam esse tipo de transmissão. Portanto, a eliminação da *H. pylori* da cavidade oral pode ser uma forma de evitar a recolonização desta bactéria no estômago, além de evitar a transmissão pela rota oral-oral (Parsonneet *et al.*, 2000; Czesnikiewicz-Guzik *et al.*, 2004; Czesnikiewicz-Guzik *et al.*, 2005; Loster *et al.*, 2006).

Na transmissão fecal-oral os pesquisadores admitem que o homem seja o reservatório da *H. pylori*, sendo eliminada nas fezes, contaminando alimentos que podem servir de veículos de transmissão (De Shryver *et al.*, 2006).

Fontes de transmissões adicionais, como a água, podem ser importantes em países em desenvolvimento. Esta hipótese é defendida em vários estudos que sugerem a contaminação, através das fezes, dos sistemas de irrigação pela rede de esgotos (Torres *et al.*, 2000; Horiuchi *et al.*, 2001, Graham & Malaty, 2002; Queralt *et al.*, 2005).

Já a transmissão iatrogênica seria ocasionada por instrumentos contaminados com secreções gástricas, sobretudo quando não é bem feita a descontaminação do equipamento (Langenberg *et al.*, 1990; Feldman *et al.*, 1998). Além disso, este possível meio de transmissão pode ser responsável pela reinfecção por ocasião de um novo exame (Cutler & Schubert, 1993; Schutze *et al.*, 1995; Coelho *et al.*, 1998).

Existe um risco aumentado para os profissionais da área da saúde de adquirirem a infecção pela *H. pylori* através dessa rota de transmissão, como no caso de médicos endoscopistas e dentistas que entram em contato com secreções gástricas e orais infectadas (Braden *et al.*, 1997; Deltenre & Koster, 2000; De Schyver *et al.*, 2004).

Não existem evidências de transmissão zoonótica, embora a *H. pylori* seja encontrada em primatas não humanos e ocasionalmente em outros animais (Dore *et al.*, 2001; Solnick, 2003). Vaira *et al.*(1988) relataram que funcionários envolvidos nos abatimentos de porcos têm um número maior de anticorpos anti- *H. pylori* do que os que trabalham em escritórios, e sugerem que os porcos poderiam ser fontes de infecção.

1.1.3 Morfologia

A *H. pylori* é uma bactéria Gram negativa que apresenta duas diferentes formas morfológicas: a espiralada e a cocóide. Ambas podem encontrar-se no estômago e duodeno (Goodwin & Armstrong, 1990; Dunn *et al.*, 1997).

A forma espiralada (Figura 2) apresenta – se como uma estrutura bacilar ou encurvada, tem em torno de 2,5 a 5 µm e 0,5 a 1 µm de espessura, de superfície lisa

e extremidades arredondadas, móvel, microaerofílica e cultivável a temperatura entre 30 a 37°C. Em geral, apresenta até 7 flagelos unipolares embainhados, em formato de hélices, os quais são essenciais para sua motilidade no muco gástrico. Cada flagelo possui aproximadamente 30 µm de comprimento e 2,5 nm de espessura (Dunn *et al.*, 1997; Marshall, 2002.).

A *H. pylori* na forma em espiral possui capacidade excepcional de aderência e é altamente adaptada para colonizar a mucosa gástrica, sendo observado três modos de colonização: livres no muco, aderidas à superfície das células do epitélio gástrico e intercelular, entre as células epiteliais (Goodwin & Armstrong, 1990; Heczko *et al.*, 2000

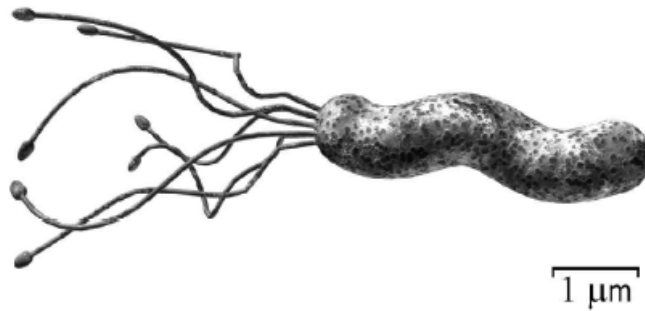


Figura 2. Imagem 3-D da *Helicobacter pylori*. Fonte: Marshall, 2002.

As formas cocóides (Figura 3), ao contrário das espiraladas, se aderem pouco as células e, tampouco são capazes de induzir a secreção de interleucinas 8 (IL-8) por estas células. Sendo assim, a aderência perdida sugere que essas formas se desprendem do epitélio gástrico e são menos dependentes da adesão para sobreviver (Sheri *et al.*, 1997).

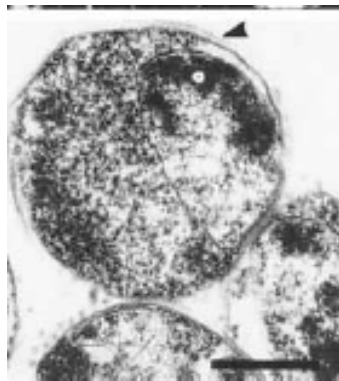


Figura 3. Forma cocóide da *Helicobacter pylori*. Fonte: Saito, 2003).

Alguns pesquisadores sugerem que a forma cocóide seja uma estrutura viável e de resistência frente às condições ambientais adversas: aerobiose, pH alcalino, alta temperatura, incubação prolongada, tratamento com antibióticos, com inibidores da bomba de prótons, óxido nítrico, etc (Adersen *et al.* 1997; Cole *et al.*, 1999; Velázquez & Feirtag, 1999).

Portanto, estaria envolvida nos mecanismos de transmissão da bactéria, sendo capaz de infectar água e alimentos, e reversível à forma em espiral no momento em que encontrasse condições favoráveis no meio ambiente (Goodman & Correa, 1995; Cave, 1997; Hultén *et al.*, 1998; Shahamat *et al.*, 2004).

Entretanto, outros estudos têm demonstrado que a forma cocóide seria um produto não viável de degeneração celular, devido perda no cultivo, na diminuição da densidade celular, em mudanças na parede celular e em outras estruturas associadas com a transformação bacteriana (Kusters *et al.*, 1997; Enroth *et al.*, 1999).

Por microscopia eletrônica, têm sido descritos dois tipos diferentes de transformação da forma espiralada para a cocóide. Sendo classificada como tipo A, o processo realizado por duas bactérias, que se unem pela extremidade dos flagelos, formando uma estrutura esférica, primeiramente envolvida por uma membrana irregular e finalmente assumem a forma cocóide. Ocorrendo também um provável processo de transferência horizontal de genes (Saito *et al.*, 2003).

No tipo B, a transformação para forma cocóide envolve somente uma bactéria e ocorre através de um processo passivo, que não requer síntese protéica, onde os flagelos se ligam a outra extremidade da bactéria, curvando-se em formato de “U” para finalmente terminar como forma cocóide (Saito *et al.*, 2003).

1.1.4 Genoma

A *H. pylori* é um importante patógeno humano, sendo que várias evidências apontam o genótipo desse microorganismo como um fator significativo na natureza das doenças gastrointestinais (Moblely, 1996; Mobley 1997). Por isso, a identificação e a caracterização da bactéria em nível genômico tornaram-se muito importante (Graham *et al.*, 2006).

Foram publicadas duas seqüências completas do genoma da *H. pylori*. A primeira, publicada em 1997 por Tomb *et al.* A partir do seqüenciamento da cepa 26695, isolada em um paciente com gastrite em 1987 no Reino Unido (Tomb *et al.*, 1997). Em 1999 o segundo genoma da linhagem J99 foi publicado, isolada nos Estados Unidos de um paciente com úlcera duodenal (Alm *et al.*, 1999).

Desde então, a disponibilidade dessas seqüências permitiu avaliar a diversidade genética da *H. pylori*, importante para identificação de fatores determinantes da virulência, contribuindo para uma melhor compreensão dos mecanismos de colonização inicial, persistência da bactéria e desenvolvimento de doenças como gastrite crônica ativa e úlcera péptica (Blaser & Berg, 2001; Oleastro *et al.*, 2006).

O genoma da *H. pylori* consiste de um cromossomo circular, com um tamanho em torno de 1,65 Megabases (Mb) e compreende cerca de 1.500 quadros abertos de leituras. Aproximadamente 40% das cepas de *H. pylori* isoladas possuem plasmídeos variando de 1,5 a 23,2 Kilobases (Kb), nos quais não foram encontrados genes que codifiquem fatores de virulência (Dunn *et al.*, 1997; Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999).

Através da comparação entre a organização do genoma das duas linhagens seqüenciadas, demonstrou-se que, tanto a ordem de genes como o proteoma das duas cepas foi muito similar. Além disso, mostrou-se que a maior parte do genoma e proteoma foram conservadas (Alm *et al.*, 1999).

Observou-se também que 20% dos genes são específicos da *H. pylori* e 7% são exclusivos de cada cepa (89 genes da cepa J99 e 117 genes da cepa 26695). A maioria desses genes cepa-específicos estão localizados em uma única e variável região do genoma, denominada zona de plasticidade (Marshall *et al.*, 1998; Alm *et al.*, 1997; Björkholm & Salama, 2003).

Ambos os genomas seqüenciados contém duas cópias dos genes *16S* e *23S–5S RNA ribossomal* nas mesmas regiões. Além disso, a cepa 26695 possui um gene extra do *5S RNA ribossomal (RNAr)*. Diferente de outras bactérias os genes *RNAr* da *H. pylori* não estão situados continuamente no cromossomo, sugerindo que seus mecanismos de regulação sejam mais complexos do que os de outros procariontes (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). Tais genes podem servir como marcadores específicos da *H. pylori* (Ho *et al.*; 1991; Gramley *et al.*, 1999, Booka *et al.*, 2005).

Estudos têm revelado 82 proteínas de superfície externa (OMPs), que apresentam massa molecular variando de 10 a 100 kDa, e que são definidas como proteínas de membrana externa ou secretoras. Dentre essas, 18 foram identificadas, como fatores de virulências essenciais (urease, catalase, e outros). De fato, as proteínas de superfície da *H. pylori* estão particularmente expostas ao sistema imune, e representam a maioria dos antígenos de superfície da bactéria (Sabarth *et al.*, 2002).

As proteínas secretoras estão localizadas no citoplasma da célula bacteriana e têm funções em outras células, indicando que poderiam ser usadas como projetores para a liberação de componentes intracelulares. Algumas dessas proteínas são identificadas como proteínas flagelares e provavelmente usam um sistema de reunião flagelar para sair da célula (Bumann *et al.*, 2002).

Algumas proteínas de membrana externa estão associadas a uma larga família de 32 moléculas de porinas denominadas Hop proteínas, sendo que cada proteína forma um único canal de baixa condutância num modelo de sistema de membrana de bicamada lipídica planar (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Baik *et al.*, 2004).

Essas proteínas Hop incluem as principais adesinas da *H. pylori*, e muitos outros genes de virulência bacteriana, sendo que um dos mecanismos responsáveis pela sua variação genotípica envolve ativação ou inibição por mutagenese mediada por um erro de pareamento na fita, favorecendo importantes interações com o hospedeiro (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999).

A variabilidade genética da *H. pylori* está associada a muitos genes, os quais têm papel significativo como fatores de virulência. Esses genes codificam proteínas com diferentes funções, isto é modificam as moléculas de superfície com atividade antigênica, controlam a entrada de DNA estranho dentro da bactéria, e influenciam na motilidade bacteriana (Dunn *et al.*, 1997).

Vários mecanismos contribuem para essa diversidade genômica, destacando-se os rearranjos intragênicos que podem ocorrer na bactéria: deleções, duplicações, inversões e translocações de partes do genoma. A *H. pylori* possui um grande número de seqüências de DNA repetitivo e várias cópias de seqüências de inserção IS605 por todo o cromossomo, podendo levar a muitos desses eventos de rearranjos genômicos (Marshall *et al.*, 1998; Alm *et al.*, 1999; Björkholm & Salama, 2003; Eppinger *et al.*, 2006).

No alinhamento dos dois genomas observam-se diferenças na organização, como regiões invertidas ou translocadas para outras regiões e em todas essas associações nota – se a presença de elementos de inserção ou elementos repetitivos (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999).

Outro mecanismo importante na constituição do DNA da *H. pylori* é a transferência horizontal de genes. A análise do conteúdo de G + C de algumas seqüências de *H. pylori* sugere que esses tenham sido adquiridos de outros procariontes, archaea, eucariontes (Solnick *et al.*, 1997; Goldman & Kranz *et al.*, 1998).

Um total de cinco regiões do genoma da *H. pylori* tem diferenças significativas na percentagem de G + C quando comparado com o resto do genoma (Suerbaum & Achtman, 1999; Garcia-Vallvé *et al.*, 2002). Dentre essas diferenças destaca-se a ilha de patogenicidade cag, que pode ter vindo para espécie *H. pylori* dentro de um elemento IS605 (Suerbaum *et al.*, 1999; Garcia-Vallvé *et al.*, 2002; Busler *et al.*, 2006).

As mutações de ponto por erro na replicação, também se destacam na *H. pylori* sendo importantes, principalmente no desenvolvimento de resistência a antibióticos. A resistência é usada como estratégia para adaptação a mudanças do ambiente, pois essa bactéria possui um sistema de reparo pouco evoluído (Wang *et al.*, 1999; Garcia-Vallvé *et al.*, 2002).

A *H. pylori* é competente para transformação natural e aparentemente recombina com eficiência o DNA ganho por transformação no genoma, levando a uma considerável diversidade genotípica e recombinação entre diferentes linhagens, esses eventos estão associados em grande número a um sistema de restrição – modificação (R-M) encontrado em várias cepas da bactéria (Alm *et al.*, 1999; Björkholm & Salama, 2003).

Este sistema R–M do tipo I atua como regulador transcricional da expressão dos genes de virulência da *H. pylori*, sendo que as cepas mais virulentas demonstram um maior acúmulo dos genes *hsdS*, que codificam a subunidade S desse sistema (Björkholm & Salama, 2003).

Apesar da *H. pylori* apresentar um genoma diverso, a diversidade entre cepas de populações geográficas distintas é diminuída. Isto seria explicado pela falta evidente de competição direta entre a maioria das cepas, mesmo quando residem em diferentes pessoas numa mesma comunidade; e pelo fluxo migratório humano

ocorrido há muitos anos, correspondendo a separação de cepas que as pessoas carregariam (Falush *et al.*, 2003; Hussain *et al.*, 2004).

A divergência entre cepas de *H. pylori* seria mais elevada pelas diferenças entre as características pessoais dos indivíduos para cepas individuais (Dubois *et al.*, 1999). Tais características poderiam incluir tipos de antígenos Lewis disponíveis para *H. pylori*, a especificidade e intensidade da imunidade e resposta inflamatória, e regulação do complexo de secreção ácida gástrica (Blaser & Berg, 2001; Martins *et al.*, 2006).

Como uma consequência da diversidade humana, qualquer cepa de *H. pylori* que tenha se tornado bem adaptada para seu hospedeiro atual (refletindo décadas de seleção) será sempre bem menos adaptada para outros indivíduos que a ingerirem. O estabelecimento da cepa no novo hospedeiro resultaria na seleção para genótipos melhores adaptados para seu novo ambiente, e então favorece a divergência de genótipos ancestrais (Blaser & Berg, 2001; Kraft *et al.*, 2006).

A *H. pylori* tem uma grande importância médica, portanto, mais estudos sobre a variabilidade observada nas regiões que codificam fatores de virulência dessa bactéria são necessários para esclarecer a grande diversidade clínica em relação à infecção por esse microorganismo (Alm *et al.*, 1997; Björkholm & Salama, 2003). Além disso, a elucidação dos padrões de populações das cepas de *H. pylori* é bastante significativa, contribuindo para o desenvolvimento de teste de diagnósticos, terapia antimicrobiana e vacinas (Falush *et al.*, 2003).

1.1.5 Fatores de virulência

A acidez e o peristaltismo da mucosa gástrica normalmente inibem a colonização bacteriana do estômago humano. Entretanto, a *H. pylori* desenvolveu mecanismos específicos que permitiram a sua adaptação e sobrevivência nesse ambiente impróprio (Moran, 1996).

Várias propriedades patogênicas estão envolvidas nesse processo e podem ser divididas em três classes (Figura 3): fatores de colonização, que permitem ao patógeno estabelecer-se no hospedeiro; fatores de persistência, que permitem colonização prolongada e sobrevivência da bactéria; e fatores indutores de doenças, os quais causam efeitos patológicos à mucosa gástrica (Moran, 1996).

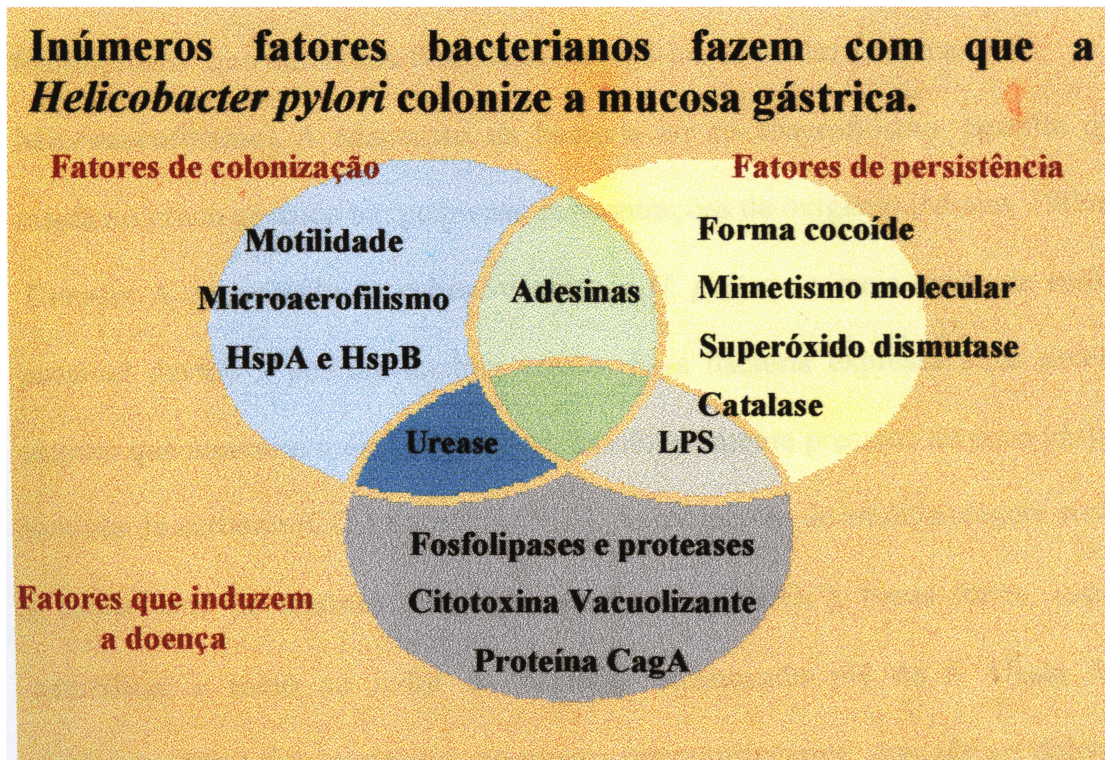


Figura 4. Fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade da *H. pylori*.
Fonte: Adaptado de Moran, 1996.

1.1.5.1 Fatores de colonização

A capacidade de colonizar a superfície do epitélio gástrico abaixo da camada de muco é muito importante para a sobrevivência da *H. pylori* no ambiente gástrico e está relacionada a vários fatores de colonização, dentre os quais se destacam:

- a) **Motilidade:** a forma espiralada e a presença de flagelos unipolares conferem à *H. pylori* uma motilidade eficiente na camada de muco gástrico, dificultando sua eliminação através de mecanismos de defesa do hospedeiro e permitindo sua aproximação às células epiteliais gástricas (Dunn *et al.*, 1997; Go & Crowe, 2000).
- b) **Microaerofilismo:** permite a bactéria residir no muco em pequenas concentrações de oxigênio (Moran, 1996).
- c) **Urease:** a resistência ao ácido clorídrico é de vital importância na patogenia da *H. pylori*, já que este atributo biológico permite a colonização da bactéria na

mucosa gástrica (Moblely *et al.*, 1997). A enzima urease compreende cerca de 6% do total de proteínas sintetizadas pela *H. pylori*, o que representa grande investimento energético motivado pela sua ação essencial como fator de virulência (Jenks & Klusters, 2000).

A *H. pylori* possui um grupamento de sete genes para expressão da urease: os genes *ureA*, *ureB* e *ureC*, que codificam duas subunidades estruturais da enzima; os genes *ureE*, *ureF*, *ureG* e *ureH*, que codificam proteínas acessórias necessárias para a união das primeiras subunidades, e o *ni2* que tem função de ativar a enzima urease (Moblely *et al.*, 1995).

A *H. pylori* expressa altos níveis desta enzima, que atua promovendo a hidrólise da uréia, presente em condições fisiológicas no muco gástrico, levando à produção de amônia. Esta atua como receptor de íons H⁺, gerando pH neutro no meio ao redor da bactéria, protegendo-a temporariamente dos efeitos deletérios do pH ácido do estômago (Murakami *et al.*, 1990; Marshall, 1998; Aguilar *et al.*, 2001; Weeks & Sachs, 2001).

Além disso, existem evidências de que a amônia e a urease causam lesões histológicas na mucosa, devido sua atividade quimiotática a leucócitos, estimulando o processo inflamatório (Moran, 1996; Montecucco *et al.*, 1999; Go & Crowe, 2000).

d) Proteínas do choque térmico (HspA e HspB): parecem aumentar a atividade da urease e influenciam na habilidade do patógeno a tolerar as condições extremas do estômago (Dunn *et al.*, 1997).

e) Adesinas: a adesão da *H. pylori* às células epiteliais é importante para garantir sua colonização. As adesinas são moléculas superficiais da bactéria, as quais reconhecem especificamente determinados receptores da mucosa gástrica, que são estruturas glicoconjugadas e se unem a eles, iniciando a colonização bacteriana (Moran, 1996; Dunn *et al.*, 1997; Covacci *et al.*, 1999).

A adesão da bactéria ao epitélio gástrico ainda não está totalmente elucidada, alguns estudos têm demonstrado que a adesina BabA da *H. pylori* utiliza como receptor os antígenos fucosilados de grupos sanguíneos Lewis^b (Le^b) e H tipo 1, expressos na superfície epitelial da mucosa gástrica (Ilver *et al.*, 1998; Covacci *et al.*, 1999; Appelmelk & Grauls, 2000; Crawford, 2000; Kandel, 2000).

1.1.5.2 Fatores de persistência

A infecção pela *H. pylori* leva a um processo inflamatório crônico, devido ativar a resposta imunológica do hospedeiro. Para sua persistência nesse ambiente a bactéria possui mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, entre eles destacam – se:

a) Lipossacarídeos (LPS): também denominadas endotoxinas, são glicolípídeos tóxicos fosforilados, encontrados na parede celular bacteriana, nas quais atuam como principal antígeno de superfície envolvido no processo de escape da bactéria do sistema imunológico do hospedeiro (Alppelmelk *et al.*, 1997; Covacci *et al.*, 1999; Hamajima *et al.*, 2006).

Em algumas cepas da *H. pylori* os LPS expressam antígenos glicoproteicos similares aos antígenos de grupos sanguíneos Lewis (Le^x , Le^y , Le^a , Le^b) presentes, normalmente, na mucosa gástrica. A cadeia externa dos LPS é idêntica a dos antígenos de grupo sanguíneos Le^x e Le^y (Covacci *et al.*, 1999; Alppelmelk & Grauls, 2000; Martins *et al.*, 2006).

b) Mimetismo molecular: a resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção parece insuficiente para erradicar a bactéria. Isto pode ocorrer devido ao mecanismo de escape da *H. pylori*, onde o mimetismo dos antígenos de grupos sanguíneos Lewis pode resultar em uma tolerância imunológica contra os antígenos da bactéria ou induzir a produção de autoanticorpos que reconhecem células epiteliais da mucosa gástrica (Alppelmelk *et al.*, 1997; Shimoyama & Crabtree, 1998).

O mimetismo camufla a *H. pylori* e os seus antígenos, permitindo que o patógeno sobreviva e escape do reconhecimento da resposta imune do hospedeiro, contribuindo para cronicidade da infecção (Dunn *et al.*, 1997).

c) Forma cocóide: é considerada uma forma de resistência, a partir da forma bacilar, importante no processo de adaptação transitória às condições impróprias do ambiente. Sugere-se que seja viável, metabolicamente ativa, porém com sua atividade reduzida, incapaz de sofrer divisão celular. Garante a *H. pylori* sua sobrevivência no meio, até chegar ao estômago do hospedeiro, aonde irá se replicar (Dunn *et al.*, 1997; Covacci *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 1999; Velázquez & Feirtag, 1999).

d) Catalase e superóxido dismutase: são enzimas bacterianas envolvidas no mecanismo de escape da *H. pylori*, associadas à resistência bacteriana, que atuam na neutralização da ação oxidativa tóxica de radicais livres, sobretudo dos neutrófilos polimorfonucleares (Dunn *et al.*, 1997).

1.1.5.3 Fatores indutores de doenças.

Os mecanismos patogênicos responsáveis pela grande variedade de manifestações clínicas da *H. pylori* precisam ser ainda melhor esclarecidos. Além dos fatores de colonização e persistência, que contribuem com a alteração da fisiologia gástrica e o surgimento de processos inflamatórios na mucosa, citam – se os seguintes fatores indutores de doenças nos seres humanos.

a) Fosfolipases e proteases: são enzimas da *H. pylori* responsáveis pela degradação da estrutura polimérica das glicoproteínas da camada de muco gástrico e também de causar lesão no epitélio, pois degradam componentes das células epiteliais gástricas (Dunn *et al.*, 1997).

b) Citotoxina vacuolizante ativa (VacA): considerada um importante fator de virulência, sendo a principal toxina secretada pela *H. pylori* (Debellis *et al.*, 2001; Salama *et al.*, 2001). O gene *vacA*, o qual codifica esta proteína, está presente em quase todas as cepas dessa bactéria, porém a VacA é produzida por aproximadamente 50% das cepas (Telford *et al.*, 1994).

A proteína VacA forma uma estrutura monomérica que é composta na região carboxiterminal pelo domínio P58 responsável pela ligação do monômero ao receptor celular e na porção aminoterminal pelo domínio P37 importante na internalização da toxina e desenvolvimento do processo de intoxicação celular. O desenvolvimento de mutações deletéricas no domínio P37 resultou numa toxina que conseguia ligar-se a célula alvo, mas não era endocitada e nem causava vacuolização nas células (Telford *et al.*, 1994; Cover *et al.*, 1994; Ye *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2001).

A citotoxina VacA induz a formação de vacúolos ácidos no citoplasma das células epiteliais gástricas, sendo responsável pela erosão e degeneração das células, interferindo com a fusão intracelular da membrana (HARRIS *et al.*, 1996). Recentemente foi demonstrado também que esta toxina possui capacidade de

enfraquecer as junções celulares (Papini *et al.*, 1998; Montecueco *et al.*, 2001). A VacA está associada com quadros mais graves da infecção pela *H. pylori* (Castillo-Rojas *et al.*, 2004).

O gene *vacA* da *H. pylori* compreende duas regiões variáveis, *s* e *m*. A região *s* (codifica o sinal peptídico) está localizada no final da cadeia 5' e possui os alelos, *s1a*, *s1b*, *s1c* ou *s2*; a região média (*m*) possui os alelos *m1* ou *m2*. A combinação em mosaico dos alelos da região *s* com os da região *m* determina a produção de citotoxinas, responsáveis pelo grau de virulência da bactéria (Atherton *et al.*, 1995; Atherton *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2001).

As cepas portadoras do genótipo *vacA s1/m1* produzem grande quantidade de toxina, enquanto as cepas *s1/m2* e *s2/m1* produzem quantidade moderada; e as cepas *s2/m2*, pouca ou nenhuma toxina. As cepas *vacA* do tipo *s1a* parecem ser mais patogênicas que as *s1b* e *s1c* ou *s2*, sendo mais relacionadas a úlcera péptica. As cepas do tipo *m1* estão associadas a maior risco de danos às células epiteliais do que as do tipo *m2* (Cover *et al.*, 1994; Atherton *et al.*, 1995; Van-Doorn *et al.*, 1998, Díaz *et al.*, 2005).

c) Citotoxina associada ao gene A (CagA): algumas cepas da *H. pylori* produzem uma proteína imunodominante denominada CagA. Essa é codificada pelo gene *cagA*, que está localizado na ilha de patogenicidade *cag* (*cag* – PAI), sendo utilizado como marcador desta ilha. Baseado na presença ou ausência da proteína CagA, as cepas da *H. pylori* têm sido classificadas como *cagA* positivas ou negativas (Telford *et al.*, 1994; Covacci, *et al.*, 1999; Tummuru *et al.*, 1993).

A ilha *cag*-PAI possui 35 a 40 Kb, comporta mais de 30 genes e é encontrada em cerca de 60% das cepas ocidentais. A *cag*-PAI é um componente do genoma da *H. pylori*, cujos genes codificam componentes do sistema de secreção tipo IV, que atua como agulha ao servir para introduzir a proteína CagA no citoplasma das células gástricas, permitindo que a bactéria module vias do metabolismo celular da célula hospedeira (Telford *et al.*, 1997; Shimoyama & Crabtree *et al.*, 1998; Ondebreit *et al.*, 2000; Blaser & Atherton *et al.*; 2004).

Alguns trabalhos têm demonstrado que cepas *cagA* positivas quando inoculadas em culturas de células do câncer gástrico provocam modificações na morfologia destas. Isto se deve aos componentes da *H. pylori* que induzem alterações na fosforilação de tirosinas, nas vias de sinalização e de transdução da célula hospedeira, resultando em rearranjos do citoesqueleto e alterações

morfológicas que estimulam o acentuado alongamento e aumento celular, sendo essas alterações denominadas “fenótipo Beija – flor” (Asahi *et al.*, 2000; Evans Jr & Evans, 2001; Hatakeyana *et al.*, 2003).

Além disso, vários estudos mostram que as cepas *cagA* positivas tendem a ser mais virulentas e estão associadas com aumento na liberação de mediadores inflamatórios na mucosa gástrica. Conseqüentemente, estão envolvidas no desenvolvimento de patologias gástricas graves como: gastrite atrófica, úlcera péptica e câncer gástrico (Kuipers *et al.*, 1995; Cabtree *et al.*, 1991; Rugge *et al.*, 1999; Nomura *et al.*, 2002). Porém, alguns trabalhos, principalmente da região asiática, não têm confirmado essa associação (Kodama *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2004).

Apesar da citotoxina CagA ser um importante fator de virulência da *H. pylori*, sua presença não é suficiente para determinar um prognóstico das manifestações clínicas associadas na infecção por essa bactéria (Hatakeyama *et al.*, 2003; Blaser & Atherton, 2004). Alguns estudos têm descrito polimorfismo na proteína CagA que podem alterar a atividade funcional desta toxina (Hatakeyama *et al.*, 2003; Blaser & Atherton, 2004; Hatakeyama & Brzozowski, 2006).

Esses polimorfismos ocorrem nos sítios de fosforilação de tirosina do gene *cagA* denominadas EPIYA, correspondentes a porção C terminal da proteína CagA. De modo geral, diferentes cepas de *H. pylori* possuem “motifs” EPYIA–A e EPIY–B conservados, e o “motif” EPIYA–C que pode ser duplicado ou triplicado. O “motif” EPIYA–C é o principal sítio de fosforilação da proteína CagA. Sendo que o número de repetições deste “motif” aumenta quanto maior é o poder de fosforilação da proteína (Yamaoka *et al.*, 1998a; Yamaoka *et al.*, 1998b; Higashi *et al.*, 2002; Higashi *et al.*, 2005).

1.1.6 Resposta imunológica

A alteração histológica mais evidente na mucosa gástrica, induzida pela presença da *H. pylori*, é a resposta inflamatória (Figura 5), cuja atividade depende da capacidade de resposta do hospedeiro e da atividade bacteriana. Esse processo inflamatório é caracterizado por um intenso infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria da mucosa gástrica, como células plasmáticas, linfócitos, neutrófilos e

monócitos, acompanhada de erosão do epitélio (Dunn *et al.*, 1997; Telford *et al.*, 1997; Shimoyama & Crabtree, 1998).

A *H. pylori*, na fase de colonização, necessita atravessar a camada de muco que protege o epitélio gástrico, representando a primeira linha de defesa contra a bactéria (Jenks & Kluster, 2000). As células epiteliais da mucosa gástrica, a partir da adesão e presença de antígenos da bactéria, tais como a urease, o LPS e as citotoxinas, são estimuladas a secretarem citocinas pró-inflamatórias, tal como a IL-8, que iniciam a resposta imune contra a invasão do patógeno (Shimoyama & Crabtree, 1998, Suerbaum & Michetti, 2002; Tseng *et al.*, 2006).

Além da IL – 8, um importante mediador inflamatório, a infecção pela *H. pylori* induz a secreção de outras quimiocinas produzidas por macrófagos, neutrófilos, células NK (Natural Killer) e células epiteliais em geral, as quais apresentam propriedades que atraem neutrófilos. Esta resposta pró-inflamatória epitelial é particularmente importante, pois conduz a uma rápida mobilização de células fagocíticas para o sítio da invasão (Aguilar *et al.*, 2001; Israel *et al.*, 2001, Naito & Yoshikawa, 2002).

O recrutamento de neutrófilos corresponde ao evento inicial da resposta inflamatória ao patógeno. Porém, quando cronicamente ativados apresentam propriedades que contribuem aumentando a lesão tecidual, pois além de atuarem na fagocitose e digestão das bactérias, liberam também seus grânulos e substâncias tóxicas, como potentes enzimas intracelulares, que agem como um mecanismo patogênico importante (Shimoyama & Crabtree, 1998; Suerbaum & Michetti, 2002; Marshall, 2002).

A ação neutrofílica é persistente, porém ineficaz na eliminação da *H. pylori* devido à ação de enzimas sintetizadas pela bactéria, tais como superóxido dismutase e catalase, que conferem proteção contra a atividade lítica dos neutrófilos, impedindo uma resposta eficaz do hospedeiro (Shimoyama & Crabtree, 1998; Hazell *et al.*, 1991).

Os antígenos liberados pela *H. pylori* durante a infecção também induzem macrófagos para a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e IL-8. Desta forma, estas células apresentadoras de antígenos, também são responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias para dentro da lâmina própria (Telford *et al.*, 1997; Tseng *et al.*, 2006).

Seguindo a fase de inflamação, a contínua exposição ao patógeno resulta na ativação da resposta imune específica, e diferentes subgrupos de células T emergem. Durante esta fase os linfócitos T auxiliares (T-CD4+) estimulados direcionam a resposta imune tanto para o perfil Th1 quanto Th2. Todavia, há predomínio das células Th1, caracterizando a resposta celular. Isto conduz a uma resposta imunológica inadequada, que não consegue eliminar o microorganismo (Ernst *et al.*, 1997; Suerbaum & Michetti, 2002).

E mais, células Th1 induzem a produção de citocinas, como interferon γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), em resposta a estimulação antigênica, contribuindo para o aumento do processo inflamatório, como conseqüentes danos às células do hospedeiro (Hamajima *et al.*, 2006)

Esta orientação Th1 pode ser devido à produção aumentada de interleucina – 18 na mucosa do antro gástrico em resposta a infecção pela *H. pylori*. E a predominância da resposta Th1 é mais freqüente em pacientes com úlcera péptica ou duodenal (Bamford *et al.*, 1998; Suerbaum & Michetti, 2002).

Fox *et al.* têm demonstrado que, pacientes infectados por helmintos tendem a desenvolver resposta predominantemente do tipo Th2 e estes quando infectados pela *H. pylori* raramente desenvolvem patologias graves. Esse fato explicaria o enigma africano, onde se observam uma alta prevalência da infecção pela *H. pylori* e uma baixa freqüência na ocorrência de patologias gástricas (Fox *et al.*, 2000).

A resposta humoral também é observada onde anticorpos do tipo IgG, na sua grande maioria, agem contra vários antígenos da bactéria. Contudo, estes não conferem proteção e nem evitam nova infecção. Esses anticorpos diminuem somente após a eliminação da bactéria, evento que raramente ocorre espontaneamente (Marshall, 1994).

Sendo assim, tanto a diversidade genotípica das cepas de *H. pylori* expressando produtos bacterianos específicos, como os fatores imunológicos do hospedeiro poderiam explicar os diferentes graus de resposta inflamatória, resultando em diferentes estados patológicos em humanos, tais como gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico (Blaser & Berg, 2001; Hamajima *et al.*, 2006).

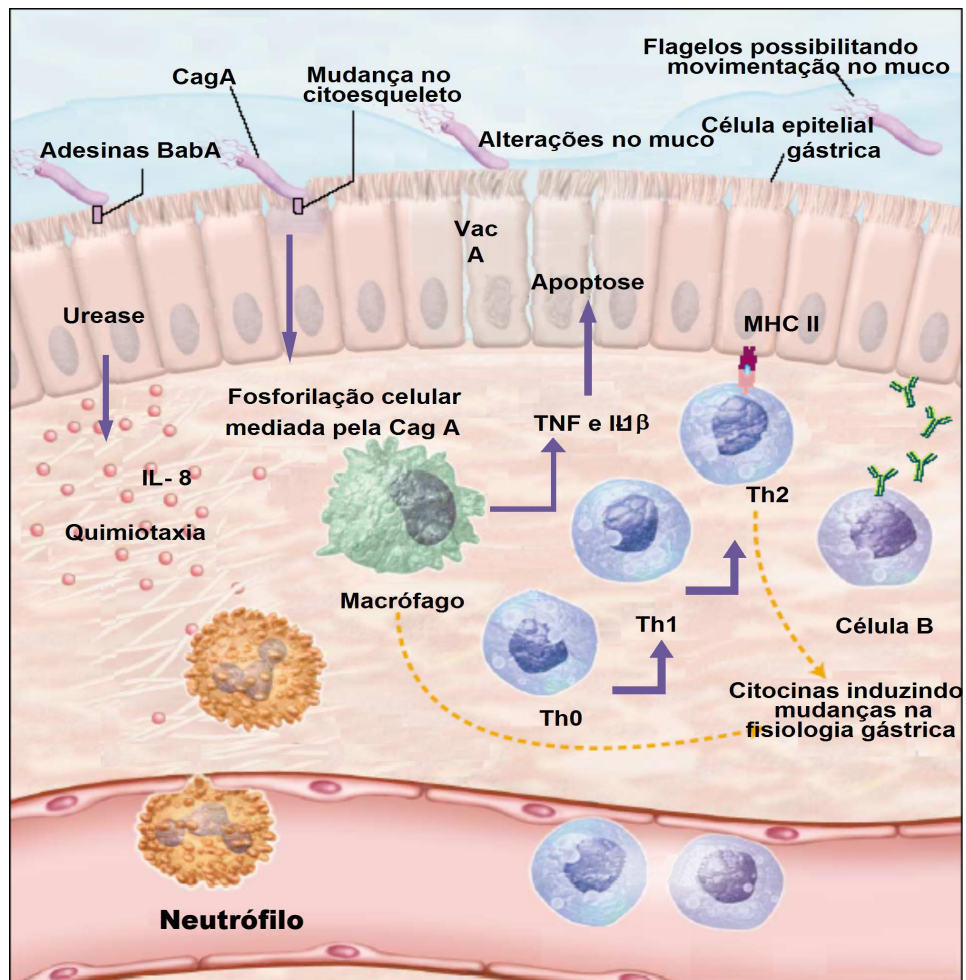


Figura 5. Representação esquemática da resposta imune à infecção pela *H. pylori*
 Fonte: Suerbaum & Michetti, 2002.

1.1.7 Patologias associadas à infecção pela *H. pylori*

A grande diversidade genética entre as cepas da *H. pylori* pode estar associada com as diferentes manifestações clínicas, bem como com a intensidade da inflamação gástrica (Blaser & Berg, 2001; Hamajimi *et al.*, 2006).

Admite-se que a infecção pela *H. pylori* seja adquirida principalmente na infância e, a menos que tratada, pode permanecer por décadas e provavelmente por toda a vida do indivíduo (Kodaira *et al.*, 2002). Esses portadores assintomáticos, que representam em torno de 50% das pessoas infectadas pela bactéria, estão intimamente relacionados à infecção por cepas não virulentas ou tipo II (Ravel, 1997; Montecucco *et al.*, 1999; Chelimsky & Cziss, 2000).

Os demais indivíduos infectados poderão apresentar manifestações clínicas, que se traduzem por desconforto abdominal alto, náuseas, vômitos, eructações e pirose. O paciente também pode referir indigestão e distensão abdominal, ou sensação de estômago vazio, dentre outros sinais e sintomas (Sheff, 2005). Destes indivíduos, alguns podem evoluir para a cura espontânea da infecção (Rowland *et al.*, 1999).

Sabe-se que a extensa atrofia no corpo do estômago, bem como o uso de antimicrobiano, justifica o declínio da prevalência, inclusive em idosos (Everhart, 2000; Kodaira *et al.*, 2002). Dentre todos os indivíduos infectados, 10% a 20% poderão desenvolver doenças, sendo as mais comuns, gastrite crônica ativa e a úlcera péptica.

Estudos demonstram que o tempo de duração da infecção pela *H. pylori* está diretamente relacionado ao desenvolvimento de linfoma do tecido linfóide associado à mucosa do estômago (MALToma) e carcinoma gástrico (Drumm *et al.*, 1990; Forman *et al.*, 1990; Bourk *et al.*, 1996; Warren, 2000; Miszputen, 2001; Mincis, 2001).

Em geral a inflamação pela *H. pylori* é confinada à mucosa do antro gástrico e os pacientes com gastrite antral possuem maior predisposição a desenvolver úlcera gástrica, gastrite atrófica e adenocarcinoma gástrica (Jones, 1986; Stevens & Lowe, 1998; Raso *et al.*, 2000).

A infecção pela *H. pylori* tem sido detectada em 90% a 100% dos pacientes com úlcera duodenal, em 70% a 90% nos pacientes com úlcera gástrica, e 20 a 25% dos pacientes com câncer gástrico (Kuruta & Nogaywa, 1997; Ravel, 1997; Stringer *et al.*, 2000; Gisbert *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2002). Além disso, a associação entre a infecção pelo *H. pylori* com o desenvolvimento de úlcera péptica já está bem estabelecida (NIH consensus conference).

As cepas da *H. pylori* são agrupadas em duas grandes famílias, tipo I e tipo II, baseadas no seu maior ou menor grau de virulência, respectivamente. Isto inclui principalmente a presença da cag-PAI, com a CagA, e a expressão da VacA. Cepas tipo I são positivas para essas características, enquanto que as do tipo II não expressam CagA e apresentem o gene *vacA*. As cepas tipo II podem apresentar o gene *vacA*, porém esta proteína codificada não é secretada ou é inativa (Censini *et al.*, 1996; Marwick, 2000; Aguilar *et al.*, 2001).

A maioria dos pacientes com úlcera duodenal e carcinoma gástrico apresenta infecção por cepas do tipo I. Este fato sugere que as citotoxinas CagA e VacA estão associadas com inflamações mais severas na mucosa gástrica, podendo atuar na patogenicidade destas doenças. Grande parte das crianças com cepas que apresentam esses marcadores de virulência está mais predisposta a desenvolverem úlcera duodenal (Cover & Blaser, 1999; Lopez-Brea, 2002; Thompson, 1999; Chelimsky & Cziss, 2000; Rocha *et al.*, 2000).

Atualmente tem sido bastante ressaltada a associação da presença da VacA e da CagA, com aumento da inflamação gástrica que conduz a quadros clínicos mais severos (Martins *et al.*, 2005). Existe uma forte associação entre a presença de CagA e o risco aumentado úlcera péptica e câncer gástrico (Chehter, 1999; Nomura *et al.*, 2002; Dhar *et al.*, 2003; Hatakeyama & Brzozowski, 2006).

A infecção pela *H. pylori* nas crianças pode ser a causa da má nutrição, diarreia crônica e baixa estatura. Alguns estudos têm demonstrado que crianças infectadas com cepas CagA apresentam freqüentemente dores abdominais e vômitos (Bode *et al.*, 1998; Elitsur & Yahav, 2005; Mourad-Baars & Chong, 2006).

A incidência de úlceras em crianças é baixa, porém, assim como em adultos, 90% das úlceras duodenais são associadas com *H. pylori* no estômago (Kimia *et al.*, 2000).

Apesar de outras causas de distúrbios gástricos serem praticamente irrelevantes neste grupo, podem existir casos com problemas dispépticos ou dores abdominais recorrentes, os quais tornam difícil o diagnóstico das doenças em crianças (Macarthur *et al.*, 1999; Kimia *et al.*, 2000; Lynch & Lynch, 2000).

1.1.8 Diagnósticos

Atualmente existem vários métodos de diagnósticos para detecção da *H. pylori*, que são classicamente divididos em endoscópicos e não endoscópicos (Gisbert, 2000; Dzierzanowska–Fangrat *et al.*, 2006). No primeiro é feita a coleta de biópsia gástrica por testes endoscópicos para demonstração da presença dessa bactéria diretamente pela histologia, cultura ou reação em cadeia da polimerase (PCR) ou indiretamente pela avaliação da urease (Wilcox *et al.*, 1996; Dunn *et al.*; 1997; Braden *et al.*, 2001, Mousavi *et al.*, 2006).

Entre as técnicas não endoscópicas, a sorologia e teste respiratório com o carbono marcado são amplamente usados (Braden *et al.*, 2001). Os testes sorológicos são fáceis de ser realizar e baratos, entretanto, não devem ser utilizados na monitoração da terapia de erradicação bacteriana, pois os títulos de anticorpos específicos anti – *H. pylori* diminuem lentamente durante 6 a 12 meses após erradicação da infecção com antibiótico. Já o segundo apesar de ser seguro e preciso, requer instrumentação cara e torna-se oneroso (Raymond *et al.*, 2000; Yañes *et al.*, 2000, Rautelin *et al.*, 2003).

Além destes, recentemente, têm-se desenvolvido novos diagnósticos não invasivos baseado na utilização de amostras de fezes para pesquisa de antígenos e detecção do DNA da *H. pylori* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Makristathisthis *et al.*, 2000; Gisbert *et al.*, 2001). Esta alternativa de detecção da bactéria pode ser definitivamente considerada precisa e tem ganhado significativa importância no diagnóstico envolvendo crianças (Shuber *et al.*, 2002; Vinette *et al.*, 2004; Sabbi *et al.*, 2005; Mourad–Baars & Chong, 2006).

O diagnóstico baseado em método sorológico para pesquisa de antígeno da *H. pylori* em amostras fecais tem demonstrado ser um procedimento fácil e confiável, porém oneroso, servindo somente para indicar a presença ou ausência da bactéria. A PCR por ser um ensaio mais barato além de sensível e específico, tem sido usada com sucesso para detectar *H. pylori* nesse tipo amostral (Makristathisthis *et al.*, 2000; Kabir, 2001; Sen *et al.*, 2005). Além de fornecer informações adicionais, particularmente relacionadas com a presença de fatores de patogenicidade (*cagA* e *vacA*) ou resistência à antibióticos usados no tratamento desta infecção (Sicinschi *et al.*, 2003; Booka *et al.*, 2005).

Devido sua alta sensibilidade, a técnica de PCR possibilita detecção específica de DNA da *H. pylori* em material fecal, quando a bactéria está presente em baixos números ou na forma cocóide não cultivável (Westblom *et al.*, 1993; Shahamat *et al.*, 2004). Porém, exige um protocolo rigoroso para evitar que a reação seja inibida por material interferente presente na amostra, o qual pode influenciar na sensibilidade do método, com resultados falso-negativos (Braden & Caspary, 2001).

Além disso, para aplicar a técnica de PCR na rotina de diagnóstico laboratorial se faz necessário escolher oligonucleotídeos iniciadores sensíveis e específicos (Monteiro *et al.*, 2001; Bamford *et al.*, 1998; Cavallini *et al.*, 2000), sendo

que os genes *16S RNAr* e *ureA* têm sido utilizados na identificação da bactéria (Lu *et al.*, 1999; Gramley *et al.*, 1999; Chong *et al.*, 1996; Sen *et al.*, 2005).

Considerando as conseqüências clínicas da infecção, o uso da PCR como ensaio quantitativo acurado para detectar *H. pylori*, possibilitará que os estudos epidemiológicos tanto na população infantil, quanto em outros reservatórios, tais como os ambientais, sejam mais precisos na avaliação de fatores de risco envolvidos na transmissão e colonização da bactéria (Logan & Walker, 2001; Yakoob *et al.*, 2004, Queralt *et al.*, 2005; Mourad–Baars & Chong, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença da bactéria *H. pylori*, através da amplificação *in vitro* de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de fezes de crianças da cidade de Belém-Pará.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Padronizar um protocolo de extração de DNA da *H. pylori* em material fecal.
- b) Detectar a presença da infecção pela *H. pylori* nas crianças participantes do estudo através da técnica de PCR usando o gene constitutivo da urease (*ureA*), a partir de amostras fecais.
- c) Comparar a detecção da bactéria nas fezes por técnicas moleculares com testes sorológicos realizados anteriormente nessas mesmas amostras.
- d) Avaliar a acurácia e eficiência da técnica molecular para diagnóstico de *H. pylori* em fezes de crianças.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Neste trabalho, empregou-se o modelo de estudo descritivo – analítico observacional do tipo transversal.

3.1.1 Casuística

Foram utilizadas 79 amostras de crianças atendidas na Enfermaria de Pediatria do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), provenientes de um estudo soropidemiológico realizado na cidade de Belém – Pará no ano de 2003.

3.1.2 Critérios de Inclusão

Participaram do estudo crianças na faixa etária entre 1 e 12 anos, com qualquer diagnóstico médico, cujas mães consentiram suas participações através de um Termo de Esclarecimento e Consentimento Livre (Anexo - A).

3.1.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídas deste estudo crianças que estivessem em estado grave, definidas como em instabilidade hemodinâmica, e/ou sob cuidados intensivos de enfermagem.

3.2 QUESTÕES ÉTICAS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA) (Anexo - B).

3.3 PROCEDIMENTOS

A coleta de material biológico e o transporte das amostras ao Laboratório de Imunogenética foram realizadas no período compreendido entre os dias 12 de fevereiro e 18 de abril de 2001, e 18 de agosto de 12 de setembro de 2001.

3.3.1 Coleta e processamento das amostras

Um frasco devidamente identificado com o nome da criança foi oferecido à mãe. Esta recebeu informação para colher mais de um grama de fezes diretamente da criança, a fim de que não houvesse contato destas com a água do vaso sanitário, e após a coleta fossem imediatamente acondicionadas sob refrigeração. Dentro do período de uma a duas horas as amostras foram transportadas para armazenamento em -20°C no laboratório do HUIBB, de onde, posteriormente foram congeladas em recipiente de isopor refrigerado para o Laboratório de Imunogenética da UFPA. As fezes foram pesquisadas quanto à presença de antígenos da *H. pylori* pelo método de Elisa de captura e em seguida armazenadas a -20°C para estudos posteriores (Cartágenes, 2003).

3.4 TÉCNICAS LABORATORIAIS

3.4.1 Extração do DNA Bacteriano

O DNA total foi extraído a partir das amostras fecais de acordo com o método padronizado no Laboratório de Polimorfismo de DNA da UFPA, baseado no protocolo descrito por Gramley et al., (1999) e Hale et al., (1996):

➤ Adicionar a cada tubo de centrifuga contendo 1 grama de fezes de cada amostra, 5 mL do solução de lise [50 mM EDTA (Vetec), 50mM Tris pH 8.0 (Invitrogen Life Technologies), 0.5% Tween 20 (Pharmacia Biotech)] e 25µl de Proteinase K (Invitrogen Life Technologies) e 25µl de RNase A (USB Corporation).

- Agitar no vortex e incubar em banho-maria a 56°C por 30 minutos, com agitação.
- Centrifugar a 60 x g, por 3 minutos. Retirar 100 µl do sobrenadante e transferir para um microtubo de 1,5 ml, adicionar 100µl de 10% Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories).
- Agitar em vortex por 10s e incubar em banho-maria a 55°C por 30 minutos, com agitação.
- Inativar a proteinase K e RNase A, colocando os microtubos a 100°C por 8 minutos.
- Centrifugar a 469 x g por 3 minutos. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 ml e realizar a extração orgânica (fenol-clorofórmio).
- Adicionar fenol-clorofórmio-álcool-isoamil 1:1 para o volume de sobrenadante, agitar 5 minutos a mão e centrifugar 20 minutos a 5.000 rotações por minuto (rpm).
- Extrair o sobrenadante para outro microtubo de 1,5 ml e acrescentar o mesmo volume (1:1) de clorofórmio-álcool-isoamil (CIA – diluição 24:1), agitar 5' a mão e centrifugar a 5.000 rpm por 20 minutos.
- Transferir o sobrenadante para outro microtubo de 1,5 ml e adicionar 500µl (ou 1:10 do volume de sobrenadante) de acetato de sódio 3M (pH 5,0) e 5ml (ou 1:1) de álcool isopropílico.
- Centrifugar 1 min a 5.000 rpm por 5 minutos. Retirar o excesso de líquido, adicionar 500µl de etanol 70% e centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos.
- Retirar o etanol com pipeta, colocar na estufa a 37°C para secar entre 10-20 min e acrescentar cerca de 500µl de TE, deixar eluindo a 37°C por toda a noite sob agitação contínua a 300 rpm.
- O DNA extraído foi congelado a -20°C, para posterior análise.

3.4.2 Amplificação *in vitro* do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para realizar a detecção da bactéria *H. pylori* a partir do DNA das amostras fecais realizou-se a amplificação *in vitro* do DNA, com a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Os oligonucleotídeos iniciadores foram construídos utilizando o aplicativo PrimerExpress 2.0 (Applied Biosystems) a partir das seqüências nucleotídicas do genoma da espécie depositadas no banco público GenBank, para identificação do gênero *Helicobacter* (Acesso M57398), utilizando o gene *16S RNAr* (iniciadores desenhados por Délia Aguiar do laboratório de Imunogenética da UFPA), e para a identificação em nível específico da *H. pylori* (Acesso 31515), utilizando gene *ureA*.

As seqüências dos iniciadores e o tamanho esperado dos amplicons estão apresentados na tabela 1.

Nos casos em que houve resultados discordantes entre a sorologia para pesquisa de antígenos por HpSA e a técnica da PCR para identificação de *Helicobacter spp.* e *H. pylori*, foram usados oligonucleotídeos iniciadores para caracterização das linhagens virulentas *cagA* e variantes *s1a*, *s1b*, *s2*, *m1*, *m2* do gene *vacA* da *H. pylori* (tabela1), com o objetivo de confirmar a presença ou ausência da bactéria.

Tabela 1 Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores, temperaturas ótimas de anelamento, e tamanhos esperados do amplicons, dos genes *16S rRNA* para *Helicobacter spp.* e genes *ureA*, *cagA* e alelos *vacA* para *H. pylori*.

Região Amplificada	Designação do iniciador	Seqüência	Ta °C	Amplicon	Referências
<i>gene 16S rNAr</i>	F	5'GGCTAACTCCGTGCCAGCAG3'	58	51pb	Este estudo
	R	5'AGTAACGCTTGCACCCTCCG3'			
<i>Gene ureA</i>	Urea F	5' TGCATACCCCTATTGAGGCC3'	60	151pb	Este estudo
	Urea R	5'TGGAAGTGTGAGCCGATTTG3'			
<i>cagA</i>	F1	5'GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG3'	60	349pb	
	B1	5'CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA3'			
<i>M1</i>	VA3-F	5'GGTCAAAATGCGGTCATGG3'	58	199pb	
	VA3-R	5'CCATTGGTACCTGTAGAAAC3'			
<i>M2</i>	VA4-F	5'CCATTGGTACCTGTAGAAAC3'	58	290	Atherton et al, 1995
		5'GGAGCCCCAGGAAACATTG3'			
<i>s1a</i>	SS1-F	5'GTCAGCATCACACCCGCAAC3'	63	190	
	VA1-R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'			
<i>s1b</i>	SS3-F	5'AGCGCCATACCGCAAGAG3'	63	187	
	VA1-R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'			
<i>s2</i>	VA1-F	5'ATGGAAATACAACAAACCACAC3'	63	259	
	VA1-R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'			

3.4.3 Condições da PCR

As reações em cadeia da Polimerase foram realizadas em termociclador PTC-200 (MJ Research).

Para identificação do gênero *Helicobacter* pela PCR utilizou-se solução contendo: tampão de reação 1X [200mM Tris – HCl, 500mM KCl (pH 8.4)]; 1,5mM MgCl₂; 0,1mM de cada base nitrogenada; 0,2µl de *Taq* Polimerase (Invitrogen Life Technologies); 5pmoles de cada oligonucleotídeo; 7,0µl de amostra de DNA e água q.s.p. 25µl.

As misturas de PCR tanto para detecção da *H. pylori* como para genotipagem das linhagens virulentas constaram de: tampão de reação 1X [200mM Tris – HCl, 500mM KCl (pH 8.4)]; 3mM MgCl₂; 0,2mM de cada base nitrogenada; 1U de *Taq* Polimerase (Invitrogen Life Technologies); 10pmoles de cada oligonucleotídeo; 10µl de amostras de DNA e água estéril q.s.p. 25µl.

Os parâmetros da termociclagem estão listados na tabela 2.

Os produtos das PCRs foram monitorados por eletroforese submarina em gel de agarose a 2% (Sigma), corado com brometo de etídio (10 µg/ml) e visualizados em um transiluminador de UV no comprimento de onda de 260 nm e registrados fotograficamente.

Tabela 2. Condições da PCR para detecção da *H. pylori* e genotipagem das linhagens virulentas *cagA* e *vacA*.

PCR (ciclos)	Desnaturação Inicial		Desnaturação		Anelamento	Extensão		Extensão Final	
	°C	Tempo	°C	Tempo		°C	Tempo	°C	Tempo
<i>Helicobacter spp.</i> (45 ciclos)	94 °C	3'	94 °C'	1'	58 °C	72°C	1'	72 °C	3'
<i>H. pylori</i> (45ciclos)	94 °C	3'	94 °C	1'	58 °C	72°C	1'	72 °C	3'
gene <i>cagA</i> (40 ciclos)	94 °C	2'	95 °C	1'	60 °C	72 °C	1'	72 °C	10'
alelos <i>m1 e m2</i> (40 ciclos)	94 °C	2'	95 °C'	1'	58 °C	72 °C	1'	72 °C	10'
alelos <i>s1a, s1b,s2</i> (40 ciclos)	94 °C	2'	95 °C	1'	58 °C	72 °C	1'	72 °C	10'

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada usando o aplicativo BioEstat 4.0 (Ayres et al.2005), sendo que os resultados dos métodos de diagnósticos foram analisados pelo Teste de McNemar para avaliar o grau de discordância entre eles, e para verificar a reprodutibilidade desses resultados utilizou – se o teste Kappa. O limite de significância estatística adotado neste trabalho foi menor ou igual a 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 EXTRAÇÃO DO DNA DE AMOSTRAS FECAIS

Desenvolveu-se um protocolo próprio, combinado, para extração de DNA das fezes, visto que a utilização das metodologias descritas na literatura foi infrutífera. No protocolo de extração desenvolvido, adaptado dos trabalhos de Hale *et al* (1997) e Gramley *et al* (1999), as amostras fecais foram primeiramente tratadas com um tampão de lise celular constituído de solubilizadores lipídicos (Tris e EDTA) e detergente iônico (Tween) e não iônico (Triton).

Em seguida foi adicionado uma resina quelante (Chelex 100), que age como um adsorvente de íons metálicos, os quais atuam como catalisadores na ruptura do DNA a altas temperaturas podendo inibir a PCR , e é possível que também se ligue a outras substâncias inibitórias da reação. E ao final usou-se solventes orgânicos para a purificação do DNA.

A demonstração da presença de DNA bacteriano amplificável extraído das amostras de fezes foi feita através da PCR com oligonucleotídeos iniciadores para o gene *16S RNAr*, específico para o gênero *Helicobacter*. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, sendo observado o tamanho esperado de 51pb (Figura 6).

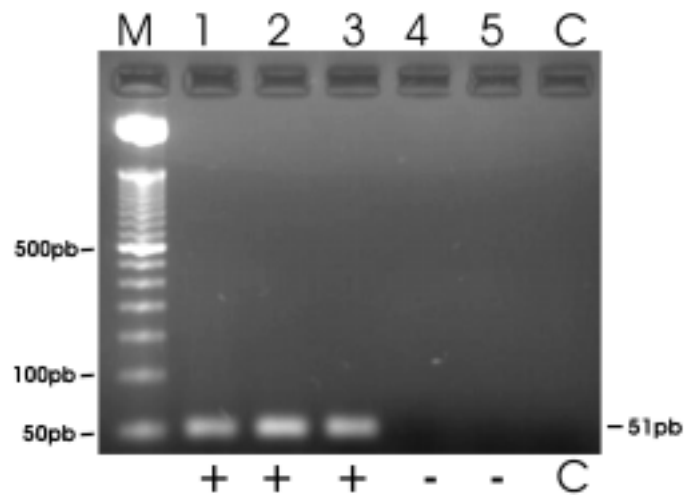


Figura 6. Resultados da análise de PCR para o gênero *Helicobacter* em amostras de fezes. O gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio ilustra a amplificação de 5 amostras de fezes de crianças, com um produto esperado de PCR de 51pb utilizando iniciadores para o gene *16S RNAr*. A Linha M representa o marcador molecular de DNA (Invitrogen Life Technologies, 50pb), as 5 linhas numeradas as amostras de fezes e a linha C representa o controle negativo (água purificada).

A tabela 3 mostra os resultados da PCR *16S RNAr* para o gênero *Helicobacter*. Do total de crianças investigadas, 84.81% (67/79) apresentaram *Helicobacter spp.* nas fezes e 15.19% (12/79) não apresentaram, confirmando o sucesso do protocolo padronizado para a extração de DNA bacteriano de amostras fecais.

Tabela 3 – Resultados referentes à presença de DNA através da PCR *16S RNAr* para o gênero *Helicobacter* em amostras fecais.

PCR <i>16S RNAr</i>	N	%
Ausente	12	15.19
Presente	67	84.81
Total	79	100

4. 2 - PCR NAS AMOSTRAS DE FEZES.

Na tabela 3 são apresentados os resultados referentes à detecção da infecção pela *H. pylori*, através da PCR usando gene *ureA*, nas amostras fecais das crianças. Sendo que 69.62% (55/79) e 30.38% (24/79) foi teste positivo e negativo, respectivamente (Figura 7)

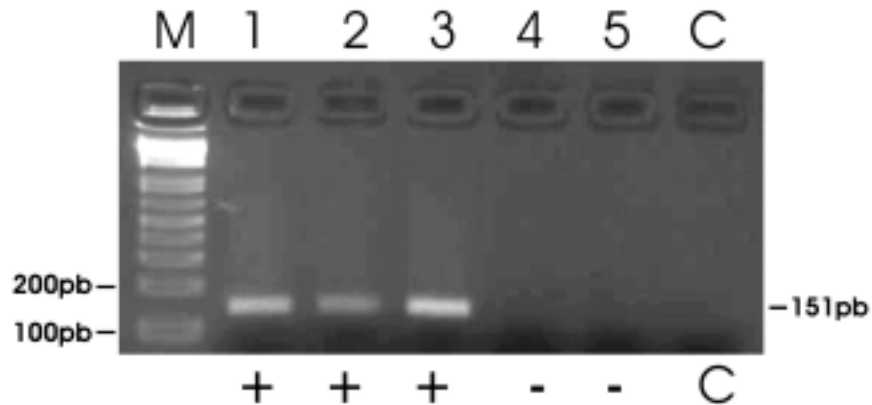


Figura 7. Resultados da análise de PCR para a espécie *H. pylori* em amostras de fezes. O gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio ilustra a amplificação de 5 amostras de fezes de crianças, com um produto esperado de PCR de 151pb utilizando iniciadores para o gene *ureA*. A Linha M representa o marcador molecular de DNA (Invitrogen Life Technologies, 100pb), as 5 linhas numeradas as amostras de fezes e a linha C representa o controle negativo (água purificada).

Além disso, comparou - se os resultados da PCR *ureA* e a pesquisa de antígenos fecais da *H. pylori* (ensaio imunoenzimático HpSA, Meridian, Cincinnati, OH,USA), realizada anteriormente num estudo soropidemiológico, nessas mesmas amostras (Cartágenes, 2003). Observando - se que 53.16% (42/79) apresentaram a infecção em ambos PCR *ureA* e HpSA, e 29.11% (23/79) foram teste negativo pelos dois métodos. Enquanto 16.46% (13/79) e 1.27% (1/79) foi teste positivo somente pela PCR *ureA* e HpSA, respectivamente.

Nesta análise (tabela 4), nota-se que esses dois métodos de diagnósticos são estatisticamente diferentes. Sendo que a prevalência da infecção nas crianças através da HpSA e PCR *ureA*, é de 54.43% (43/79) e 69.62% (55/79), respectivamente.

Tabela 4. Comparação entre HpSA e PCR *ureA* para diagnóstico da infecção pela *H. pylori* nas amostras fecais das crianças.

HpSA	PCR <i>ureA</i>				Total	
	Negativo		Positivo			
	N	%	N	%	n	%
Negativo	23	29.11	13	16.46	36	45.57
Positivo	1	1.27	42	53.16	43	54.43
Total	24	30.38	55	69.62	79	100

Teste χ^2 (McNemar B/C) = 8,643; $p = 0,0033$

O coeficiente de Kappa foi utilizado para verificar a concordância entre esses dois testes diagnósticos, testando-se a reprodutibilidade dos resultados. Isto é, de que casos positivos e negativos nos dois testes não sejam diferentes. A concordância observada foi de 57.59% (Kappa = 0.152, p (unil.) = 0.0246, $\alpha = 0.05$). Portanto, os resultados referentes ao teste sorológico HpSA não reproduzem as proporções do teste da PCR *ureA*.

Para excluir casos de falso positivo e falso negativo em 26 amostras fecais com resultados discordantes entre os métodos da PCR *ureA* e HpSA, realizou-se a genotipagem dos genes *cagA* e variantes *s1a*, *s1b*, *s2*, *m1*, *m2* do gene *vacA* específicos da *H. pylori* através da técnica de PCR.

De acordo com a tabela 5, dentre 13 casos negativos pela HpSA e positivos para PCR *ureA*, 8 apresentaram o gene *cagA* e as variantes *s1b/m1* (Tipol). Dos quais cinco que foram *cagA* negativo, 3 apresentaram genótipo *vacAs1b/m1* e 2 genótipo *vacAs1a/m1* (Tipoll). Confirmando, então, os casos positivos detectados pela técnica da PCR *ureA*.

Por outro lado, a genotipagem também mostrou que entre 13 casos negativos pela PCR *ureA*, sendo 1 caso positivo e 12 negativos por HpSA, nenhum apresentou nem o genótipo *cagA* e nem as variantes do gene *vacA*. Esses achados confirmam os resultados de ausência de DNA de *H. pylori* obtidos pela PCR *ureA* nessas amostras.

Tabela 5. Genotipagem dos genes *cagA* e *vacA* através da PCR em amostras fecais com resultados discordantes entre os métodos da PCR *ureA* e HpSA.

Tipos de cepas <i>H. pylori</i> (+)	Genótipos		n
	<i>vacA</i>	<i>cagA</i>	
Tipo I	<i>s1bm1</i>	(+)	8
Tipo II	<i>s1bm1</i>	(-)	3
	<i>s1am1</i>	(-)	2
Ausente	-	-	13
Total			26

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de testes não endoscópicos para diagnóstico da *H. pylori* tem ganhado grande importância devido à dificuldade de se realizar procedimentos endoscópicos em crianças. Dentro desse contexto, a PCR para detecção da *H. pylori* em amostras de fezes, como alternativa de diagnóstico, pode fornecer resultados precisos e confiáveis (Sicinski *et al.*, 2003; Bonamico *et al.*, 2004; Krogfelt *et al.*, 2005; Mourad – Baars & Chong, 2006).

Vários trabalhos têm registrado tentativas de detecção da bactéria pela PCR, sendo que os resultados obtidos sugerem que para o sucesso do uso deste método molecular como diagnóstico são necessários vários procedimentos tais como: preparação do DNA, eliminação de material inibitório da PCR, escolha do oligonucleotídeo iniciador, detecção do produto de amplificação, etc. (Cavallini *et al.*, 2000; Monteiro *et al.*, 2001; Kabir, 2004).

A associação de mais de um método de extração de DNA para fontes escassas, como é o caso das fezes, pode resultar em ganho no que se refere à qualidade e possibilidade de amplificação do material genômico por PCR. O uso do método de digestão por proteinase, seguida por purificação com solventes orgânicos

(fenol e clorofórmio), e mais o uso de uma resina quelante tem gerado bons resultados na obtenção de DNA de qualidade nas amostras fecais (Walsh *et al.*, 1991; Hale *et al.*, 1996).

Neste estudo, a padronização do protocolo de extração de DNA bacteriano de amostras fecais também baseou-se nos métodos de fervura em resina quelante (Chelex 100®) e digestão por proteinase, seguida por fenol e clorofórmio, conforme o protocolo original de Gramley *et al.* (1999). Porém, foi utilizado no pré – tratamento das amostras um tampão de lise com outros tipos de detergentes e sem a resina Chelex 100® (Hale *et al.*, 1996), que foi usada somente após a digestão por proteinase K e seguida pela fase de purificação do DNA com fenol e clorofórmio.

Este novo método de extração foi eficiente na amplificação por PCR de um fragmento genômico específico para o gênero *Helicobacter*, em 84.81% (67/79) das amostras fecais das crianças desse estudo. Os resultados obtidos concordam com dados da literatura, que mostram a necessidade da remoção com sucesso de inibidores da PCR contidos nas fezes para obtenção de DNA amplificável (Sidransky *et al.*, 1992; Monteiro *et al.*, 2001; Queralt *et al.*, 2005).

A alta prevalência de *Helicobacter spp.* encontrada nas crianças desse estudo está de acordo com os resultados de trabalhos realizados em outros países, que detectaram espécies de *Helicobacter spp.* através da PCR na maioria das crianças (Haggerty *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Mourad–Baars & Chong, 2006).

Segundo Solnick & Schauer (2001) e O'Rourke *et al.* (2001), várias espécies do gênero *Helicobacter* têm sido observadas em humanos e estão divididas em grupos gástricos e enterohepáticos. O primeiro grupo é representado pela *H. pylori*, que têm sido associada com gastrites e outras desordens gástricas (Dunn *et al.*, 1997). Já os grupos das enterohepáticas, colonizam o intestino e o sistema hepatobiliar, sendo associadas à hepatite crônica e doenças intestinais (Fox, 2002; Penã *et al.*, 2002).

O ensaio da PCR para detecção da *H. pylori* pode apresentar casos de reação cruzada com outras espécies de *Helicobacter spp.*, por isso é importante a escolha de pares de oligonucleotídeos iniciadores que amplifiquem um fragmento gênico conservado e presente em múltiplas cópias, assim, melhorando a taxa de detecção de *H. pylori* nas fezes (Engstrand *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1999; Kabir, 2004; Queralt *et al.*, 2005).

No presente estudo, a PCR baseou-se no método de amplificação do gene *ureA*, que vem mostrando ser um teste de diagnóstico confiável para detecção da infecção pela *H. pylori* em amostras de fezes tanto em adultos quanto em crianças (Sen *et al.*, 2005; Sicinski *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 1999; Queralt *et al.*, 2005).

A taxa de 69.62% (55/79) de detecção da *H. pylori* pela PCR *ureA* nas crianças investigadas neste trabalho, comprova o sucesso da amplificação e detecção específica da bactéria a partir de amostras fecais. Gramley *et al.* (1999) descreveram resultados semelhantes num estudo na Índia, em que detectaram a infecção pela *H. pylori* em 73% (8/11) dos indivíduos investigados, e num estudo em Bangladesh que demonstrou 78% (53/68) das crianças investigadas colonizadas pela bactéria (Casswall *et al.*, 1999).

Entretanto, num estudo conduzido na Polônia por Wisniewska *et al.* (2002), a técnica da PCR apresentou baixa sensibilidade na detecção do DNA da *H. pylori* (26%) em indivíduos com infecção confirmada por métodos endoscópicos. Isso pode ser explicado, devido falha na eficiência do protocolo de extração de DNA empregado, no que se refere a remoção de substâncias contaminantes das fezes (Kabir, 2004; Sen *et al.*, 2005).

Os resultados satisfatórios encontrados neste trabalho estão provavelmente relacionados com a elaboração e padronização do protocolo de extração e purificação de DNA, responsável pela remoção com sucesso do material inibitório de PCR das amostras fecais, fornecendo DNA de alta qualidade para a PCR *ureA* proposta neste estudo (Braden & Caspary, 2001; Monteiro *et al.*, 2001; Gramley *et al.*, 1999; Hale *et al.*; 1996).

Além disso, o protocolo serve como uma alternativa eficiente e reprodutível, evitando consideráveis perdas do material genômico, e permitindo também que resultados confiáveis na detecção da *H. pylori* nas fezes sejam obtidos sem o uso da técnica de nested – PCR, a qual supostamente aumenta a sensibilidade, porém tem seu uso limitado na rotina de diagnóstico laboratorial (Bamford *et al.*, 1998; Queralt *et al.*, 2005, Dzierzanowska–Frangrat *et al.*, 2006)

A elevada taxa de detecção da *H. pylori* obtida pela PCR *ureA* nesta pesquisa, está relacionada também com o fato desta técnica permitir a amplificação do DNA da bactéria quando ela está presente na forma cocóide (não cultivável) ou em baixas quantidades. Portanto, demonstrando ser um teste eficiente e preciso,

sendo útil tanto no diagnóstico da infecção como na avaliação da terapia antimicrobiana para erradicação da bactéria (Shuber *et al.*, 2002; Kabir, 2004; Haggerty *et al.*, 2005; Rimbara *et al.*, 2005)

Alguns estudos demonstram uma correlação positiva entre a detecção da *H. pylori* e a identificação do gênero *Helicobacter* também pela PCR (Ho *et al.*, 2000; Haggerty *et al.*, 2006). Neste trabalho foram encontrados dados semelhantes, em que identificou - se o gênero em todos os casos positivos de infecção pela *H. pylori*. Obtendo - se, assim, uma correlação positiva significativa de 0,641 ($p=0,000$ IC= 95%).

Esta pesquisa também mostrou que em 15.19% dos casos negativos para infecção pela *H. pylori*, identificou - se apenas o gênero, sugerindo que essas crianças estão infectadas por outras espécies de *Helicobacter spp*, conforme descrito em outros trabalhos (Fox *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006; Mourad-Baars & Chong, 2006).

Alguns autores têm descrito que o teste para pesquisa de antígenos por HpSA nas fezes apresenta resultados satisfatórios no diagnóstico da infecção pela *H. pylori* na população infantil, sendo mais sensível em crianças maiores de 6 anos de idade do que naquelas abaixo dessa faixa etária (Gisbert *et al.*, 2001; Bonamico *et al.*, 2004; Falsafi *et al.*, 2006).

Numa análise comparativa entre o método da PCR *ureA* utilizada neste estudo e o teste imunoenzimático HpSA realizado em um trabalho anterior nas mesmas amostras de fezes (Cartágenes, 2003), a detecção da infecção pela *H. pylori* através da técnica molecular (69,62%; (55/79) foi maior do que em relação ao teste imunoenzimático (54,43%; 43/79), ocorrendo discordância nas frequências dos resultados.

Ou seja, o teste da PCR mostrou-se mais eficiente para o diagnóstico da infecção nas crianças desse estudo do que o teste para pesquisa de antígenos por HpSA, que de acordo com a literatura apresentam baixa sensibilidade na detecção da infecção pela *H. pylori* na população infantil, principalmente em crianças entre 1 e 6 anos de idade assintomáticas (Kalach *et al.*, 2005; Raguza *et al.*, 2005; Mourad-Baars & Chong, 2006).

Gisbert & Pajares (2001) explicam que a baixa sensibilidade (isto é, freqüentes casos de falso-negativos) com o teste de pesquisa para antígenos por

HpSA, está relacionada com o uso de antibióticos, que reduzem o grau de densidade da *H. pylori*, conduzindo a diagnósticos errôneos.

Quanto a reprodutibilidade dos resultados para os dois métodos de diagnóstico (53,16% e 29,11% para casos positivos e negativos, respectivamente), houve uma fraca concordância de 57,59% que pode ser explicada uma vez que o teste da PCR é mais eficiente na detecção de microorganismos em baixas quantidades e condições adversas de crescimento (Shahamat *et al.*, 2004; Monteiro *et al.*, 2001; Bamford *et al.*, 1998).

Segundo, Queralt *et al* (2005) a heterogeneidade de resultados entre a técnica sorológica para pesquisa de antígenos por HpSA e a técnica da PCR, pode ocorrer devido o mecanismo de distribuição da *H. pylori* nas fezes, em que a pequena quantidade de amostra analisada por uma das duas técnicas tem influência da distribuição aleatória da bactéria, aliada a alta quantidade de material inibitório nas fezes.

Nesta pesquisa, a genotipagem das linhagens virulentas dos genes *cagA* e *vacA* através da PCR, para confirmação da presença ou ausência da *H. pylori* nos casos discordantes entre os métodos da PCR *16S RNAr*, PCR *ureA* e HpSA, mostrou apenas um caso de falso – positivo pela técnica sorológica de antígenos HpSA, possivelmente devido reação cruzada com outras bactérias encontradas na flora intestinal, ou nos casos em que as fezes são diarréicas e contaminadas com sangue (Lastovica & Roux, 2003; Gisbert *et al.*, 2004).

O método da PCR pode fornecer informações importantes clinicamente à respeito da presença de fatores de virulência e suscetibilidade à antibióticos. (Gisbert *et al.*, 2001; Bonamico *et al.*, 2004; Falsafi *et al.*, 2006). E mais, o custo de uma reação de PCR, desde a etapa da extração de DNA até a visualização do amplicon por eletroforese, pode ser menos oneroso que uma reação sorológica devido ao alto preço dos Kits comerciais.

Os resultados apresentados aqui sugerem que a técnica de extração e purificação de DNA utilizada e a PCR pode ser efetiva e confiável tanto na detecção quanto na tipagem de genes de virulência da *H. pylori* em amostras de fezes de crianças. Permitindo seu uso como alternativa de diagnóstico preciso e precoce na população infantil, já que este grupo etário constitui importante fonte para estudos de epidemiologia molecular que esclareçam os fatores envolvidos na transmissão e colonização da bactéria (Torres *et al.*, 2000; Sicinski *et al.*, 2003; Perez–Perez *et*

al., 2004; Rimbara *et al.*, 2005; Queralt *et al.*, 2005; Mourad–Baars & Chong, 2006; Queiroz & Lizza, 2006).

6 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos mostram que a associação dos métodos de extração de fervura em resina quelante e digestão por proteinase, seguido por fenol clorofórmio empregado nas amostras de fezes, foi eficiente na obtenção de DNA com pureza e rendimento suficientes para amplificação *in vitro* pela PCR.
- As seqüências de oligonucleotídeos iniciadores desenhados nesse estudo permitiram a identificação do gênero *Helicobacter* (gene *16S rRNA*) e espécie *H. pylori* (gene *ureA*), com precisão pelo método da PCR nas amostras fecais das crianças investigadas.
- A prevalência da *Helicobacter spp.* na população infantil foi de 84.81% (67/79), indicando que esses organismos colonizam a camada de muco do intestino humano e podem ter importante significância clínica.
- A investigação sobre a presença da *H. pylori* através da PCR *ureA* em material fecal, apresentou uma taxa de 69,62% (55/79) de crianças infectadas pela bactéria.
- Esta pesquisa revelou uma correlação positiva entre a presença de *Helicobacter spp.* e a espécie *H. pylori* ($p = 0,000$), sugerindo que membros da família Helicobacteracea colonizam precocemente indivíduos na idade infantil.
- A análise comparativa entre o ensaio imunoenzimático HpSA e a PCR *ureA*, revelou que a técnica molecular apresenta um desempenho melhor que o sorológico no diagnóstico de *H. pylori* em amostras de fezes na população infantil.
- Ocorreu uma fraca concordância entre as técnicas de pesquisa de antígenos por HpSA e a reação da PCR *ureA* ($p = 0,0246$), mostrando que o teste da PCR *ureA* é mais eficiente.
- O alto grau de eficiência e acurácia do teste da PCR *ureA* na detecção da *H. pylori* em material fecal está relacionado com a remoção dos inibidores da reação durante a extração de DNA e a amplificação do DNA da bactéria presente mesmo em baixas quantidades nas fezes e na forma cocóide.

- O protocolo de extração de DNA utilizado neste estudo permitiu também a realização da PCR para genotipagem das linhagens virulentas *cagA* e *vacA* específicas da *H. pylori*, confirmando a presença ou ausência dessas formas da bactéria na fezes.
- Este estudo mostrou que é possível a aplicação da técnica da PCR em amostras fecais de crianças, por ser um procedimento não invasivo e eficiente, podendo ser utilizada para detecção da infecção pela *H. pylori* tanto na rotina laboratorial como em pesquisas de interesse epidemiológico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADERSEN, A.P.; ELLIOT, D.A.; LAWSON, M; BARLAND, P.; HATCHER, V.B.; PUSZKIN, E.G. Growth and morphological transformation of *Helicobacter pylori* in brothmedia. **Journal Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2918-22,1997.

AGUIAR, D.C.P.; CORVELO, T.C.; ARAÚJO, M.; CRUZ, E.M.; DAIBES, S., ASSUMPÇÃO, M.B. Expressão dos antígenos ABH e Lewis na gastrite crônica e alterações pré-neoplásicas da mucosa gástrica. **Archives of Gastroenterology**, v. 39, p. 222-232,2002.

AGUILAR, G. R.; AYALA, G.; ZÁRATE, G. F. *Helicobacter pylori*: recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. **Salud publica Del México**, v. 43, suppl 3, p. 237-247, 2001

AHMED, N., 23 years of the Discovery of *Helicobacter pylori*: Is the debate over? **Annals of Microbiology and Antimicrobials**, v. 4, p. 17, 2005.

AHMED, K.S.; KHAN, A.A.; AHMED, I.; TIWARI, S.K.; HABEEB, M.A.; ALI, S.M., AHI, J. D.; ABID, Z.; ALVI, A.; HUSSAIN, M.A.; AHMED, N.; HABIBULLAH, C. M. Prevalence study to elucidate the transmission pathways of *Helicobacter pylori* at oral and gastroduodenal sites of a South Indian population. **Singapore Medical Journal**, v. 47, n. 4,p. 291-296, 2006.

AL- SHAMAHY. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* among children in Sana'a, Yemen. **Annals of Saudi Medicine.**, v. 25 (4), p. 299-303, 2005.

ALM, R.A., LING, L.S., MOIR, D.T., KING, B.L., *et al.* Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, v.397, p.176–80, 1999.

APPELMELK, B.J.; GRAUS, C.M.J.E.V. *H. pylori* and Lewis antigens. **Gut**, v. 47, n. 1, p. 10-11, 2000.

APPELMELK, B.J.; NEGRINI, R.; MORAN, A. P.; KUIPERS, E. J. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and host. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 70-73, 1997.

ASAHI, M.; AZUMA, T.; ITO, S.; ITO, Y.; SUTO, H.; NAGAI, Y.; TSUBOKAWA, M.; TOHYAMA, Y.; MAEDA, S.; OMATA, M.; SUZUKI, T.; SASAKAWA, C.; *Helicobacter pylori* CagA Protein Can Be Tyrosine Phosphorylated in Gastric Epithelial Cells. **The Journal Of Experimental Medicine**, v. 191, n. 4, p. 593-602, 2000.

ATHERTON, J., CAO, P., PEEK, R., TUMMURU, M., BLASER, M., COVER, T. Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori*. **Journal of Biology Chemistry**, v. 270, p. 17771-17777, 1995.

ATHERTON, J., COVER, T., TWELLS, R., MORALES, M. R., HAWKEY, C., BLASER, M. Simple and Accurate PCR-Based System for Typing Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2979-2982, 1999.

AXON A. *Helicobacter pylori*: what do we still need to know? **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 40, p. 15-9, 2006.

AYRES, M., AYRES J.R.M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. Bio Estat 4.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: **Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq**, 2004.

BAIK, S.; KIM, K.; SONG, S.; KIM, D.; JUN, J.; LEE, S.; SONG, J.; PARK, J.; KANG, H.; LEE, W.; CHO, M.; YOUN, H.; KO, G.; RHEE, K. Proteomic Analysis of the Sarcosine-Insoluble Outer Membrane Fraction of *Helicobacter pylori* Strain 26695. **Journal Of Bacteriology**, v. 186, n 4, p. 949–955, 2004.

BAMFORD, K.B., LUTTON, D.A., O'LOUGHLIN, B., COULTER, W.A., COLLINS, J.S.A. Nested Primers Improve Sensitivity in the Detection of *Helicobacter pylori* by the Polymerase Chain Reaction. **Journal of Infection**, v. 36, p. 105-110, 1998.

BANI-HANI, E.K.; SHATNAWI, J.N.; EL QADERI, S.; KHADER, S.Y.; BANI-HANI, K.B. Prevalence and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in healthy schoolchildren. **Chin J Dig Dis**,v. 7,p. 55-60,2006.

BARILE, K.A.S. Estudo Soroepidemiológico da Infecção pela *Helicobacter pylori* na população infantil de Belém - Pará: Transmissão intrafamiliar, aspectos socioeconômicos e grupos sanguíneos. Dissertação de Mestrado. Belém – Pará. **Universidade Federal do Pará. 64p.**

BIZZOZERO, G. Über die shawechformigen druzen des magendarm kanals and die beziehungreranihres epithels zu dem oberflachenepithel der shleimhaut. **Arch Miker Anat**, v. 48,p. 82 – 152, 1893.

BJÖRKHOLM, B.; SALAMA, R. N. Genomics of *Helicobacter* 2003. **Helicobacter**, v. 8, n.1, p. 1 – 7, 2003.

BLASER, M. J., AND BERG, D. E., *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk human disease. The **Journal of Clinical. Investigation**, v.107, n. 7, p. 767 – 73, 2001.

BLASER, M. J.; ATRERTON, J. C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n.3, p. 321-333, 2004.

BODE, G.; ROTHENBACHER, D.; BRENNER, H.; ADLER, G. *Helicobacter pylori* and abdominal symptoms: a population-based study among preschool children in southern germany. **Pediatrics**, v. 101, n. 4., p. 634-7, 1998.

BONAMICO, M.; STRAPPINI, P.M.; BONCI, E.; FERRI, M.; CRISOGIANNI, M.; GUIDO, M.; THANASI, E.; NENNA, R.; MACCHIA, S.; LUZZI, I.; MAGLIOCCA, F. M.; MASTROMARINO, P. Evaluation of Stool Antigen Test, PCR on ORAL Samples and Serology for the Noninvasive Detection of *Helicobacter pylori* Infection in Children. **Helicobacter**, v. 9, p. 69 – 76, 2004.

BOOKA, B.; OKUDA,M.; SHIN, K.; MIYASHIRO,E.; HAYASHI, H.; YAMAUCHI, K.; TAMURA, Y.; YOSHIKAWA, N. Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* Infection in Children Using Stool Sample. **Helicobacter**, v. 1, n.3, p. 205 – 213, 2005.

BRADEN, B., CASPARY W.F. Detection of *Helicobacter pylory* infection: when to perform which test? **Annals of Medicine**, v. 33, n.2, p. 91-97, 2001.

BRADEN, B.; LI-PING, D.; CASPARY, W.F.; LEMBCKE, B. Endoscopy is not a risk factor for *Helicobacter pylori* infection – but medical practice is. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 46, p. 305-10, 1997.

BROWN, L.M. *Helicobacter pylori*: epidemiology na routes of transmission, **Epidemiologic Reviews**, v. 22, n.2, p. 283-97, 2000.

BUMANN, D.; AKSU, S.; WENDLAND, M.; JANEK, K.; ZIMNY-ARNDT, U.; SABARTH, N.; MEYER, F. T.; JUNGBLUT, P. R. Proteome Analysis of Secreted Proteins of the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. **Infection And Immunity**, v. 70, n. 7 p. 3396–3403,2002.

BURES, J.; KOPACOVA, M.; KOUPIL, I.; VORISEK, V.; REJCHRT, S.; BERANEK, M.; SEIFERT, B.; POZLER, O.; ZIVNY, P.; DOUDA, T.; KOLESAROVA, K.; PINTER, M.; PALICKA, V.; HOLCIK, J.; EUROPEAN SOCIETY FOR PRIMARY CARE GASTROENTEROLOGY. Epidemiology of *Helicobacter Pylori* Infection in the Czech Republic. **Helicobacter**, v.11, n.1, p. 56-65.2006.

CABTREE, J.E.; TAYLOR, J.D.; WYATT, J.L; HEATLEY, R.V.; SHALLCROSS, T.M.; TOMPKINS, D.S.; RATHBONE, B.J. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. **Lancet**, v. 338, p. 332-335,1991.

CARTÁGENES, V.L.A.D. Soroepidemiologia da *Helicobacter pylori* em crianças e suas mães: Avaliação dos fatores de risco. 2003. **Tese de Mestrado. Universidade Federal do Pará. 115p Belém – Pará.**

CASTILLO-ROJAS, G.; MAZARÍ-HIRIART, M.; LÓPEZ-VIDAL, Y. *Helicobacter pylori*: Focus on CagA and VacA major virulence factors. **Salud Pública de México**, v. 46, n. 6, p.538-548, 2004.

CASSWALL, T. H.; NILSSON, H.; BERGSTROM, M.; ALELJUNG, P.; WADSTROM, T.; DAHLSTROM, A. K.; ALBERT, M. J.; SARKER, S. Evaluation of Serology, 13C-Urea Breath Test, and Polymerase Chain Reaction of Stool Samples to Detect *Helicobacter pylori* in Bangladeshi Children. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**, v. 28,n.1, p. 31 - 36, 1999.

CAVALLINI, A.; NOTARNICOLA, M.; BERLOCO, P.; LIPPOLIS, A.; LEO, D. A. Use of macroporous polypropylene filter to allow identification of bacteria by PCR in human fecal samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 39, p. 265-270, 2000.

CAVE, D. R. How is *Helicobacter pylori* transmitted? **Gastroenterology**, v.113, p. S9-S14,1997.

CENSINI, S.; LANGE, C.; XIANG, Z.; CRABTREE, J. E.; GUIARA, P.; BORODOVSKY, M.; RAPUOLLI, R.; COVACCI, A. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I – specific and disease – associated virulence factors. **Proceedings of National Academy of sciences of the United States**, v. 93, p. 14648-53, 1996.

CHELIMSKY, G.; CZINN, S.J. *Helicobacter pylori* in children: update. **Currents Opinion in Pediatrics**, v.12, n. 5, p.460-2, 2000.

CHEHTER, L. Úlcera Péptica Gastroduodenal. **Sinopse de gastroenterologia-UNIFESP.1**, 1999.P. 14-18.

CHONG, F.K.S.; LOU, C.; FITZGERALD, F.J.; LEE, C. Evaluation of *16S rRNA* gene PCR with Primers Hp1 and Hp2 for Detection of *Helicobacter pylori*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n.11. p. 2728-2730-1996.

COELHO, L.G.V. Úlcera Péptica Gastrodudenal. In: **Gastroenterologia Essencial**. Dani, R. (ed.). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 132-46, 1998.

COLE, S. P.; CIRILLO, D.; KAGNOFF, M. F.; GUINEY, D. G.; ECKMANN, L. Coccoid and spiral *Helicobacter pylori* differ in their abilities to adhere to gastric epithelial cells and induce interleukin-8 secretion. **The Journal Infectious Diseases**, v. 180, n. 5, p. 1713-7,1999.

COSTA, K.; BACHER, G.; ALLMAIER, G.; BELLO, M. G. D.; ENGSTRAND, L.; FALK, P.; PEDRO, M. A., PORTILLO, F. G. The morphological transition of *Helicobacter pylori* cells from spiral to coccoid is preceded by substantial modification of the cell wall. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 12, p. 3710-3715,1999.

COVACCI, A; TELFORD, L.J; GIUDICE, D.G; PARSONNET, J., RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. **Science**, v. 284, p.1328-1333,1999.

COVER, T.; BLASER, M. *Helicobacter pylori* factors associated with disease. **Gastroenterology**, v. 117,n.1, p.257-60,1999

COVER, T.L.; TUMMURU, M. K.; CAO, P.; THOMPSON, S. A.; BLASER, M. J. Divergence o genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. **Journal of Biology Chemistry**,v. 269, n. 14, p. 10566-73, 1994.

CRAWFORD, J. M. O trato gastrointestinal. In: **Patologia estrutural e funcional**. ROBBINS; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (eds.) Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2000. p. 711-735.

CUTLER, A.F.; SCHUBERT, T.T. Long – term *Helicobacter pylori* recurrence after successful eradication with triple therapy. **American Journal Gastroenterology**, v. 88, p. 1681-2, 1993.

CZESNIKIEWICZ – GUZIK, M.; KARCZEWSKA, E.; BIELANSKI, W.; GUZIK, T.J.; KAPERA, P.; TARGOSZ, A.; KONTUREK, S.J.; LOSTER, B. Association of the presence the *Helicobacter pylori* in the oral cavity and in stomach. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 55,n.2, p. 105-15, 2004.

CZESNIKIEWICZ – GUZIK, M.; BIELANSKI, W.; GUZIK, T.J.; LOSTER, B.; KONTUREK, S.J. *Helicobacter pylori* in the oral cavity and its implications for gastric infection, periodontal health, immunology and dyspepsia. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56,n.6, p. 77-89, 2005.

DE SCRYVER, A. A.; VAN HOOSTE, W.L.; VAN WINCKEL, M.A.; VAN SPRUNDEL, M.P. *Helicobacter pylori* infection: a global occupational risk healthcare workers? **Int. L. Occup. Environ Health.**, v. 10, p. 428-32, 2004.

DE SCHRYVER, A. A.; VAN WINCKEL, M.; CORNELIS, K.; MOENS, G.; DEVLIES, G.; DE BACKER, G. *Helicobacter pylori* Infection: Further Evidence for the Role of Feco-Oral Trasnmission. **Helicobacter**, v.11, p. 523-528, 2006.

DEBELLIS, L. *et al.* *Helicobacter pylori* cytotoxin *vacA* increases alkaline secretion in gastric epithelial cells. **American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology.**, v.281,n.6,p. G1440– 8, 2001.

DEGROOTE, D., VAN DOORN, L.J., DUCATELLE, R., VERSCHUUREN, A., HAESEROUCK, F., QUINT, WG., JALAVA, K., VANDAMME, P. ‘Candidatus *Helicobacter suis*’, a gastric *Helicobacter* from pigs, and its phylogenetic relatedness to other gastrospirilla. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.49, n.4, p. 1769-77, 1999.

DELTENRE, M.; KOSTER, E. How come I’ve go it? **Europen Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 5, p.479-82, May 2000.

DHAR, S.K.; SONI, R.K.; DAS, B.K.; MUKHOPADHYAY, G. Molecular mechanism of action of major *Helicobacter pylori* virulence factors. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, p. 207-215, 2003.

DÍAZ, M. I.; VALDIVIA, A.; MARTÍNEZ, P.; PALACIOS, J. L.; HARRIS, P.; NOVALES, J.; GARRIDO, E.; VALDERRAMA, D.; SHILLING, C.; KIRBERG, A.; HEBEL, E.; FIERRO, J.; BRAVO, R.; SIEGEL, F.; LEON, G.; KLAPP, G.; VENEGAS, A. *Helicobacter pylori vacA s1a* and *s1b* alleles from clinical isolates from different regions of Chile show a distinct geographic distribution. **World J Gastroenterol**, v.11, n.40, p.6366-6372, 2005.

DZIERZANOWSKA-FANGRAT, K.; LEHOURS, P.; MÉGRAUD, F.; DZIERZANOWSKA, D. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, v. 11,n.1, p. 6 – 13, 2006.

DRUMM, B.; PERE-PEREZ, G., BLASER, M. Intra familial clustering of *Helicobacter pylori* infection. **New England Journal of Medicine**, v. 322, p. 359-363,1990.

DUNN, B. E., COHEN, H., BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10,p. 720-41, 1997.

ELITSUR, Y.; YAHAV, J. *Helicobacter pylori* infection in pediatrics. **Helicobacter**, v.10 (1), p. 47 – 53, 2005.

ENGSTRAND L.; NGUYEN, A. M.; GRAHAM, D. Y.; EL-ZAATARI, F. A. Reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of rRNA for detection of *Helicobacter* species. **Journal Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2295 – 301, 1992.

ENROTH, H.; WREIBER, K.; RIGO, R.; RISBERG, D.; URIBE, A.; ENGSTRAND, L. In Vitro aging of *Helicobacter pylori*: Changes in morphology, intracellular composition and surface properties. **Helicobacter**, v.4 (1), p. 7-15, 1999.

ERNST, P.B.; CROWE, S.E.; REYES, V.E. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? The inflammatory response. **Gastroenterology**, v. 118, p. 22-30,1997.

EVANS JR, D.J.; EVANS, D.G. *Helicobacter pylori* CagA: Analysis of sequence diversity in relation to phosphorylation motifs and implications for the role of Cag as a virulence factor. **Helicobacter**, v.6, n.3, p. 187-198,2001.

EVERHART, J.E., KRUSZON-MORAN, D., PEREZ-PEREZ, G.I., TRALKA, T.S., McQUILLAN, G. Seroprevalence and ethnic differences in *Helicobacter* infection among adults in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181,p. 1359-1363, 2000.

FALSAFI, T.; VALIZADEH, N.; SEPEHR, S.; NAJAFI, M. Application of a Stool Antigen Test To Evaluate the Incidence of *Helicobacter pylori* Infection in Children and Adolescents from Tehran, Iran. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 9, p. 1094–1097, 2005.

FALUSH, D.; WIRTH, T.; LINZ, B.; PRITCHARD, K. J.; STEPHENS, M.; KIDD, M.; BLASER, J. M.; GRAHAM, D. Y.; VACHER, S.; PEREZ-PEREZ, G. I.; YAMAOKA, Y.; ME'GRAUD, F.; OTTO, K.; REICHARD, U.; KATZOWITSCH, E.; WANG, X.; ACHTMAN, M.; SUERBAUM, S. Traces of Human Migrations in *Helicobacter pylori* Populations. **Science**, v. 299, p. 1582-85

FELDMAN, R.A.; CCERSLEY, A.J.P.; HARDIE, J.M. Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisitions, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio. **British Medical Bulletin**, v.54, p. 39-53, 1998.

FRENCK, R.W.JR.; CLEMENS, J. *Helicobacter* in the developing world. **Microbes Infection**, v.5, n.8, p. 705-13, 2003.

GARCIA-VALLVÉ, S.; JANSSEN, P. J.; OUZOUNIS, C.A.; Genetic variation between *Helicobacter pylori* strains: gene acquisition or loss? **Trends in Microbiology**, v.10, n.10, p. 445-447, 2002.

FORMAN, D., SITAS, F., NEWELL, D.G., STACEY, A.R.; BOREHAM, J., PETO, R.; CAMPBELL, T.C. LI, J., CHN, J. Geographic association of *Helicobacter pylori* antibody prevalence and gastric cancer mortality in rural China. **International Journal of Cancer**, v.46, n. 4, p. 608-11, 1990.

FOX, J. G. The non-*H. pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic disease. **Gut**, v. 50, p. 273–283, 2002.

FOX, J. G.; WANG, T. C. Reply to “The ‘African enigma’ – another explanation”. **Nature medicine**, v.6, n.12, p. 1297-8, 2000.

GISBERT J. P. A critical review of the diagnostic methods for *Helicobacter pylori* infection. **Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v.23, p. 135-43, 2000.

GISBERT, P. J.; PAJARES, M. J. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection by Stool Antigen Determination: A Systematic Review. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 96, n. 10, p. 2829-2838, 2001.

GISBERT J.P, PSJARES JM. Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. **Helicobacter**, v. 9,n.4, p. 347-68, 2004.

GO, M. F. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.16, n.1, p. 3 – 15, 2002.

GO, M. F.; CROWE, S. E. Virulence and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 29, n.3, p. 545-549, 2000.

GOLDMAN, B.; KRANZ, R. Evolution and horizontal transfer of an entire biosynthetic pathway for cytochrome c biogenesis: *Helicobacter*, *Deinococcus*, *Archea* and more. **Molecular Microbiology**, v. 27, p.871-874,1998.

GONZÁLEZ-VALENCIA, G.; ATHERTON, J. C.; MUÑOZ, O.; DEHESA, M.; MADRAZO-DE LA GARZA, A.; TORRES, J. *Helicobacter pylori vacA and cagA* genotypes in Mexican Adults and children. **The Journal Infectious diseases**, v.182, p. 1450-1454,2000.

GOODMAN, K. J. & CORREA, P. The transmission of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. **International Journal of Epidemiology**, v. 24, p. 875-87,1995.

GOODWIN, C.S.; MENDALL, M. M.; NORTHFIELD, T.C. *Helicobacter pylori* infection. **The Lancet**, v. 349, p. 265-9,1997.

GOODWIN, C. S.; ARMSTRONG, J. A. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.9, p. 1-13,1990.

GRAHAM, D.Y., MALATY, H.M. Commentary: what remains to be done regarding transmission of *Helicobacter pylori*. **International Journal of Epidemiology**, v. 31, p. 646-647, 2002.

GRAHAM, D.Y., MALATY, H.M., EVANS, D.J., KLEIN, P.D, ADAM, E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in a asymptomatic population in United States: effect of age, race and socioeconomic status. **Gastroenterology**, v.100, p. 1495-1501, 1991.

GRAMLEY, A. W.; ASGHAR, A.; FRIERSON, JR., F. H.; POWELL, M. S. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Fecal Samples from Infected Individuals. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2236–2240,1999.

GUIMARÃES, J. O sorodiagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori* e a associação com o estado nutricional e os grupos sanguíneos ABO E LEWIS

associado aos antígenos de grupos sanguíneos ABO em uma amostra infantil de Belém – Pará. 2003. **Tese de Mestrado. Universidade Federal do Pará. 115p Belém – Pará.**

HAGGARTY, T. D.; PERRY, S.; SANCHEZ, L.; PEREZ-PEREZ, G.; PARSONNET, J. Significance of transiently positive enzyme-linked immunosorbent assay results in detection of *Helicobacter pylori* in stool samples from children. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2220 – 3, 2005.

HALE, A.D., GREEN J., BROEN D.W.G. Comparison of four RNA extraction methods for the detections of small round structured viruses em faecal specimes. **Journal of Virological Methods**, v. 57, p. 195 – 201, 1996.

HALITIM, F.; VINCENT, P.; MICHAUD, L; GUIMBER, D.; BOMAN, F.; TURCK, D.; GOTTRAND, F. High Rate of *Helicobacter pylori* Reinfection in Children and Adolescents. **Helicobacter.**, v. 11, p. 168-172, 2006

HAMAJIMA, N.; NAITO, M.; KONDO, T.; GOTO, Y. Genetic factors involved in the development of *Helicobacter pylori*-related gastric cancer. **Cancer Science**, v. 97, n. 11, p. 1129-1138. 2006.

HARRIS, P. R., COVER, T. L., CROWE, D. R., ORENSTEIN, J. M., GRAHAM, M. F., BLASER, M. J., SMITH, P. D. *Helicobacter pylori* Cytotoxin Induces Vacuolation of Primary Human Mucosal Epithelial Cell. **Infec. Immun**, v.64, p. 4867 – 4871, 1996.

HATAKEYAMA, M. *Helicobacter pylori* CagA⁺ a potential bacterial oncoprotein that functionally mimics the mammalian Gab family of adaptor proteins. **Microbes and Infection**, v.5, p. 143-150,2003.

HATAKEYAMA, M.; BRZOZOWSKI, T. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter.**, v. 11, p. 14 – 20, 2006.

HAZELL, S.L.; EVANS, D.J.; GRAHAM, D. Y. *Helicobacter pylori*. **Journal Of General Microbiology**, v.137, p. 57-61, 1991.

HECZKO, U.; SMITH, V. C.; MELOCHE, M., BUCHAN, A.M.J.; FINLAY, B. Characteristics of *Helicobacter pylori* attachment to human primary antral epithelial cells. **Microbes and infection**, v.2, p.1669-76, 2000.

HIGASHI, H.; TSUTSUMI, R.; FUJITA, A.; YAMAZAKI, S.; ASAKA, M.; AZUMA, T.; HATAKEYAMA, M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factors CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. **Proceedings of the National. Academy of Sciences**, v. 99, p. 14428-14433,2002

HIGASHI, H.; YOKOYAMA, K.; FUJII, Y.; REN, S.; YUASA, H.; SAADAT, I.; MURATA-KAMIYA, N.; AZUMA, T.; HATAKEYAMA, M. EPIYA motif is a membrane – targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor Cag A in mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 23130-7, 2005.

HO, S.; HOYLE, J.; LEWIS, F.; SECKER, A.; CROSS, D.; MAPSTONE, N.; DIXON, M.; WYATT, J.; TOMPKINS, D.; TAYLOR, G.; QUIRKE, P. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. **Journal Clinical Microbiology**, v.29, p.2543–2549, 1991.

HOLCOMBE, C., B. A. OMOTATA, J. ELDRIDGE, AND D. M. JONES. *Helicobacter pylori*, the most common chronic bacterial infection in Africa: a random serological study. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 87, p. 28–30,1992.

HORIUCHI, T.; OHKUSA, T.; WATANABE, M.; KOBAYASHI, D.; MIWA, H.; EISHI, Y. *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 45,n.7, p. 5515-9, 2001.

HÚLTEN, K.; ZHANG, S. F.; JIA, E. M.; WANG, Q. Q.; LIU, S. D.; LIU, Y. Y.; WU, Y. P.; CHENG, Y. T. Diet and cancer of the stomach: a case – control study in China. **International Journal of Cancer**, v.41, n.3, p. 331-5,1988.

HÚLTEN, K.; ENROTH, H.; NYSTROM, T.; ENGSTRADN, L. Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water. **Journal of Applied Microbiology.**, v. 85, p. 282-6, 1998.

HUSSAIN, A. M.; KAUSER, F.; KHAN, A. A.; TIWARI, S.; HABIBULLAH, M. C.; AHMED, N. Implications of Molecular Genotyping of *Helicobacter pylori* Isolates from Different Human populations by Genomic Fingerprinting of Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Regions for Strain Identification and geographic Evolution. **Journal Clinical Microbiology**, v.42, n.6, p. 2372-2378, 2004.

ILVER, D.; ARNQVIST, A.; OGREN, J.; FRINCK, I.M.; KERSULYTE, D.; INCECIK, E.T.; BERG, D. E.; COVACCIA, A.; ENGSTRAND, L.; BORÉN, T. *Helicobacter pylori* adhesion binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. **Science**, v. 279, p. 373-6, 1998.

IMRIE C., ROWLANDI M., BOURKE B.,DRUMM B. Is *Helicobacter pylori* Infection in Childhood a Risk Factor for gastric cancer ? **Pediatrics**, v. 107, n.2, p. 373 – 380
IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks Humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. **IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum**, v. 61, p. 1–241, 1994.

JACOBSON, K. The changing prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Canadian children: should screening be performed in high risk children? **The Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 19(7), p. 412-4, 2005.

JENKS, P. I.; KUSTERS, J. C. Pathogenesis and virulence of *Helicobacter pylori*. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.16(1),p.11-8,2000.

JONES, T.C. Pathogenesis of peptic ulcer disease and gastritis: Importance of aggressive and cytoprotective factors. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**,v.21,n.122,p.1-5,1986.

KABIR, S. Detection of *Helicobacter pylori* infection in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, 1021-1029,2001.

KABIR, S. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Feces and Saliva by Polymerase Chain Reaction: a Review. **Helicobacter**, v. 9, p. 115 – 123, 2004.

SHEFF,B. *Helicobacter pylori*. Nursing, Mar. 2001. Disponível em:<<http://www.findarticles.com>>. Acesso em: 10 de Novembro de 2005.

KALACH, N.; NGUYEN, V. B.; BERGERET, M.; BOUTROS, N.; DUPONT, C.; RAYMOND, J. Usefulness and influence of age of a novel rapid monoclonal enzyme immunoassay stool antigen for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 52, p. 157 – 60, 2005.

KANDEL, G. *Helicobacter pylori* and disease: still more questions than answer. **Canadian Journal of Surgery**, v. 43, n. 5, p. 339-346, 2000.

KIMIA, A.; ZAHAVI, I.; SHAPIRO, R.; ROSENBAACH, Y., HIRSH, A. DRUZD, T.; YAHAV, J.; DINARI, G. The role of *Helicobacter pylori* and gastritis in children with recurrent abdominal pain. **Israel Medical Association Journal**, v. 2, n. 2, p.126-8,2000.

KODAMA, K.; ITO, A.; NISHIZONO, A.; FUJIOKA, T.; NUSU, M.; YAHIROO, K.; HIRAYAMA, T.; UEMURA, N. Divergence of virulence factors of *Helicobacter pylori* among clinical isolates does not correlate with disease specificity. **Journal of Gastroenterology**, v. 34, suppl 11, p. 6-9, 1999.

KROGFELT, K. A.; LEHOURS, P.; MÉGRAUD, F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, v. 10 (1), p. 5 – 13, 2005.

KUIPERS, E. J.; PEREZ-PEREZ, G.I; MEUWISSEN, S.G.; BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis. Importance of *cagA* status. **Journal of the National Cancer Institute**, v.87, p. 1777-1780,1995.

KURATA, J. H.; NOGAWA, A. N. Meta- analysis of risk factors for peptic ulcer. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, *Helicobacter pylori*, and smoking. **Journal of Clinical Gastroenterology I**, v. 24(1), p. 2-17, 1997.

KUSTERS, J.G.; GERRITS, M. M.; VAN STRIJP, J. A. G.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E. Coccoide forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. **Infect immune**, v.65,p. 3672-3679,1997.

LANGENBERG, W.; RAUWS, E.A.; OUDBIER, J.H.; TYTGAT, G.N. Patient – to-patient transmission of *Campylobacter pylori* infection by fiberoptic gastroduodendoscopy and biopsy. *Journal of Infectious Diseases*, v. 161.n.3, p. 507-11, 1990.

LENKS, P. I., AND KUSTERS, J. C. Pathogenesis and virulence of *Helicobacter pylori*. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.16, suppl. 1, p. S11 – 8, 2000.

LASTOVICA, A. J., ROUX, E. L. Optimal detection of *Campylobacter* spp. in stools. **Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 480, 2003.

LOGAN, R.P.; WALKER, M.M. ABC of the upper gastrointestinal tract: Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **British Medical Journal**, v. 323, p. 920-922, 2001.

LOPEZ- BREA, M. *Helicobacter* Spanol. [s.1:s.e.]. Disponível em: <<http://www.helicobacterspain.com>>. Acesso em: 25 de Janeiro de 2006.

LOSTER, B.W; MAJEWSKI, S.W.; CZESNIKIEWICZ– 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 stomach. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.57,n.3, p. 91-100, 2006.

LYNCH, T., LYNCH, P. *Helicobacter pylori* infection: not associated with recurrent abdominal pain in children. **British Journal of general Practice**, v.50,n.456,p.578, 2000.

LYRA, C.A.; SANTANA, G.; SANTANA, N.; SILVANY-NETO, A.; MAGALHÃES, E. PEREIRA, M.E.; MASCARENHAS,R.; LYRA, C.M.; VEIGA, A.; FERREIRA, K.; ZATERKA, S.; LYRA, G.L. Seroprevalence and Risk Factors associated with *Helicobacter pylori* Infection in Blood Donors in Salvador, Northeast – Brazil. **BJID**, v.7, n. 5, p. 339 - 345, 2003.

LU, J., PERNG,C., SHYU, R., CHEN,C., LOU, Q., CHONG, S.K.F., LEE, C. Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues **Journal Clinical Microbiology**, v.37, n.3, p. 772–774,1999.

MACARTHUR, C.; SAUNDERS, N.; FELDMAN, W.; IPP, M.; WINDERS-LEE, P.; ROBERTS, S.; BEST, L.; SHERMAN, P.; PENCHARZ, P.; ZANTEN, S.V. *Helicobacter pylori* in childhood recurrent abdominal pain: community based case-control study. **British Medical Journal**, v. 319, n. 7213, p. 822-33, 1999.

MAKRISTATHIS A.,BAROUSCH W.,PASCHING E., BINDER C.,KUDERNA C., APFALTER P.,ROTTER M., HIRSCHL A.M. Two Enzyme Immunoassays and PCR for Detection of *Helicobacter pylori* in Stool Specimens from Pediatric Patients before and after Eradication Therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v .38, n. 10, p. 3710-3714, 2000.

MALATY, H.M.; GRAHAM, D. Y.; KLEIN, P. D.; EVANS, D. G.; ADAM, E.; EVANS, D. J. Transmission of *Helicobacter pylori* infection. Studies in families of healthy individuals. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.26,n.9,p. 927-32, 1991.

MALATY, H.M.; EL-KASABANY, A.; GRAHAN, D.Y.; MILLER, C.C.; REDDY, S.G.; SRINIVANSAN, S.R. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow up study from infancy to adulthood. **The Lancet**, v. 359, p. 931-35,2002.

MARSHALL, B.J. & WARRENN, J.R. Unidentified curved bacilli in the patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v.16; n1.,p. 1311 – 1315,1984.

MARSHALL, B.J. Campylobacter pylori and gastritis. **Journal of Infectious Diseases**, v.153,n.4,p. 650-657,1986.

MARSHALL, B.J. MCGECHIE D.B., ROGERS, P.A, GLANCY, R.J. Pyloric Campylobacter infection and gastroduodenal disease. **Medical Journal of Australia**, v.142, n.8 ,p.439-44,1985.

MARSHALL, B. J. *Helicobacter pylori*. **American Journal of Gastroenterology**, v. 89,p. 116 –128,1994.

MARSHALL, D. G.; DUNDON, W. G.; BEESLEY, S. M.; SMYTH C. J. *Helicobacter pylori* – a conundrum of genetic diversity. **Microbiology**, v.144, p. 2925 – 2939, 1998.

MARSHALL, B. *Helicobacter pylori*: 20 years on. **Clin. Med. JRCP**, v.2, p. 147 – 52, 2002.

MARTINS, L.C., CORVELO, T.C.O, OTI, H.T., BARILE, K.A. Seroprevalence of antibodies against *Helicobacter pylori* CagA antigen in patients with gastric ulcer in the North region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**,v. 35,n.4,p. 307-10, 2002.

MARTINS, L.C.; CORVELO, T. C.O.; DEMACHKI, S.; ARAUJO, M.T.F.; ASSUMPÇÃO, M.B.; VILAR, S.C.A.J.; FREITAS, F.B.; BARBOSA, H.P.M.; FECURY, A.A.; AMARAL, R.K.C.; SANTOS, S.E.B. Clinical and pathological importance of *vacA* allele heterogeneity and *cagA* status in peptic ulcer disease in patients from North Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100,n.8, p. 875-881, 2005.

MARTINS, L.C.; CORVELO, T.C.O, OTI, H.T.; LOIOLA, R.S.P.; AGUIAR, C.F.; BARILE, K.A.S.; AMARAL, R.K.C.; BARBOSA, H..M.; FECURY, A.A.; SOUZA, J.T. ABH and Lewis antigen distributions in blood, saliva and gastric mucosa and *H. pylori* infection in gastric ulcer patients. **World J Gastroenterol**, v.12(7), p.1120-1124, 2006.

MARWICK, C. Boas palavras – em parte – oferecidas agora sobre a *H. pylori*. **Journal of American Medical Association** – Brasil, v., n. 10, p. 3635, 2000.

MITCHELL, H.;MÉGRAUD, F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection.**Helicobacter**, v. 7,n.1, p 8 – 16, 2002.

MITCHELL, A.; SILVA, J.M. T.; BARRETT,J.L.; LIMA, M. A. A.; GUERRANT, L. R. Age-Specific *Helicobacter pylori* Seropositivity Rates of Children in an Impoverished Urban Area of Northeast Brazil. **Journal Clinical Microbiology**,v. 41, n. 3, p. 1326-1328, 2003.

MINCS, N. Úlcera péptica gástrica e duodenal também estão associadas à *Helicobacter pylori*. **Médico Repórter**, v. 3, p. 9, 2001.

MISZPUTEN, S. Bactéria intriga cientistas desde o século passado. **Médico Repórter**, v. 3, p. 3-4, 2001.

MOBLEY, H. Defining *Helicobacter pylori* as a pathogen: strain heterogeneity and virulence. **American Journal of Medicine**, v.100,p. 25S – 11S, 1996.

MOBLEY HL, ISLAND MD, HAUSINGER RP. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol Rev**, v.59, n.3, p.451 – 80, 1995 Review

MOBLEY, H. L. T. *Helicobacter pylori* factors associated with disease development. **Gastroenterology**, v.113, p. S21 – S28, 1997.

MONTEIRO, L., GRAS, N., VIDAL, CABRITA, J., MÉGRAUD, F. Detection of *Helicobacter pylori* in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. **Journal of Microbiological Methods**, v. 45, p.89-94, 2001.

MONTECUCCO, C.; PANINI, E.; BERNARD, M.; ZORATTI, M. Molecular and cellular activities of *Helicobacter pylori* pathogenic factors. **FEBS Lett.**; v.452,p. 16-21, 1999.

MONTECUCCO, C.; DE BERNARD, M.; PAPPINI, E.; ZORATTI, M. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: cell intoxication and anion – specific channel activity. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 257, p.113-29, 2001.

MORAES, C.M.M.; DA SILVA, P.A.G. Risk factors for *Helicobacter pylori* infection in children. **Journal of Pediatric (Rio J)**, v.79, n.1, p. 21-8, 2003.

MORAN, A. P. Pathogenic properties of *Helicobacter pylori*. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.31, n.215, p. 22-31, 1996.

MOUSAVI, S.; MOGHADAS, F., SEMNANI, V. IRAJIAN, G.R.; BABAEI, M., TOUSSY J.; MALEK,F. Prospective evaluation of a new “paper urease test” for ultra-rapid detection of *Helicobacter pylori* **Med Sci Monit**,v.12,n.3, p.115-18,2006.

MOURAD-BAARS, P.; CHONG, S. *Helicobacter pylori* infection in Pediatrics. **Helicobacter**, v. 11,n.1, p. 40-45, 2006.

MURAKAMI, M.; YOOK, J. K.; TERAMURA, S.; YAMAMOTO, K.; SAITA, H.; MATUO, K.; ASADA, T.; KIKI, T. Generation of ammonia and mucosal lesion formation following hydrolysis of urea by urease in the rat stomach. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.12, n.5, p. 483-7, 1990.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v.33, n.3.; p.323-36, 2002.

NAKAYAMA, Y.; GRAHAM, D.Y. *Helicobacter pylori* infection: diagnosis and treatment. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 2, 599-610, 2004.

NAMEKATA, T.; MIKI, K.; KIMMEY, M.; FRITSCHKE, T.; HUGHES, D.; MOORE., D.; SUZUKI, K. Chronic Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection among Japanese Americans in Seattle. **American Journal of Epidemiology** v. 151, n. 8, 2000.

NGUYEN, V. Q.; CAPRIOLI, R. M.; COVER , T. L. Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. **Infection and Immunity**, v.69, n.1, p. 543-6, 2001.

NIZAMI, S.Q.; BHUTTA, Z.A.; WEAVER, L.; PRESTON, T. *Helicobacter pylori* colonization in infants in a periurban community in Karachi, Pakistan. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**., v. 41, p. 194-4, 2005.

NOMURA, M., LEE, J., STEMMERMANN, G. N., NOMURA, R. Y., PEREZ-PEREZ, G. I., BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* CagA seropositivity and gastric carcinoma risk in a Japanese American population. **Journal of Infectious Diseases**, v.186,p. 1138 – 1144, 2002.

O'ROURKE, J. L.; GREHAN, M.; LEE, A. Non-pylori *Helicobacter* species in humans. **Gut**, v. 49, p. 601 – 606, 2001.

OLIVEIRA, A.M.R.; QUEIROZ, D.M.M.; ROCHA, G.A.; MENDES, E.N. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. **American Journal of Gastroenterology**, v.89, p.2201-04, 1994.

ODENBREIT, S.; PULS, J.; SEDLMAIER, B.; GERLAND, E., FISCHER, W.; HAAS, R.; Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. **Science**, v. 287, p. 1497-500, 2000.

PALMER, E.D. Investigation of the gastric mucosa spirochetes of the human. **Gastroenterology**, v.95, p. 218-220, 1954.

PAPINI, E.; SATIN, B.; NORAIS, N.; DE BERDARD, M.; TELFORD, J. L.; RAPPUOLI, R.; MONTECUCCO, C. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102,n.4, p. 813-20, 1998.

PARSONNET, J.; FRIEDMAN, G. D.; VANDERSTEEN, D. P.; CHANG, Y.; VOGELMAN, J. H.; ORENTREICH, N., AND SIBLEY, R. K. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v.325, p. 1127 – 1131, 1991.

PARSONNET, J., SHMUELY, H., HAGGERTY, T. Excreção fecal e oral de *H. pylori* por adultos sadios infectados. **Journal of American Medical Association Brazil**, v.4, n.3, p. 2935-2944, 2000.

PEÑA, J. A.; MCNEIL, K.; FOX, J. G.; VERSALOVIC, J. Molecular Evidence of *Helicobacter cinaedi* Organisms in Human Gastric Biopsy Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1511–1513, 2002.

PEREZ-PEREZ, G. I., ROTHENBACHER, D., AND BRENNER, H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, v.9. suppl1, 2004.

RAVEL, R. Doenças infecciosas bacterianas. In: **Laboratório clínico**: aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,p.171.1997.

RIMBARA, E.; NOGUCHI, N.; TANABE, M.; KAWAI, T.; MATSUMOTO, Y.; SASATSU, M. Susceptibilities to clarithromycin, amoxicillin and metronidazole of *Helicobacter pylori* isolates from the antrum and corpus in Tokyo, Japan, 1995–2001. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 307 – 31, 2005.

QUEIROZ, D.M.M.; LUZZA, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, v. 11,n.1, p. 1-5.2006.

QUERALT, N.; BARTOLOMÉ, R.; ARAÚJO, R. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north – east of Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 889-895, 2005.

RAGUZA D, GRANATO CFH, KAWAKAMI E. Evaluation of the stool antigen test for *Helicobacter pylori* in children and adolescents. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, p. 453 – 7, 2005.

RASO, P.; NOGUEIRA, F.M.M.A; FILHO,B.G.; BARBOSA, A.J.A. Tubo digestivo. Peritônio. In. Bogliolo Patologia. Fgillo, B.G. (ed). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A; p. 577 - 642, 2000.

RAUTELIN, H.; LEHOURS, P.; MEGRAUD, F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 8,n.1, 2003.

RAYMOND, J., SAUVESTRE, C. KALACH, N., BERGERET, M., DUPONT, C. Immunoblotting and serology for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. **Pediatric Infectious Disease Journal**., v. 19, p. 118-21,2000.

ROCHA, A.G.; ROCHA, A.M.C.; SILVA,L.D; SANTOS, BOCEWICZ, A.C.D.; QUEIROZ, R.M.; BETHONY, J.; GAZZINELLI, A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; QUEIROZ, D. M. M. Transmission of *Helicobacter pylori* infection in families of preschool-aged children from Minas Gerais, Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, v.8, p. 987-991, 2003.

ROCHA, G.A.; OLIVEIRA, A.M.R.; QUEIROZ, D.M.M.; CARVALHO, A.S.T.; NOGEURIRA, A.M.M.F. Immunoblot analysis of humoral immune response to *Helicobacter pylori* in children with and without duodenal ulcer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1777-81, 2000.

ROWLAND, M.; KUMAR, D.; DALY, L.; O'CONNOR, P.; VAUGHAN, D.; DRUMM, B. Lowes rates of *Helicobacter pylori* reinfection in children. **Gastroenterology**, v. 117, p. 336-41, 1999.

ROWLAND, M.; DALY, L.; VAUGHAN, M.; HIGGINS, A.; BOURKE, B.; DRUMM, B. Age – Specific Incidence of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**., v. 130, p. 65-72, 2006.

RUGGE, M.; BUSATTO, G.; CASSARO, M.; SHIAO, Y.H.; RUSSO, V.; LEANDRO, G.; AVELLINI, C.; FABIANO, A.; SIDONI, A.; COVACCI, A. Patients younger than 40 years with gastric carcinoma- *Helicobacter pylori* genotype. **Cancer**, v.85, p. 2506-2511,1999.

SABARTH, N.; LAMER, S.; ZIMNY-ARNDT, U.; PETER, R.; JUNGBLUT, R. P.; MEYER, F. T.; BUMANN, D. Identification of surface proteins of *Helicobacter pylori* by selective biotinylation, affinity purification, and two-dimensional gel electrophoresis. **Journal Biological Chemistry**, v.277,p.27896–902, 2002.

SABBI, T., DE ANGELIS, P., COLISTRO, F., DALLÒGLIO, L., DI ABRIOLA, G. F., CASTRO, M. Efficacy of Noninvasive Tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori*

infection in pediatric patients. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 159, p.138 – 241, 2005.

SAITO, N.; KONISHI, K.; SATO, F.; KATO, M.; TAKEDA, H.; SUGIYAMA, T.; ASAKA, M. Plural Transformation-Processes from Spiral to Coccoid *Helicobacter pylori* and its Viability. **Journal of Infection**, v.46, p.49-55, 2003.

SALAMA, N. R.; OTTO, G.; TOMPKINS, L.; FALKOW, S. Vacuolating Cytotoxin of *Helicobacter pylori* Plays a Role during Colonization in a Mouse Model of Infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 730 – 736, 2001.

SCHUTZE, K.; HENTSCHEL, E.; DRAGOSICS, B.; HIRSCHL, A.M. *Helicobacter pylori* reinfection with identical organisms: transmission by the patients' spouses. **Gut**, v. 36(6), p. 831-3, 1995.

SEN, N., YILMAZ, O., SIMSEK, I., KÜPELIOGLU, A.A., ELLIDOKUZ, H.,v.10,n.4, Detection of *Helicobacter pylori* DNA by a Simple Stool PCRMethod in Adult Dyspeptic Patients. **Helicobacter**, v.10, n.4, 2005.

SHAHAMAT, M.; ALAVI, M.; WATTS, M. E. J.; GONZALEZ, M. J.; SOWERS, R. K.; MAEDER, W. D.; ROBB, F. T. Development of Two PCR-Based techniques for Detecting Helical and Coccoid Forms of *Helicobacter pylori*. **Journal of Clinical Microbiology**,v. 42,n.8,p. 3613-3619, 2004.

SHERI, P. et al. Coccoid and Spiral *Helicobacter pylori* Differ in Their Abilities to Adhere to Gastric Epithelial Cells and Induce Interleukin-8 Secretion. **Infection Immunity**, v.65,p. 843-846, 1997.

SHIMOYAMA, T.; CRABTREE, J. E. Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v.43,p. S2-S5, 1998.

SHUBER, A.P.; ASCANO, J.J, BOYNTON, K.A., MITCHELL, A., FRIERSON JR, H.F., EL-RIFAI, W., POWELL, S.M. Accurate, Noninvasive Detection of *Helicobacter pylori* DNA from Stool Samples: Potential Usefulness for Monitoring Treatment . **Journal Clinical Microbiology**, v. 40,n.1, p. 262–264,2002.

SICINSCHI, L. A., CORREA, P., BRAVO, L. E., SCHNEIDER, B. G. Detection and typing of *Helicobacter pylori cagA/ vacA* genes by radioactive, one – step polymerase chain reaction in stool samples from children. **Journal of Microbiological Methods**, v.52,p. 197 – 207, 2003.

SIDRANSKY, D.; TOKINO, T.; HAMILTON, S.; KINZLER, K.; LEVIN, B.; FROST, P.; VOGELSTEIN, B. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. **Science**, v. 256, p. 102 – 105, 1992.

SOLNICK, J.V. Clinical significance of *Helicobacter* species other than *Helicobacter pylori*. **Clin Infect Dis.**, v. 36, p. 349-54, 2003.

SOLNICK, J. V., HANSEN, L. M.; SYVANEN, M. The major sigma factor (RpoD) from *Helicobacter pylori* and other Gram negative bacteria shows an enhanced rate of divergence. **J. Bacteriol**,v. 179,p. 6196-6200, 1997.

SOLNICK1, J. V.; SCHAUER, D. B. Emergence of Diverse *Helicobacter* Species in the Pathogenesis of Gastric and Enterohepatic Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 1, p. 59 – 97, 2001.

SOUSA, M. B.; LUZ, L. P; MOREIRA, D. M.; BACHA, ° M.; CHULTZ, R. G.; EDELWEISS, M. I. Prevalência da infecção por *Helicobacter pylori* em crianças avaliadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 132-37, 2001.

STEVENS, A.; LOWE, **J. Patologia.2ªed.** Ed. Manoel Ltda, p. 221-224, 1998.

SUERBAUM, S., MICHETTI, A. *Helicobacter pylori* Infection. **N. Engl. J. Méd**,v.347,n. 15,p.1175-1186, 2002.

STRINGER, VEYSI, V.T.; PUNTIS, J.W.; BATCUP, G.; DIXON, M.F. Gastroduodenal ulcers in the *Helicobacter pylori* era. **Acta Paediatr**, v. 89,n.10, p. 1181-5, 2000.

SUERBAUM, S.; ACHTMAN, M. Evolution of *Helicobacter pylori*: the role of recombination. **Trends in Microbiology**, v. 7,n.5, p. 182-184, 1999.

SUERBAUM, S. & MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* infection. **N Engl J Med**. 347(15): 1175-86,2002.

TAYLOR, N. S.; ESTEVES, M.; FOX, J. G. Cross reactivity with *Helicobacter pylori* species assayed with a *Helicobacter pylori* antigen capture assay. **Gastroenterology**, v. 116, p. A830, 1999.

TELFORD, J. L., GHIARA, P., DELL-URCO, M., COMANDUCCI, M., BURRONI, D., BUGNOLLI, M., TECCE, M. F., CENSINI, S., COVACCI, A., XIANG, Z., PAPINI, E.,

MONTECUCCO, C., PARENTE, L., RAPPUOLI, R. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key Role in gastric Disease. **J. Exp. Med**, v.179, p. 1653 – 58, 1994.

TELFORD, J. L.; COVACCI, A.; RAPPUOLI, R.; CHIARA, P. Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. **Curr Opin Immunol**, v. 9, n.4, p. 498-503, 1997.
TOMB, J. F., WHITE, O., KERLAVAGE, A.R., CLAYTON, R. A., *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, v.388, p. 539–47, 1997.

THOMAS, J. E.; GIBSON, G. R.; DARBOE, M. K.; DALE, A.; WEAVER, L. T. Isolation of *H. pylori* from human faeces. **The Lancet**, v. 340, p. 1194-5, Nov. 1992.
THOMPSON, M. W. Cometary: *Helicobacter pylori* – the story so far. **British Medical Journal**, v. 319, p. 541, 1999.

TORRES, J. Epidemiologic and clinical aspects of *Helicobacter pylori* infection in children. **Rev Gastroenterol Mex**, v.65, n. 4 , p. S9-S13, 2000.

TORRES, J., PEREZ – PEREZ, G., GOODMAM, K.J., ATHERTON, J.C., GOLD, B.D., HARRIS, P.R., GARZA, A.M. GUARNER, J., MUÑOOS, O. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. **Archive Medical Research**, v.31, p. 431-69, 2000.

TSENG, F.; BROWN, E.; MAIESE, E.M.; YEAGER, M.; WELCH, R.; GOLD, B. D.; OWENS, M.; CRANSTON, B.; HANCHARD, B.; EL-OMAR, E.; HISADA, M. Polymorphisms Cytokine Genes and Risk of *Helicobacter pylori* Infection among Jamaican Children. **Helicobacter**, v. 11, p. 425 – 430, 2006.

TUMMURU, M. K.; COVER, T. L.; BLASER, M. J. Cloning and expression of a high – molecular – mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. **Infect Immun** v. 61, p. 1799-1809, 1993.

VAIRA, D.; D'ANASTASIO, C.; HOLTON, J.; DOUSETT, J.F.; LONDEI, M.; BERTONI, F.; BELTRANDI, E.; GRAVENFELS, P.; SALMON, P.R.; GANDOLFI, L. *Campylobacter pylori* in abattoir workers: is it a zoonoses? **Lancet**, v. 2, 725-6, 1998.

VAN-DOORN, L. J.; Figueiredo, C.; Sanna, R.; Plaisier, A.; Schneeberger, P., de Boer, W.; Quint, W. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v.115, n.1, p.58-66, 1998.

VELÁZQUEZ, M.; FEIRTAG, J. M. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. **International Journal of Food and Microbiology**, v.53,p. 95 – 104,1999.

VINETTE, K. M.B, GIBNEY, K.M, PROUJANSKYR., FAWCETT, P.T. Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing H. pylori infection in pediatric patients. **BMC Microbiology** , v.4, n.5, p. 1-7, 2004.

WANG, G. M.; HUMAYUN, Z.; TAYLOR, D.E. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. **Trends in Microbiology**, v. 7(12), p. 588-493, 1999.

WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR – based typing from forensic material. **BioTechniques**, v. 4, p. 506 – 513, 1991.

WARREN, J. R. Gastric pathology associated with *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 29, n. 3, p. 705 – 51, 2000.

WEEKS, D. L.; SACHS, G. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. **Molecular Microbiology**, v.40,n.6,p. 1249-89, 2001.

WESTBLOM, T. V.; FRITZ, S. B.; PHADNIS, S.; MIDKIFF, B. R.; LEON – BARVA, R.; RECAVARREN, S. et al. PCR analysis of Peruvian sewage water: support for fecal – oral spread of *Helicobacter pylori*. **Acta Gastroenterologica Belgica**, v. 56, suppl. 47, 1993.

WILCOX, M. H.; DENT, T. H. S.; HUNTER, O.J.; GRAY, J.J.; BROWN, D.F.J.; WIGHT, D.G.D.; WRAIGHT, E.P. Accuracy serology for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection- acomparison of eight kits. **Journal of Clinical Pathology**., v. 49, p.373-76,1996.

WIŚNIEWSKA, M.; NILSSON, H. O.; BAŁ-ROMANISZYN, L.; RECHCIŃSKI, T.; BIELAŃSKI, W.; PŁANETA-MAŁECKA, I.; PŁONKA, M.; KONTUREK, S.; WADSTRÖM, T.; RUDNICKA, W.; CHMIELA, M. Detection of specific *Helicobacter pylori* DNA and antigens in stool samples in dyspeptic patients and healthy subjects. **Microbiology and Immunology**, v. 46, p. 657 – 65, 2002.

YAKOUB, J.; FAN, X.; HU, G.; ZHANG, Z. Genetic and phenotype changes following in vitro interactions between *Helicobacter pylori* strains. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 19(6), p. 626 – 631, 2004.

YAMAOKA, Y.; KODAMA, T.; KASHIMA, K.; GRAHAM, D.Y.; SEPULVEDA, A.R. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, n. 8, p. 2258-63, 1998.

YAMAOKA, Y.; KODAMA, T.; KITA, M.; IMANISHI, J.; KASHIMA, K.; GRAHAM, D.Y. Relationship of *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* to *cagA* status, cytotoxin production, and clinical outcome. **Helicobacter**, v. 3 (4): 241-253, 1998b.

YAÑEZ, P., GARZA, A.M, PÉREZ – PÉREZ, G., CABRERA, L., MUÑOZ, O., TORRES, J. Comparison of invasive and noninvasive methods for the diagnosis and evaluation of eradication of *Helicobacter pylori* infection in children. **Archives of Medical Research**, v. 31, n.4, p. 415-21, 2000.

YE, D.; WILLHITE, D. C.; BLANKE, S. R. Identification of the minimal intracellular vacuolating toxin amino terminus: identification of amino acids essential for cellular vacuolating. **Infection and Immunity**, v.68,n.7,p. 4354-4357, 2000.

ZATERKA, S.; EISIG, J.N.; CHINZON, D.; ROTHSTEIN, W. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. **Helicobacter**, v.12, p. 82-88, 2007.

ZHANG, L.; DAY, A.; MCKENZIE, G.; MITCHELL, H. Nongastric *Helicobacter* Species Detected in the Intestinal Tract of Children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2276 – 2279, 2006

ZHOU, W.; YAMAZAKI, S.; YAMAKAWA, A; OHTANI, M.; ITO, Y.; KEIDA, Y.; HIGASHI, H.; HATAKEYAMA, M.; SI, J.; AZUMA, T. The diversity of *vacA* and *cagA* genes of *Helicobacter pylori* in East Asia. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 40, p.81-87, 2004.

ANEXOS

ANEXO A – Termo de Esclarecimento e Consentimento Livre

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: Estudo soroepidemiológico da infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* em crianças e em suas respectivas mães: avaliação dos fatores de risco.

Coordenadora da pesquisa: Tereza Cristina O. Corvelo, PhD, UFPA – Brasil (Fone: 0XX-91-2111558).

Endereço do pesquisador responsável: Av. Augusto Correa, n. 1 – Camus Universitário do Guamá – Belém – Pará – Brasil – Universidade Federal do Pará – Centro de Ciências Biológicas – Departamento de Genética – Fone: 0XX – 91 – 211 – 1558.

Esta pesquisa tem como objetivo principal identificar a presença de infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* em crianças internadas na Enfermaria de Pediatria do Hospital Universitário João de Barros Barreto, e fazer associação com esta infecção em suas respectivas mães. Para isto, será necessário que os participantes colaborem com amostras de sangue, saliva e fezes, além de responderem a um questionário que abrange condições de moradia, como saneamento básico, bem como condições socioeconômicas e de saúde do menor e da mãe. Assim, esclarecemos que:

1. Serão realizados exames em amostras de saliva, sangue, fezes da criança, e de sangue e saliva da mãe.
2. É necessário que a mãe responda a um questionário padrão, do qual retiraremos informações importantes para a pesquisa, pois conterà dados de identificação dos participantes.
3. As identidades dos participantes serão omitidas na pesquisa, sendo apenas utilizado os resultados dos exames e as informações do questionário.
4. As amostras de sangue e saliva serão coletadas por pessoal capacitado, com materiais de uso individual e posteriormente descartados, conforme normas de biossegurança.
5. As amostras de fezes das crianças serão coletadas a partir da evacuação espontânea. Os frascos serão distribuídos com a devida identificação, e as amostras serão coletadas pela mãe ou equipe de enfermagem.
6. O material coletado, bem como o questionário, serão usados exclusivamente para esta pesquisa.
7. Os resultados destes exames poderão apenas do conhecimento do pesquisador e do médico. Autoridades de saúde poderão ser informados sobre estes resultados a fim de possibilitar desenvolvimento de medidas que beneficiem os participantes e a comunidade.
8. Os resultados desta pesquisa serão apenas do conhecimento do pesquisador e do médico. Autoridades de saúde poderão ser informados sobre estes resultados a fim de possibilitar desenvolvimento de medidas que beneficiem os participantes e a comunidade.
9. A sua participação nesta pesquisa não é obrigatória. Assim também, não é obrigatória sua autorização para nos permitir a inclusão do menor sob sua responsabilidade.

CONSENTIMENTO

Declaro que li as informações descritas acima e que compreendo os benefícios desta pesquisa. Declaro também, por livre vontade, que como não terei prejuízo nenhum, nem o menor por quem me responsabilizo, aceito participar desta pesquisa e autorizo a participação do menor, cooperando com a coleta de nossos materiais biológicos para exames.

Belém, ____/____/____

Nome e assinatura do responsável pelo menor:

Nome do menor:

Endereço do
menor: _____

Nome do
entrevistador: _____

**ANEXO B – PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO
SERES HUMANOS**