

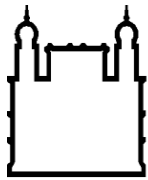
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Helicobacter pylori* EM LESÕES GASTRODUODENAIIS EM UMA POPULAÇÃO ADULTA DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO

Letícia Vellozo dos Reis

RIO DE JANEIRO
Março de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Letícia Vellozo dos Reis

Isolamento e caracterização genética de *Helicobacter pylori* em lesões gastroduodenais em uma população adulta do município do Rio de Janeiro.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária.

Orientadora: Prof. Dra. Mirian Claudia de Souza Pereira

RIO DE JANEIRO

Março de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

R375 Reis, Leticia Vellozo dos

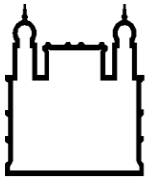
Isolamento e caracterização genética de *Helicobacter pylori* em lesões gastroduodenais em uma população adulta do município do Rio de Janeiro / Leticia Vellozo dos Reis. – Rio de Janeiro, 2015. xx,69 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.

Bibliografia: f. 59-67

1. *Helicobacter pylori*. 2. cagA. 3. Atividade inflamatória. 4. Mucosa gástrica. I. Título.

CDD 616.33014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: Leticia Vellozo dos Reis

Isolamento e caracterização genética de *Helicobacter pylori* em lesões gastroduodenais em uma população adulta do município do Rio de Janeiro

Orientadora: Prof. Dra. Mirian Claudia de Souza Pereira

Aprovada em: 13/04/2015

Examinadores: Dr. David Eduardo Barroso-Presidente (IOC-Fiocruz)

Dra. Adriana Hamond Regua Mangia (ENSP-Fiocruz)

Dr. Carlos Roberto Alves (IOC-Fiocruz)

Suplentes: Dra. Adriana Sotero Martins (ENSP-Fiocruz)

Dra. Cláudia Magalhães Calvet (IOC-Fiocruz)

A DEUS POR MAIS ESTA GRAÇA ALCANÇADA EM MINHA VIDA.

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho realizado com muita alegria, mas que também muito sacrifício me exigiu:

Aos meus queridos pais José Marques dos Reis e Elcy Vellozo dos Reis que com exemplo de estudo, dedicação à família, honestidade e caráter sempre acreditaram em mim, ensinando-me que o conhecimento é uma riqueza que não se pode tirar de ninguém.

Ao meu marido Jorge Farha, pelo constante incentivo para que eu investisse em mais este aprendizado, mesmo sabendo das minhas ausências junto à nossa família. Agradeço pelo apoio e por sempre acreditar em mim mesmo quando o caminho parecia “perdido”.

Às minhas queridas filhas Larissa e Layla que tiveram de se abster de muitos programas comigo (os “programas em família”) enquanto eu me dedicava à pesquisa, aos artigos e à digitação deste trabalho. Obrigada pela paciência e compreensão das “ausências” enquanto eu me dedicava a mais este projeto.

Aos meus irmãos Raquel e Alexandre por me incentivarem, acreditando no meu trabalho e esforço sempre. Obrigada por serem meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Mauro Brás de Lima, quem primeiro despertou em mim o interesse pelo mestrado. A você, meu muito obrigada!

À direção do Hospital Escola São Francisco de Assis-UFRJ, Profa. Dra. Maria Catarina Salvador da Motta, pelo pronto incentivo quando fui aprovada no concurso para a realização deste estudo, por acreditar em mim e por tornar realidade este trabalho ao aprovar o Hospital Escola São Francisco de Assis como cenário de prática.

À Profa. Dra. Ana Maria Vergueiro Borralho e Nair Flor de Oliveira Pires pelo apoio e compreensão da minha ausência para poder realizar este trabalho.

Ao Dr. Bennett Gomes Rezende, médico do Hospital Escola São Francisco de Assis, por permitir que eu acompanhasse alguns exames para coletar mais amostras e assim, agilizar meu trabalho. Às auxiliares da endoscopia digestiva Tereza Hortênci e Ednéia, pela dedicação no cumprimento da rotina deste trabalho.

À equipe do laboratório de análises clínicas do Hospital Escola São Francisco de Assis, pelo apoio ao ceder material e espaço para o processamento e armazenamento das amostras.

Ao Dr. Sylvio Sérgio Neves Provenzano, chefe do Serviço de Clínica Médica do Hospital Federal dos Servidores do Estado, ao Dr. David Perez Esteves da Clínica Médica e Dr. Paulo de Tarso Aparecida Pinto, chefe do setor de Gastroenterologia, agradeço pelo apoio ao consentir na minha liberação para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Paulo M. Valiante, médico patologista, pelas informações referentes à histopatologia.

À equipe do Serviço de Desenvolvimento de Pessoas do Hospital Federal dos Servidores do Estado, em especial à Elaine Cristina S. Gonçalves e Vânia Letícia e Silva que tanto me auxiliaram “nos trâmites legais” da minha liberação parcial para a concretização deste estudo.

Ao Prof. Dr. José Henrique da Silva Pilotto, médico pesquisador da Fiocruz, sou grata por suas orientações quanto as questões da Plataforma Brasil e as questões éticas da pesquisa. Obrigada por seu apoio e carinho.

Aos colegas de laboratório, Érica Miranda, Diego Cambuy, Koko Otsuki (Rosa), Fernanda Freitas e Verônica Vieira por terem me ensinado as técnicas de laboratório essenciais nesta pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos e pelo apoio nos momentos difíceis que passei.

À Adriana Cabral competente pesquisadora, obrigada pelo apoio e pelas orientações relacionadas à genética e programas de computação.

À Gabriela, assistente social da Fiocruz e Marcelo, psicólogo do NUST-Fiocruz meu agradecimento de coração. Pelo apoio no momento mais difícil que atravessei durante este período. Sem vocês ao meu lado talvez eu não tivesse chegado até aqui.

Aos novos amigos que fiz na turma da Biologia Parasitária e que comigo fecham mais este ciclo de vida. Todos competentes, dedicados e acima de tudo solidários. Certamente vocês fizeram e fazem a diferença. Obrigada pelo apoio, pela troca de conhecimentos, pela companhia, pelas risadas descontraídas e por compartilhar comigo os momentos difíceis onde foram totalmente solidários. Vocês são especiais.

Ao Prof. Dr. José Paulo Leite e Profa. Dra. Marize Miagostovich por terem me recebido de forma tão profissional em seu laboratório no momento em que mais precisei.

Meu agradecimento ao Prof. Dr. Rafael Freitas pelo apoio para a finalização deste trabalho.

A todos os professores que ministraram as aulas teóricas e práticas neste curso. A capacidade de todos em difundir o conhecimento é imensa. Aprendi muito com todos vocês.

Aos membros da banca avaliadora obrigada por aceitarem o convite.

À equipe da secretaria de ensino do Instituto Oswaldo Cruz, em especial à Rita por estar sempre à disposição para me esclarecer quanto às questões acadêmicas.

A todos os pacientes que colaboraram participando desta pesquisa. Obrigada pela confiança e por ajudarem a ciência com mais este conhecimento.

A todos aqueles que em algum momento colaboraram de diferentes formas para a concretização deste estudo. Muito obrigada!

Para terminar, meu agradecimento especial à Dra. Mirian por ter me recebido como sua aluna na finalização deste trabalho. Sua delicadeza, sua atenção às pessoas e ao aluno e sua competência são modelos a serem seguidos. Receber um aluno para ajudá-lo a finalizar um trabalho numa linha de pesquisa tão diversa da sua, é um ato de coragem e só confirma sua sabedoria e capacidade. Muito obrigada por sua orientação!

A todos, muito obrigada!

“SEI QUE MEU TRABALHO É APENAS UMA GOTA NO OCEANO,
MAS SEM ELE O OCEANO SERIA MENOR”.

Madre Teresa de Calcutá

LISTA DE SIGLAS e ABREVIATURAS

μL	microlitros
16sRNA	gene que codifica parte da subunidade 30s de procariotos
a.C.	antes de Cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	fator de transcrição ativador da proteína 1
BabA	adesina de ligação ao antígeno de Lewis
<i>babA</i>	gene associado à adesina de ligação ao antígeno de Lewis
C	carbono
<i>cagA</i>	gene associado à citotoxina A
CagA	proteína produzida pelo gene <i>cagA</i>
<i>cagE</i>	gene associado à citotoxina E
<i>cag</i> -PAI	ilha de patogenicidade <i>cag</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleotídeos trifosfato
<i>dupA</i>	gene promotor da úlcera
<i>glmM</i>	gene que codifica fosfoglicosamina mutase
HESFA	Hospital Escola São Francisco de Assis
IBP	inibidor de bomba de prótons
IgG	imunoglobulina G
IL-10	interleucina 10
IL-1 β	interleucina 1beta
IL-8	interleucina 8
INF- γ	interferon gama
IOC	Instituto Oswaldo Cruz

LPS	lipopolissacarídeo
MALT(linfoma)	linfoma de células B associado à mucosa
mg	miligramas
MG	Minas Gerais
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	minutos
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	milimoles
NF-κB	fator nuclear kappa B
ng	nanogramas
NH ₃	amônia
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de base
PA	Pará
PE	Pernambuco
PCR	reação em cadeia da polimerase
rpm	rotações por minutos
SP	São Paulo
SUS	sistema único de saúde
Taq polimerase	DNA polimerase termoestável
Th-1	células T auxiliares 1
Th-2	células T auxiliares 2
TNFα	fator de necrose tumoral alfa
TSB	caldo triptona de soja
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

UI	unidades internacionais
<i>ureA</i>	subunidade A do gene estrutural da urease
UV	ultravioleta
<i>vacA</i>	gene associado à citotoxina vacuolizante A
VacA	citotoxina vacuolizante

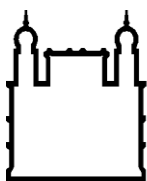
LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Prevalência da infecção por <i>H. pylori</i> no mundo.....	5
Figura 2- Imagem de caso de gastrite antral leve..	7
Figura 3- Imagem de caso de gastrite antral acentuada.	7
Figura 4- Imagem de lesão ulcerada gástrica em fase de cicatrização	8
Figura 5– Representação esquemática da sequência evolutiva a partir da infecção por <i>H. pylori</i> até o câncer gástrico	9
Figura 6- Imagem de câncer gástrico avançado no corpo distal.	10
Figura 7- Testes da urease, evidenciando dois possíveis resultados: positivo e negativo	14
Figura 8-. Imagem de <i>H. pylori</i> isolado e associado ao epitélio gastrointestinal visualizado por microscopia eletrônica de transmissão e varredura	16
Figura 9-. Princípio da reação de quebra de uma molécula de ureia pela urease bacteriana e alcalinização do pH local	20
Figura 10-Patogênese de <i>H. pylori</i> e resposta inflamatória.....	25
Figura 11 – Perfil de lesões gástricas evidenciadas à endoscopia digestiva alta (%)......	38
Figura 12 -Cultivo de material biológico proveniente de biópsia gástrica em meio sólido com albuMAX II®.	39
Figura 13 - Teste da urease e amplificação dos genes <i>glmM</i> , <i>vacA</i> e <i>cagA</i> a partir dos isolados obtidos.....	41
Figura 14 – Achados endoscópicos e status <i>cagA</i> + nas linhagens cultivadas	42
Figura 15- Imagem representativa de 56 amostras positivas para <i>H. pylori</i> ao histopatológico.	43
Figura 16 - Valor percentual de amostras <i>cagA</i> + e <i>cagA</i> - e sua associação com a intensidade da inflamação tecidual nas regiões do antro e corpo gástrico	45
Figura 17 -Infiltrados inflamatórios em lâminas coradas pela H&E.	46
Figura 18 - Curva de prevalência para as diferentes faixas etárias em relação ao total em cada faixa etária.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequencia dos primers, tamanho dos produtos de PCR em pares de base (pb) e condições de termociclagem para os genes *glmM*, *cagA* e *vacA*.....34

Tabela 2- Resultados obtidos com os métodos de detecção e caracterização de *H. pylori* nas 72 amostras do estudo.....44



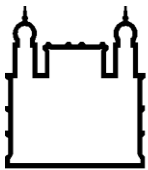
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

Desde sua associação com as doenças gastroduodenais como a úlcera péptica, a gastrite crônica e o câncer gástrico em 1982, a infecção por *Helicobacter pylori*, é reconhecida como uma das mais prevalentes, infectando cerca de 50% da população mundial. No entanto, devido a sua imensa variabilidade na prevalência, nos fatores de virulência e no desfecho da infecção, estudos regionais são sempre recomendados. Por ser uma bactéria fastidiosa, *H. pylori* tem no seu isolamento um método demorado, não possuindo um meio de cultivo ideal e por isso apresenta diferentes resultados com esta metodologia. A histologia, é o método mais utilizado na prática para a detecção deste microrganismo, permitindo também a avaliação da mucosa gástrica e do seu grau de inflamação. Técnicas moleculares como reação em cadeia da polimerase também são muito usadas em pesquisas para detecção da bactéria e de genes de virulência, a exemplo, do gene *cagA*. Estudos demonstram que a presença deste gene pode caracterizar as linhagens de acordo com a maior intensidade da inflamação deflagrada nas regiões gástricas. No presente estudo, coletamos biópsias do antro e corpo gástrico de 72 pacientes entre 19 e 77 anos, com lesões gastroduodenais evidenciadas na endoscopia digestiva alta. O isolamento da bactéria a partir de fragmento do antro, foi realizado em meio Brucella com albuMAXII[®]. Em 64% (46/72) das amostras visualizamos colônias puntiformes que imediatamente foram positivas no teste da urease. O DNA destes isolados foram submetidos a PCRs para os genes *glmM* (codifica uma fosfoglicosamina mutase) e *vacA* (codifica a citotoxina vacuolizante VacA), obtendo-se amplificação em 91% (42/46) e em 82% (38/46) dos isolados, respectivamente. Para as amostras negativas em cultivo, procedemos à extração do DNA diretamente do tecido gástrico e posterior amplificação do gene *glmM*. Das 26 amostras testadas, o gene *glmM* foi amplificado em 4 (15%) amostras de tecido gástrico. Para caracterizar as linhagens, as amplificações também foram realizadas para o gene *cagA*, sendo este evidenciado em 65% (30/46) dos isolados. As análises histopatológicas a partir de biópsias do antro e corpo revelaram a bactéria em 77% (56/72) das amostras, além de avaliar o grau de inflamação nestas duas regiões. Estes achados foram então associados com as respectivas linhagens *cagA+* e *cagA-*. Os resultados demonstraram atividade inflamatória moderada-acentuada no antro (54,1%-45,8%) e corpo (58,3%-37,5%) gástrico associados a linhagens *cagA+*, e também no antro associado a linhagens *cagA-* (46,1%-38,4%). No corpo gástrico, no entanto, resultados diferentes foram observados para as linhagens *cagA-* com amostras apresentando leve (46,1%) ou acentuado infiltrado inflamatório (38,4%). Esses dados podem representar a interação de outros fatores no desfecho da inflamação como polimorfismos nos genes relacionados a resposta inflamatória e ainda, a presença de outros genes de virulência nas linhagens estudadas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

ABSTRACT

Since its association with gastroduodenal diseases such as peptic ulcer, chronic gastritis, and gastric cancer in 1982, *Helicobacter pylori* infection has been recognized as one of the most prevalent, infecting about 50% of the world population. However, due to its immense variability in prevalence, virulence factors and outcome of infection, regional studies are always recommended. Because it is a fastidious bacteria, *H. pylori* is a time-consuming in its isolation method, having no ideal culture medium and therefore presents different results with this methodology. Histology is the most common method in clinical practice for the detection of this microorganism, allowing the evaluation of the mucosa and the degree of inflammation. Molecular techniques such as polymerase chain reaction are also widely used in research to detect the bacteria and virulence genes, like *cagA* gene. Studies have shown that the presence of this gene may characterize the strains according to the greater intensity of inflammation triggered in gastric regions. In the present study, we collected biopsies of the gastric antrum and body of 72 patients, with ages between 19 and 77 years old, whose endoscopy showed gastroduodenal lesions. The isolation of the bacteria from an antral biopsy was accomplished in Brucella media with albuMAX II®. In 64% (46/72) of the samples, we visualized pinpoint colonies that were immediately positive in the urease test. We performed PCR assays on DNA from the isolates for the *glmM* (encodes for a phosphoglucosamine mutase) and *vacA* (encodes the production of a vacuolating cytotoxin) genes, resulting in amplification of 91% (42/46) and 82% (38/46), respectively. For negative samples in culture, we proceed to DNA extraction directly from gastric tissue and subsequent amplification for the gene *glmM*. Of 26 samples tested, the *glmM* gene was amplified in 4 (15%) of the gastric tissue samples. To characterize the strains, the amplifications were also performed for the *cagA* gene, which was evidenced in 65% (30/46) of the isolates. The histopathological analysis using samples of the gastric antrum and body, revealed the bacteria in 77% (56/72) of the samples besides evaluating the degree of inflammation in these two regions. These findings were then correlated with the respective *cagA* + and *cagA*- strains. The results showed moderate to severe inflammatory activity in the gastric antrum (54.1%-45.8%) and body (58.3%-37.5%) associated with *cagA* + strains and also in the antrum associated with *cagA*- strains (46.1%-38.4). In the gastric body, however, different results were observed for *cagA*- strains with samples presenting mild (46.1%) or severe (38.4%) inflammatory infiltrate. Such data may represent the interaction of other factors in the outcome of inflammation as polymorphisms in the genes related to inflammatory response, and the presence of other virulence genes in the studied strains.

SUMÁRIO

<i>AUTOR: Leticia Vellozo dos Reis</i>	i
LISTA DE SIGLAS e ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvi
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Úlcera péptica: histórico e patogenia.....	2
1.2. Doenças gastroduodenais causadas por <i>H. pylori</i> : epidemiologia, características clínicas e transmissão.....	3
1.3. Tratamento e Diagnóstico.....	12
1.4 <i>Helicobacter pylori</i>	15
1.5. Aspectos genéticos: virulência e patogenicidade.....	16
1.5.1. Motilidade de <i>H. pylori</i> e sua adesão ao epitélio gastroduodenal	18
1.5.2. Urease.....	19
1.5.3. Gene <i>cagA</i>	20
1.5.4. Gene <i>vacA</i>	21
1.5.5. Gene <i>cagE</i>	21
1.5.6. Gene <i>babA</i>	22
1.5.7. Gene <i>dupA</i>	22
1.6 Resposta Imune	22
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Aspectos éticos da pesquisa	29
4.2 População estudada e critério de exclusão	29
4.3 Coleta e processamento de material biológico	30
4.4 Análise histopatológica.....	31
4.5 Cultivo em placa e extração térmica do DNA.....	31
4.6 Extração do DNA bacteriano a partir de amostras de tecido gástrico	32
4.7 Reações de PCR.....	33
4.8 Análise dos produtos amplificados	35
4.9 Purificação e Sequenciamento dos produtos de PCR	35

4.10 Análise dos dados gerados pelo sequenciamento.....	36
5.RESULTADOS.....	38
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	57
8. PERSPECTIVAS.....	58
9. BIBLIOGRAFIA.....	59
10. ANEXO I.....	68
ANEXO II.....	69

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Úlcera péptica: histórico e patogenia

A úlcera péptica é uma lesão crônica no tecido epitelial do trato digestório, majoritariamente no estômago e duodeno, inicialmente associada a fatores ambientais, tabagismo e/ou estresse social que acarretassem desequilíbrio entre a secreção ácida e o mecanismo de defesa da mucosa gastrointestinal (1). Na maioria dos casos, as lesões são únicas, mas cerca de 5% a 20% dos indivíduos apresentam múltiplas lesões simultâneas no estômago e duodeno (2).

As primeiras observações de úlcera péptica advêm do século IV a.C. quando foi relatada a primeira cirurgia para úlcera gástrica no Templo de cura (Templo de Asclépio) na Grécia Antiga (revisto por Graham 2014 (3)). Dados paleontológicos reforçam a presença desta doença milenar através da detecção de úlcera péptica em autópsia de múmia de 2000 anos (homem da dinastia de Han Ocidental falecido em 167 anos a.C.) na China (4). Diferentes relatos de úlcera péptica foram reportados entre o século XVI e XIX, mas sem definição dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença.

O primeiro relato de *Helicobacter* gástrico foi feito pelo anatomista italiano Bizzozero em 1893 ao estudar a mucosa gástrica de cães. Suas anotações desenhadas à mão, mostravam microrganismos nos canalículos de células parietais e nas glândulas gástricas. O trabalho de Bizzozero foi ampliado por Salomon que conseguiu infectar uma colônia de ratos ao alimentá-los com mucosa gástrica de cães e gatos (5).

No século XX médicos patologistas e anatomistas descreviam de tempos em tempos microrganismos na mucosa gástrica humana adjacentes às lesões neoplásicas. Nos anos 40 Freedberg e Baron nos Estados Unidos, relataram a presença de espiroquetas em espécimes gástricos ressecados. Nos anos 50 e 60, Susumu Ito na escola de Medicina de Harvard, além de detalhada descrição da mucosa gástrica observada sob microscopia eletrônica, publicou fotografia da bactéria com seus flagelos e morfologia em espiral dentro de uma célula da glândula parietal. Posteriormente nos anos 70, Steer e Colin-Jones notaram numerosas bactérias espiraladas em mais de 80% de espécimes de úlceras gástricas, no entanto foram incapazes de cultivá-las, pois nesta época, as técnicas de microaerofilia ainda eram pouco conhecidas (5).

Anos mais tarde, em 1979, Robin Warren, um médico patologista em Perth na Austrália ocidental, notou que bactérias curvas estavam frequentemente presentes em espécimes de biópsias gástricas submetidas a exame histopatológico (6). Estes microrganismos não estavam presentes dentro da mucosa gástrica, mas na camada de muco sobre o tecido (7). Warren observou que organismos semelhantes haviam sido descritos desde o final do século XIX, no entanto, nunca tinham sido isolados. Em 1983, um jovem estagiário de medicina, Barry Marshall, interessou-se pelas observações de Warren e juntos procuraram isolar o organismo. Baseado na aparência de bastonete curvo e sua identificação como bactéria gram-negativa, métodos para isolamento de espécies de *Campylobacter* foram então aplicados para cultivo desta bactéria: meio seletivo sob condição de microaerofilia. Um total de 30 biópsias de pacientes foram cultivadas e apenas 1 amostra, que acidentalmente foi cultivada por período mais longo, apresentou crescimento bacteriano (8). Posteriormente, microrganismos foram isolados de onze pacientes, sendo caracterizados e inicialmente nomeados *Campylobacter pyloridis* (8) e mais tarde *Campylobacter pylori*, até que em 1989 recebeu a atual denominação de *Helicobacter pylori* (6). Diversas pesquisas se iniciaram pelo mundo confirmando *H. pylori* como agente patogênico de gastrite, úlceras duodenal e gástrica e câncer gástrico (9). *H. pylori* também está associado ao desenvolvimento de linfoma MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*) (10; 11), sendo declarado como carcinógeno do tipo I para humanos pela Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer, um órgão da OMS, em 1994 (6).

As descobertas de Warren e Marshall renderam-lhes o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia do ano de 2005, pois desafiaram dogmas e permitiram avanços na área da gastroenterologia. O sucesso do isolamento e cultivo deste microrganismo permitiu a associação de *H. pylori*, a importantes doenças gastroduodenais como a úlcera péptica.

1.2. Doenças gastroduodenais causadas por *H. pylori*: epidemiologia, características clínicas e transmissão.

A infecção por *H. pylori* acomete metade da população mundial e é considerada a mais frequente e persistente infecção bacteriana no mundo (9). A incidência e prevalência desta infecção possui alta variabilidade segundo região geográfica, idade, etnia, raça e fatores socioeconômicos. Dados de vigilância epidemiológica revelam maior prevalência

da infecção por *H. pylori* nos países em desenvolvimento comparados a países desenvolvidos (12). Estes índices podem alcançar 70% da população em países em desenvolvimento, enquanto em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, este perfil de infecção é geralmente inferior a 30%. No entanto, a prevalência da infecção por *H. pylori* é variável em países de primeiro mundo, a exemplo da Escócia que possui elevada prevalência (65%), sendo 95% das lesões ulceradas associadas com a infecção bacteriana (13; 2).

A aquisição da infecção ocorre principalmente durante a infância e, como geralmente não há cura espontânea, o indivíduo passa a albergar a bactéria por toda sua vida (14). Na infância, a prevalência da infecção por *H. pylori* nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento pode atingir até 50% das crianças aos cinco anos de idade, e acima de 70% aos 10 anos de idade (14). Em contraste, em países desenvolvidos as taxas de prevalência não ultrapassam 10% aos 10 anos de idade (15). Com relação à população adulta, há uma menor taxa de aquisição da infecção, resultando em pequeno incremento na taxa de prevalência ao longo desta fase da vida.

Como exemplo da variabilidade na prevalência da infecção por *H. pylori* entre diferentes países ou mesmo entre populações de um mesmo país, podemos citar o estudo randomizado multicêntrico realizado no período de 2009 a 2012, onde populações de seis países da América Latina foram analisadas pelo mesmo método de diagnóstico (teste da urease). Os dados demonstraram uma prevalência de 70,1% e 80,4% para duas regiões diferentes no México; 82,6% em Honduras; 77,6% na Costa Rica; 83,3% na Nicarágua; 76,8% no Chile e 83,1% na Colômbia (16). Em outro extremo, o estudo populacional realizado na Dinamarca entre os anos 2003 e 2009 evidenciou prevalência estimada de 20% para aquela população (17). Por conseguinte, as taxas de prevalência observadas nas diversas populações refletem, sobretudo, àquelas condições de vida que os indivíduos apresentavam durante a infância (uma vez que a aquisição da infecção ocorre nesta faixa etária), sendo consideradas fatores de risco determinantes para a aquisição da infecção por *H. pylori* (18).

Apesar das altas taxas de infecção em certas regiões do globo (Figura 1), a frequência da infecção por *H. pylori* está progressivamente declinando em todo o mundo (18). Este fato parece estar associado à industrialização dos países e ainda, a terapia de

erradicação da infecção do indivíduo e melhorias das condições sanitárias (15), sendo mais evidente em países desenvolvidos (19).

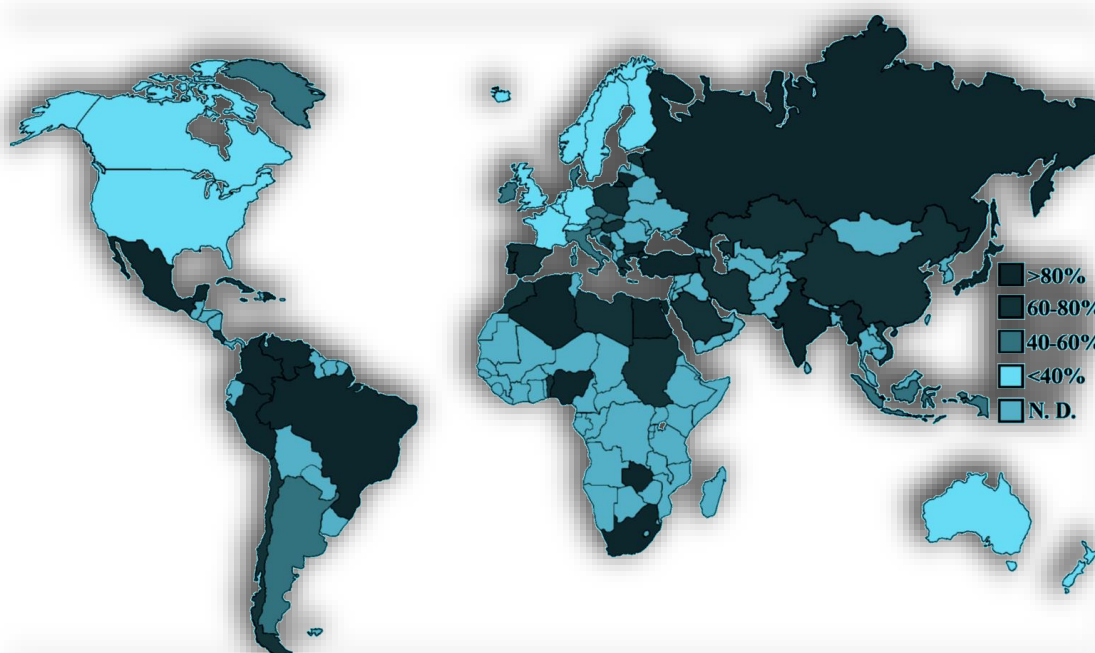


Figura 1- Prevalência da infecção por *H. pylori* no mundo. O mapa foi baseado em dados reunidos por Lunet e Barros (2003) e complementado com outros estudos. O critério usado para a seleção de novos estudos está também descrito em Lunet e Barros 2003. **N.D.** representa locais onde estudos consistentes sobre a prevalência de *H. pylori* ainda não foram realizados. Mapa extraído do artigo de Azevedo NF e cols, 2007 (19) (Crit. Rev. Microbiol, 33(3):157-169)

No Brasil, a maioria dos estudos de prevalência da infecção por *H. pylori* é referente a uma população infantil e/ou adolescente. Alguns poucos estudos avaliaram a prevalência da infecção em adultos e ainda, são limitados à população de alguns estados. Em uma comunidade em Fortaleza, por exemplo, a prevalência da infecção alcançou 73,3% na faixa etária de 11 a 20 anos e 87% em indivíduos da terceira idade (≥ 60 anos) (20). No Mato Grosso, a prevalência sorológica para a infecção por *H. pylori* foi de 84,7% (21) enquanto no Rio de Janeiro a prevalência de 67,8% foi descrita numa população adulta no ano de 1994 (22).

Considerando os aspectos étnicos, a análise de soroprevalência em negros, hispânicos e brancos revelou elevado índice de soropositivos na raça negra e hispânica nos Estados Unidos (23). Diferenças étnicas também foram evidentes na Nova Zelândia, onde a infecção por *H. pylori* foi mais prevalente em grupos das ilhas do pacífico, intermediária nos Maori e menos prevalente nos europeus. Após ajuste por idade e

estado socioeconômico o risco relativo para os dois primeiros grupos em relação a este último foi de 1.8 e 1.4, respectivamente (24). Estas diferenças na prevalência de *H. pylori* podem refletir diferenças em fatores sociais e/ou sanitários e no amplo uso de antibióticos para tratamento de outras infecções comuns, principalmente na infância (25). Ainda, esta variabilidade também pode estar relacionada com diferenças na predisposição genética à infecção por *H. pylori* (15). Não há evidências conclusivas quanto à prevalência da infecção em relação ao gênero (15), mas estudos demonstram que a úlcera péptica acomete um pouco mais os homens do que as mulheres (1.3:1) e apesar de ocorrer em qualquer faixa etária, as úlceras duodenais geralmente surgem entre 30 e 55 anos, enquanto as úlceras gástricas são mais comuns entre 55 e 70 anos (26).

Uma vez adquirida a infecção por *H. pylori*, esta persiste por toda a vida na ausência de tratamento, e a maioria dos indivíduos serão portadores assintomáticos (80-90%). Embora todas as linhagens causem algum grau de inflamação, somente 15% irá apresentar úlceras gástrica ou duodenal e 0,5-2,0% adenocarcinoma gástrico (27). A úlcera péptica caracteriza-se pela ruptura da mucosa gástrica que surge quando os fatores defensivos são sobrepujados por fatores luminiais agressivos. As úlceras ocorrem cerca de 5 vezes mais frequentemente no duodeno do que no estômago, e neste, localizam-se mais comumente no antro (60%). A dor epigástrica, que é característica da doença, não é sensível e específica o suficiente para servir como critério de diagnóstico e a história clínica não distingue acuradamente as úlceras gástricas das duodenais, sendo o diagnóstico e a diferenciação inclusive com lesões neoplásicas, baseadas na observação endoscópica e na realização de biópsias para avaliação histopatológica, que permite ainda a verificação da presença de *H. pylori*. (28)

O papel patogênico de *H. pylori* em 90% das úlceras duodenais e 80% das úlceras gástricas já foi comprovado (29). Sabe-se hoje que todas as linhagens de *H. pylori* causam gastrite histológica de longa duração caracterizada por infiltrado linfocítico e em algum grau neutrofílico, embora essa gastrite seja clinicamente silenciosa (30). Alguns indivíduos colonizados podem desenvolver gastrite do corpo associada à hipocloridria, atrofia gástrica, úlcera gástrica e risco aumentado para câncer gástrico (31). Inversamente, outros podem desenvolver gastrite predominantemente antral associada à hipercloridria gástrica e risco aumentado de úlcera duodenal (32). As figuras abaixo

exemplificam diferentes intensidades de gastrite e um caso de úlcera péptica endoscópica.



Figura 2- A imagem mostra um caso de gastrite antral leve diagnosticado à endoscopia digestiva. Observe no canto superior esquerdo pequena área de erosão (exame realizado pela autora- arquivo do HESFA).



Figura 3- A imagem revela um caso de gastrite antral acentuada. Observe as inúmeras erosões planas e elevadas (exame realizado pela autora – arquivo do HESFA).

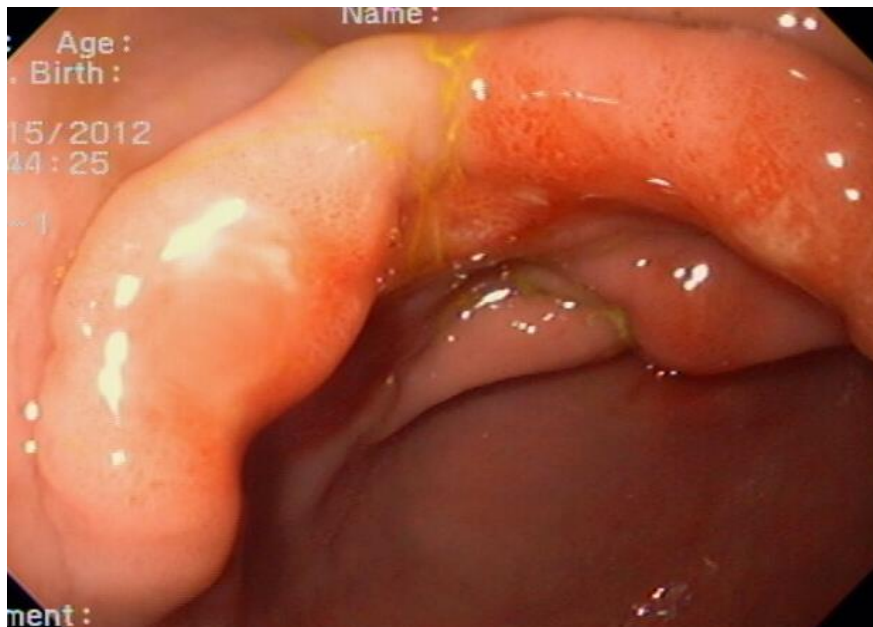


Figura 4- Nesta imagem observa-se extensa lesão ulcerada gástrica em fase de cicatrização na pequena curvatura do antro dista (exame realizado pela autora – arquivo do HESFA).

A progressiva alteração na mucosa pode acarretar o surgimento do câncer gástrico. O câncer gástrico do tipo intestinal progride da seguinte forma (33):

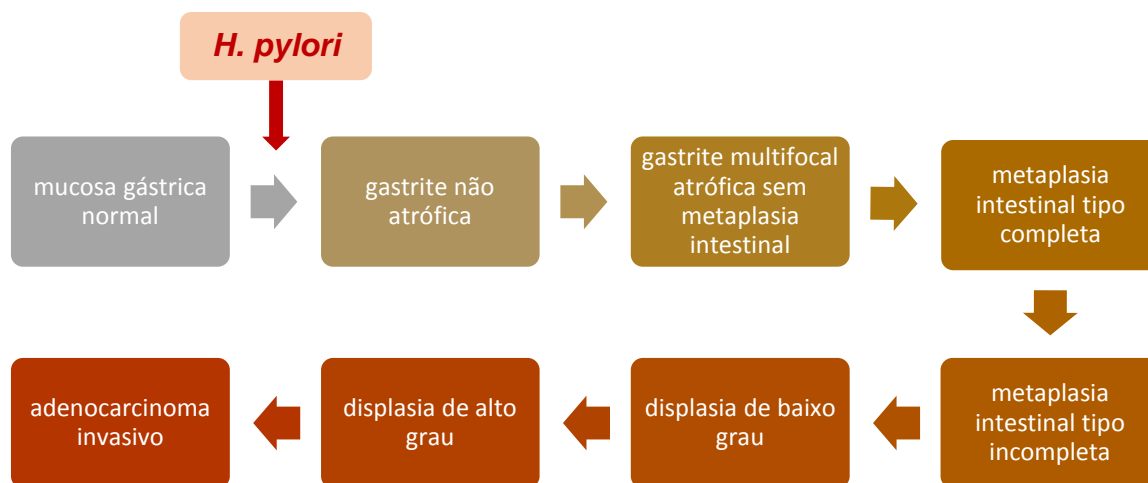


Figura 5— Representação esquemática da sequência evolutiva a partir da infecção por *H. pylori* até o câncer gástrico (adaptado de Correa P e Piazzuelo MB – *J Dig Dis* 2012, 13(1);2-9)

H. pylori também desempenha um papel no desenvolvimento e na progressão do linfoma MALT, sendo a erradicação desta bactéria, o tratamento para a doença localizada em estágio I (10).

O levantamento Globocan 2012, o mais completo sobre o ônus global de câncer no mundo, divulgado pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (órgão da OMS), relatou 952 000 novos casos de câncer gástrico no mundo, totalizando 6.8% de todos as neoplasias, o que a torna a quinta mais comum malignidade em humanos, com uma incidência duas vezes maior em homens do que em mulheres. Estes dados representaram uma mudança substancial desde 1975, quando o câncer gástrico ocupava a primeira posição no ranking das neoplasias (34).

As maiores taxas de ocorrência do câncer gástrico acontecem em países em desenvolvimento, onde são observados valores superiores à 70% dos casos (34), sendo as variações regionais devido a padrões dietéticos, fatores do hospedeiro, prevalência da infecção por *H. pylori* e seus fatores de virulência (35). *H. pylori*, além de ser um carcinógeno de classe I para humanos, é ainda considerado o mais comum fator

etiológico de câncer relacionado a infecções (36) ocorrendo em 2,9% dos pacientes infectados (37).

O câncer gástrico é incomun antes dos 40 anos e a idade média no momento do diagnóstico é de 63 anos (28). Geralmente é assintomático até que a doença esteja avançada, ainda assim os sintomas são inespecíficos e dependentes da localização do tumor sendo a endoscopia digestiva com realização de biópsias, exame de eleição para seu diagnóstico (26). A figura 6 exemplifica um caso de câncer gástrico avançado.

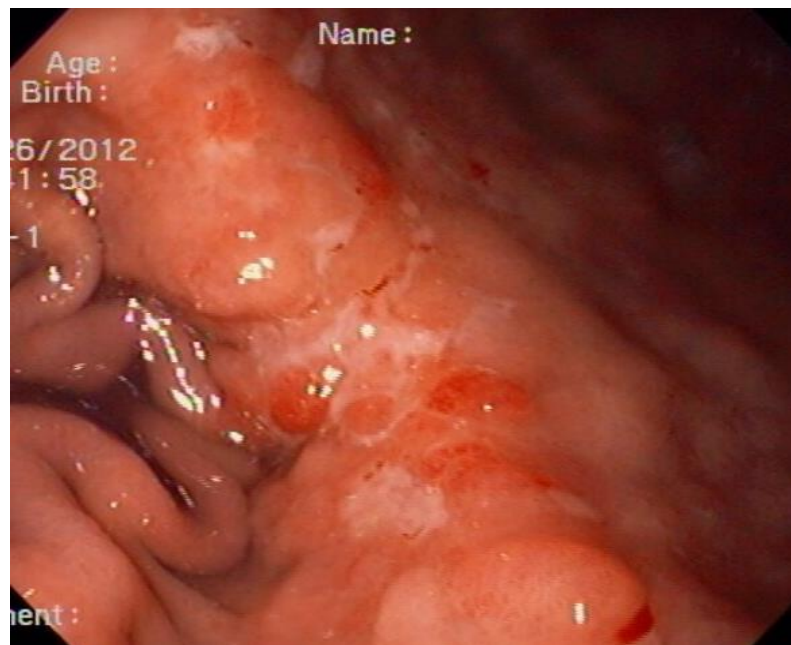


Figura 6- Imagem de câncer gástrico avançado no corpo distal. A lesão exibe áreas ulceradas e elevadas com interrupção abrupta das pregas gástricas (à esquerda) (exame realizado pela autora-arquivo do HESFA).

Várias outras patologias foram associadas à infecção por *H. pylori*, todas com estudos ainda muito controversos e não comprovados. À exceção da anemia de etiologia desconhecida (nível de evidência 1a) e de púrpura trombocitopênica idiopática (nível de evidência 1b), a infecção por *H. pylori* não tem papel comprovado em outras doenças extra-intestinais (38). Há relatos da associação de anemia por deficiência de ferro e *H. pylori* (39).

Embora o quadro clínico seja bem estabelecido, a transmissão de *H. pylori* não está completamente esclarecida, mas a propagação durante a infância entre humanos através das vias oral-oral e fecal-oral é considerada a mais plausível (40). O papel de irmãos mais velhos e principalmente de mães infectadas é relatado como possível fonte de infecção, sendo considerado um importante fator de risco (41).

A infecção via oral parece ser mediada por alimentos e água contaminados. A detecção de *H. pylori* em amostras de água para consumo humano, por métodos moleculares, aponta para uma possível via de transmissão desta bactéria. No entanto, a viabilidade e sua capacidade patogênica não foram determinadas (40).

Recentemente, estudos de meta-análise revelaram maior prevalência de *H. pylori* na cavidade oral de pacientes com infecção gástrica em relação aos indivíduos saudáveis. Além disso, a taxa de erradicação de *H. pylori* do estômago foi muito superior à erradicação da cavidade oral, levantando questões sobre a permanência da bactéria nesta região como fonte de reinfecção após tratamento de sucesso (42).

H. pylori é muito sensível aos ácidos biliares (43) no entanto, em casos de intensa aceleração do trânsito intestinal é possível seu isolamento e cultivo a partir das fezes, reforçando a rota de transmissão fecal-oral (44). Há relatos de transmissão sexual de *H. pylori* via oral-anal (45) e ainda, infecções acidentais através de endoscópios contaminados durante exame endoscópico ou procedimento cirúrgico (43). O tabagismo e a ingestão de bebida alcoólica não estão implicados na doença e, portanto, não são considerados fatores de risco (46).

Entender a forma de transmissão de *H. pylori* é fundamental para que medidas eficazes de saúde pública possam ser implementadas com o objetivo de reduzir e/ou prevenir sua disseminação (40). Entre as principais medidas destacamos (i) a melhoria das condições de vida das populações, (ii) saneamento básico e distribuição de água potável, (iii) educação sexual e higiene pessoal.

Recente atualização das diretrizes da Sociedade Japonesa para Pesquisa de *Helicobacter* em 2009 enfatizou a importância da erradicação de *H. pylori* na prevenção do câncer gástrico, recomendando que todos os infectados tenham a bactéria erradicada independentemente do desfecho clínico. Esta medida irá prevenir não somente o desenvolvimento de doenças relacionadas a *H. pylori* como também sua futura disseminação (47).

1.3. Tratamento e Diagnóstico

Há vários consensos ao redor do mundo referentes ao manejo e tratamento de *H. pylori*. No Brasil, O Terceiro Consenso Brasileiro de *H. pylori* organizado pelo Núcleo Brasileiro para o Estudo do *Helicobacter* atualizou em 2011 as recomendações para o manejo desta infecção sendo as seguintes as principais recomendações referentes ao tratamento antimicrobiano (48):

1. O tratamento tríplice convencional de primeira linha é composto de IBP (inibidor de bomba de prótons), amoxicilina 1,0 g e claritromicina 500 mg, administrado duas vezes ao dia durante 7 dias. A terapia tríplice ainda é a mais recomendada e utilizada no Brasil (49). A maioria dos consensos recomenda um período de tratamento de 7 dias, principalmente devido ao fator custo (48). Este esquema de tratamento é relativamente eficiente, apresentando taxa de erradicação em torno de 80% (49).

2. Os esquemas terapêuticos de segunda e terceira linha incluem IBP, amoxicilina e levofloxacina por 10 dias ou IBP, levofloxacina e furazolidona por 7-10 dias e ainda, esquemas quádruplos empregando IBP, subcitrato de bismuto coloidal, tetraciclina e metronidazol durante 10-14 dias (48).

Um dos consensos considerados pela Organização Mundial de Gastroenterologia como padrão ouro para o tratamento da infecção por *H. pylori*, é o IV Consenso de Maastricht /Florence elaborado em 2010. Algumas das diferenças entre este e o Consenso Brasileiro é que o primeiro não oferece a opção do uso de furazolidona uma vez que esta droga não está disponível nos Estados Unidos e União Europeia (12), recomendando como opção terapêutica de segunda linha a rifabutina (50), droga não disponível no Brasil.

Assim, a descoberta de *H. pylori* nos anos 80 e a disponibilidade de terapia efetiva revolucionou a história natural da doença ulcerosa péptica, acarretando um declínio na doença recorrente e suas complicações como a hemorragia, perfuração ou obstrução gástrica (31). A erradicação da bactéria reduziu a taxa de recorrência anual de 80% e 60% para as úlceras duodenais e gástricas, respectivamente, para menos de 5% (51). Ainda, a erradicação da infecção por *H. pylori* proporciona benefícios cumulativos a longo prazo com a redução de sintomas dispépticos graves que requeiram consultas médicas por até sete anos. A redução dos custos devido à erradicação da bactéria numa comunidade, acrescidos de outros benefícios teóricos devem fazer com que estes

programas recebam atenção especial, principalmente em regiões com alta prevalência da infecção por *H. pylori* (52).

Atualmente no Brasil, o Consenso Brasileiro de *Helicobacter pylori* em sua última revisão (ano de 2012) recomenda o tratamento para erradicação em todos os pacientes dispépticos, sendo esta, a primeira alternativa terapêutica nestes casos. As vantagens adicionais nesta circunstância incluem a redução da transmissão da infecção e também de suas principais sequelas, a úlcera péptica e o câncer gástrico (48).

Considerando-se o diagnóstico da infecção por *H. pylori*, vários são os métodos atualmente disponíveis, cada um com suas vantagens, desvantagens e limitações. Um modo clássico de classificar estes métodos é através da necessidade ou não da realização de endoscopia. Os testes que se baseiam na coleta de biópsias incluem histologia, cultura, reação em cadeia da polimerase (PCR) e o teste da urease. Todos realizados a partir de tecidos obtidos durante a endoscopia. Alternativamente, o teste respiratório com ureia marcada com carbono 14, a sorologia e a pesquisa de antígeno fecal classificam-se como procedimentos não invasivos (9).

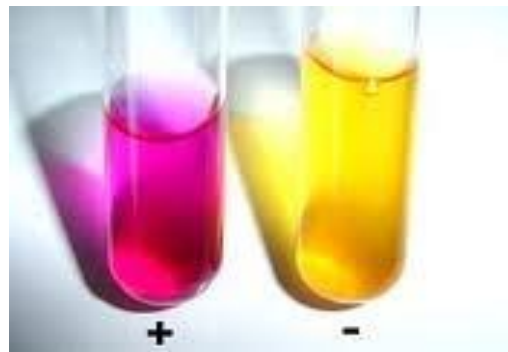
A histologia é um dos métodos mais comumente usados, ao menos em países onde a endoscopia é frequentemente realizada (43). Permite uma avaliação crítica da mucosa além da pesquisa da bactéria. Várias colorações podem ser usadas, no entanto, a coloração pelo método de Giemsa é a preferida na prática clínica por ser tecnicamente simples, muito sensível e barata (53).

A cultura não é considerada um método de diagnóstico de rotina e não está disponível em muitas instituições médicas no mundo. Uma amostra de biópsia gástrica recente é o ideal para o cultivo de *H. pylori*, pois, desse modo a contaminação pela flora comensal é menor (9). O cultivo é o método mais específico para se detectar *H. pylori*, embora os resultados dependam da qualidade da amostra e do uso do meio de transporte (54).

A reação de PCR permite que pesquisadores e clínicos identifiquem *H. pylori* em amostras onde haja um pequeno número de bactérias. É um método que não requer armazenamento ou transporte especial da amostra e pode ser realizado a partir de material obtido tanto por métodos invasivos (biópsias) quanto não invasivos (suco gástrico, saliva ou fezes). Além disso PCR pode ser realizada rapidamente como método

diagnóstico para identificar genótipos bacterianos diversos ou em estudos epidemiológicos (9).

O teste da urease baseia-se na capacidade de *H. pylori* produzir grandes quantidades de urease. As biópsias obtidas durante a endoscopia são colocadas em um meio contendo ureia e um indicador de pH. Se a urease está presente a ureia é quebrada em dióxido de carbono (CO_2) e amônia (NH_3) que aumenta o pH do meio e causa uma subsequente mudança de cor no indicador (figura 7). O resultado pode ser obtido em um intervalo de minutos até 24h. O teste da urease é barato, rápido, amplamente disponível e altamente específico (9).



<http://1.bp.blogspot.com/-HuywaLMf248/Tcc1uD1ttol/AAAAAAAAAFM/-ge7byr4y6Y/s1600/teste+da+urease.bmp> (visto em 05/1/2015)

Figura 7- Testes da urease, evidenciando dois possíveis resultados: positivo em rosa e negativo em amarelo

A maioria dos testes sorológicos baseia-se na detecção de IgG. A lenta queda nos níveis de anticorpos após erradicação (25% dos títulos em seis meses ou mais) é uma causa de resultados falso-positivos. Por esta razão, testes sorológicos são preferíveis para detecção da infecção ativa (43).

Teste respiratório com ureia marcada baseia-se na capacidade de *H. pylori*, (quando presente na mucosa gástrica), de quebrar a molécula de ureia marcada com ^{13}C ou ^{14}C em CO_2 e amônia, após sua absorção oral. O $^{13}\text{CO}_2$ ou $^{14}\text{CO}_2$ se difunde para a corrente sanguínea é eliminado através dos pulmões e medido no ar expirado. O teste respiratório é de fácil realização e não requer endoscopia (9).

O teste do antígeno fecal tem acurácia diagnóstica equivalente a do teste respiratório quando anticorpos monoclonais são usados (38).

1.4 *Helicobacter pylori*

De acordo com o site *List of Prokariotic Names with Standing in Nomenclature* até o momento foram reportadas 35 espécies de *Helicobacter* (55). Estas espécies estão inseridas na classe Proteobacteria, subdivisão delta e épsilon, subclasse Epsilonproteobacteria, ordem Campylobacteriales e família Helicobacteriaceae (56). Diferentes espécies infectam diferentes hospedeiros e órgãos diversos. De todas as espécies no entanto, a mais estudada sem dúvida é *H. pylori*.

H. pylori é uma bactéria gram-negativa, microaerófila, que se apresenta espiralada e com extremidades arredondadas na microscopia, porém quando cultivados em meio sólido ou líquido adquirem a forma de bastão (57). Após o cultivo prolongado as formas cocóides se tornam predominantes. Estas, são formas metabolicamente ativas, porém não podem ser cultivadas (58).

Diversos são os meios de cultivo para *H. pylori*, cujos componentes incluem agar, suplementos de crescimento e de seleção. Vários meios à base de agar podem ser usados como BHI (*brain heart infusion*), Columbia agar e agar Wilkins Chalgren. O suplemento de crescimento pode ser sangue ou soro de ovelha ou cavalo à 5%, 7% ou preferencialmente à 10% (43), no entanto sangue humano também pode ser adicionado (59). As hemácias podem ser lisadas para que as substâncias de crescimento estejam mais rapidamente disponíveis. Suplementos seletivos contendo antimicrobianos a exemplo: vancomicina, teicoplanin, polimixina, ácido nalidíxico, colistina, trimetropim, cefsulodina, nistatina, anfotericina são usados para minimizar o crescimento de contaminantes (43). Algumas substâncias como ureia, indicador de pH (vermelho fenol) e ainda 2,3,5, cloreto de trifeniltetrazolium também podem ser adicionados ao meio para facilitar a visualização e identificação das colônias (43).

H. pylori possui de quatro a seis flagelos unipolares que são essenciais para a motilidade (Figura 8). A morfologia curva e a motilidade polar causada pelos flagelos em uma das extremidades, promove movimentos em “parafuso” capacitando o organismo a penetrar na camada de muco (60; 61). Testes para identificação fenotípica da bactéria que utilizam reações enzimáticas são usados como método diagnóstico, uma vez que a mesma apresenta positividade para as reações de catalase e oxidase, além de possuir alta atividade de urease (57). O microorganismo prolifera bem em condições de

microaerofilia, ou seja, com concentrações de O_2 que variam de 2 a 8% e à temperatura ótima de 37° C (57), compatível com sua adaptação no organismo humano.

O gênero *Helicobacter* é composto de espécies que compartilham propriedades comuns, especialmente aquelas relacionadas com a vida no estômago, onde podem localizar-se no fundo e no corpo, mas é principalmente no antro onde as bactérias são encontradas em maior densidade (62). Ainda no estômago, localizam-se no interior ou sob a camada de muco que recobre o epitélio da superfície ou das fovéolas, em íntimo contato com a membrana luminal das células epiteliais que revestem a mucosa gástrica (63).

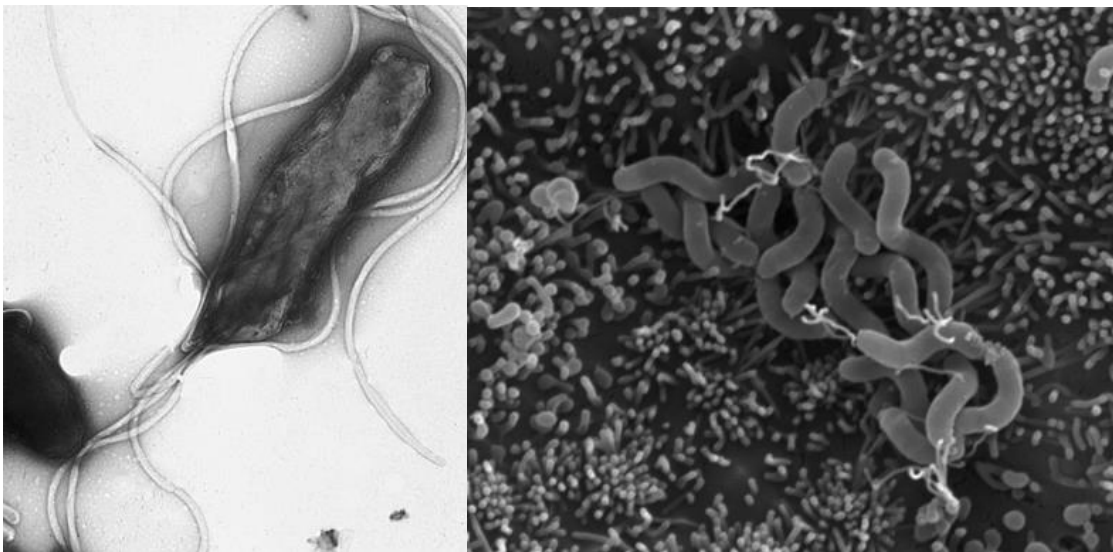


Figura 8- Imagem de *H. pylori* isolado (A) e associado ao epitélio gastrointestinal (B) visualizado por microscopia eletrônica de transmissão e varredura, respectivamente. As imagens foram retiradas do artigo de Dave Levitan (2014) (<http://www.consultantlive.com/gastrointestinal-disorders/eradicating-h-pylori-could-help-prevent-gastric-cancer-asians>) e Rina Shaikh-Lesko 2014 (<https://scopeblog.stanford.edu/2014/09/25/treating-an-infection-to-prevent-a-cancer-h-pylori-and-stomach-cancer/>), respectivamente.

1.5. Aspectos genéticos: virulência e patogenicidade

Do ponto de vista genético *H. pylori* é uma espécie bacteriana extremamente diversa (64; 65). Aproximadamente 50% dos isolados de *H. pylori* contêm plasmídios de variados

tamanhos (66), que também contribuem para a diversidade genética observada, no entanto a função destes plasmídios em grande parte é desconhecida (64).

A localização variável de vários genes no mapa genômico sugere seu extensivo rearranjo (67). Este microrganismo apresenta ainda grande diversidade de sequência em múltiplos genes incluindo os que produzem VacA (citotoxina vacuolizante) (68) e CagA (citotoxina associada ao gene A) (65). *H. pylori* é naturalmente competente na recaptação do DNA o qual através da recombinação propicia um mecanismo para a diversidade observada (6).

É fato que, os avanços na biologia molecular, incluindo a aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR), permitiram a detecção e tipagem do organismo diretamente de espécimes clínicos. Em relação a *H. pylori*, um dos alvos da reação de PCR para sua detecção é o gene *ureC*. Este gene codifica uma fosfoglucosamina mutase mas, por não estar relacionado à produção de urease foi posteriormente renomeado *glmM*. Considerado um gene constitucional, o gene *glmM* participa diretamente da síntese da parede celular (69) sendo extensivamente utilizado para confirmar a presença de *H. pylori* (70).

A evolução clínica da infecção por *H. pylori* é um evento complexo determinado pela interação entre os fatores relacionados à genética do hospedeiro, ao ambiente e à virulência da linhagem infectante. Apesar de metade da população mundial estar infectada, somente cerca de 15% apresentará algum dos desfechos relacionados, como gastrite, úlcera duodenal, úlcera gástrica, adenocarcinoma gástrico ou linfoma MALT (71). Fatores genéticos do hospedeiro desempenham um papel importante (65). Por exemplo, polimorfismos nos genes que controlam a resposta inflamatória podem tanto acentuar como atenuar esta resposta e, portanto, a incidência de um desfecho adverso associado à infecção (72; 73). A duração e a idade de aquisição da infecção também são fatores importantes, assim como a desnutrição na infância (ou infecções) que levam a uma redução da secreção ácida e aumento na suscetibilidade para o desenvolvimento de gastrite atrófica e câncer gástrico (65).

Fatores ambientais também têm importante participação no desenvolvimento de doenças relacionadas a *H. pylori* principalmente o câncer gástrico. Alguns destes fatores são conhecidos como “protetores” para esta doença, como a refrigeração dos alimentos

e o alto consumo de vegetais e frutas frescas; opostamente correlacionados com o câncer gástrico, estão o elevado consumo de sal e nitratos (74; 65).

Os fatores relacionados ao hospedeiro permanecem pouco conhecidos, enquanto que a identificação daqueles relacionados à bactéria avançam continuamente (63). Os fatores de virulência são características presentes em algumas bactérias que as capacitam mais do que outras a causar doenças (30). Dentre os principais fatores relativos a *H. pylori* estão a mobilidade dada pelos flagelos, a capacidade de aderência, a produção de urease e os genes *vacA* e *cagA*.

1.5.1. Motilidade de *H. pylori* e sua adesão ao epitélio gastroduodenal

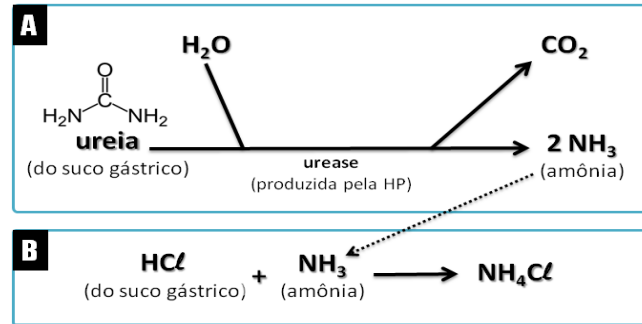
A bactéria, na fase precoce de colonização, necessita atravessar a camada de muco, que protege o epitélio gástrico. Tal camada é formada por um gel viscoelástico composto principalmente de mucinas, que confere proteção química e mecânica ao revestimento epitelial, inclusive contra bactérias. No entanto, lipases e proteases sintetizadas por *H. pylori* degradam este muco, facilitando a progressão da bactéria. Além disso, *H. pylori* move-se facilmente devido a sua morfologia em espiral e os flagelos, o que permite atravessar esta camada onde condições de pH mais neutro permitem o crescimento (75). Outra característica importante dos flagelos deste microrganismo, é que eles também estão ligados à quimiotaxia. Assim, a bactéria pode ser atraída por substâncias específicas, como a ureia, alguns carboidratos (principalmente frutose e glicose) e alguns aminoácidos (como fenilalanina) produzidos pelo epitélio gástrico. A motilidade direcionada pela quimiotaxia é crucial para o crescimento de *H. pylori* na mucosa do hospedeiro (76).

É amplamente aceito que *H. pylori* adere a receptores no epitélio gástrico através de adesinas específicas (6; 61), dentre elas OipA (*outer inflammatory protein*), SabA (*sialic acid binding adhesin*) e a mais estudada, BabA (*blood group antigen bind adhesin*). Estudos dos alelos de *babA*, evidenciam uma distribuição geográfica, que reflete a adaptação de linhagens às diferentes populações humanas (77).

1.5.2. Urease

A resistência ao ácido clorídrico é de vital importância na patogênese de *H. pylori*, visto que, sem este atributo biológico, a bactéria não teria condições de colonizar a mucosa gástrica. A enzima urease, que é uma proteína de alto peso molecular (500 a 600 kDa), atua promovendo a hidrólise da ureia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando à produção de amônia. Esta atua como receptor de íons H⁺, gerando pH neutro no interior da bactéria, o que confere a *H. pylori* resistência à acidez gástrica (78). Desta maneira, a bactéria fica protegida dos efeitos deletérios do pH ácido do estômago. A urease compreende uma importante fração- 6%- do conteúdo proteico da bactéria, o que representa grande investimento energético motivado pela sua ação essencial como fator de colonização (63).

A maior parte da urease sintetizada pela bactéria situa-se em seu citoplasma. A produção de amônia depende da entrada de ureia na bactéria, que é controlada por uma proteína de membrana sensível ao pH. A urease é codificada por um “cluster” de genes conhecidos como *ureA*, *ureB*, *ureE*, *ureF*, *ureG* e *ureH*. A ativação da urease citoplasmática pela queda do pH é mediada pela expressão de um outro gene do “cluster” de genes da urease, conhecido como *ureI*. O produto deste gene, a proteína Urel, aumenta a permeabilidade da membrana à ureia em até 300 vezes de acordo com a redução do pH ao redor da bactéria (79). Cepas de *H. pylori* com deleção de *ureI* não sobrevivem em pH ácido. A entrada de ureia é altamente específica, não sendo facilmente saturada, e independente de temperatura e energia (80). Portanto, *H. pylori* possui um mecanismo que permite a liberação do substrato ureia sobre a urease em condições em que é necessária a alcalinização local do meio ambiente (Figura 9). A proteína Urel atua como portão de um canal, que também permite o refluxo de urease, aumentando o pH periplasmático e do microambiente próximo, prevenindo acúmulo tóxico de ureia dentro da bactéria (80).



<http://scienceblogs.com.br/meiodecultura/files/2050/01/urease.pn>

Figura 9- Princípio da reação de quebra de uma molécula de ureia pela urease bacteriana e conseqüente alcalinização do pH local (scienceblogs.com.br- visto em 05/01/2015)

1.5.3. Gene *cagA*

O primeiro gene cepa-específico identificado em *H. pylori* foi o *cagA* (gene associado à proteína A). As linhagens *cagA*⁺ estão associadas a inflamação mais intensa e à expressão de citocinas pró-inflamatórias no estômago humano *in vivo* quando comparadas com as linhagens *cagA*⁻ (81). Estudos demonstraram que pacientes infectados por linhagens que expressam *cagA* têm probabilidade três vezes maior de desenvolver câncer gástrico do que aqueles infectados por linhagens *cagA*⁻ (82). O gene *cagA* é considerado marcador da ilha de patogenicidade *cag* (*cag*-PAI), um elemento insercional de 40 kb, que contém cerca de 31 genes e é encontrado em aproximadamente 60% a 90% das cepas mundiais. A ilha *cag*-PAI é um componente do genoma de *H. pylori* que contém genes homólogos ao de outras bactérias que codificam componentes de um sistema de transporte de proteínas efetoras para as células do hospedeiro, (a exemplo a proteína CagA) permitindo que estas modulem vias do metabolismo celular desta última, incluindo a expressão de proto-oncogenes (83; 11).

A proteína CagA de *H. pylori* atua como antígeno altamente imunogênico. A estrutura do gene revela uma região 5' altamente conservada, mas com uma região 3' com número variável de sequências repetitivas, o que leva a variação do comprimento da proteína. Como a proteína CagA é fortemente imunogênica, qualquer variação em seu

comprimento pode levar a diferentes respostas do hospedeiro, incluindo diferentes graus de resposta inflamatória (63).

1.5.4. Gene *vacA*

O gene *vacA* (gene codificador da citotoxina vacuolizante VacA) é o segundo fator de virulência de *H. pylori* mais extensivamente estudado. Está presente em todas as cepas de *H. pylori* e compreende duas partes variáveis: *s* e *m*. A região *s* (codifica o sinal peptídico) está localizada na extremidade 5' e possui dois alelos, *s1* ou *s2*, sendo que para o alelo *s1* existem três subtipos: *s1a*, *s1b*, *s1c*; a região média *m* possui os alelos *m1* ou *m2* (84). A combinação em mosaico dos alelos da região *s* com os alelos da região *m* determina a produção de citotoxina, responsável pelo grau de virulência da bactéria. As cepas portadoras do genótipo *vacA s1m1* produzem grande quantidade de toxina, enquanto as cepas *s1m2* produzem quantidade moderada, e as cepas *s2m2*, pouca ou nenhuma toxina. As cepas *vacA* do tipo *s1a* parecem ser mais patogênicas que as *s1b* e *s1c* ou *s2*, sendo mais relacionadas à úlcera péptica. As cepas do tipo *m1* estão associadas a maior risco de danos às células epiteliais do que as do tipo *m2* (85). Além disso, é interessante notar que quase todas as linhagens *cagA+* são classificadas como *s1*, enquanto quase todas as *cagA-* são classificadas como *s2m2* (65).

A toxina produzida por este gene, é considerada importante fator de virulência na patogênese da ulceração péptica e do câncer gástrico. Esta toxina pode induzir múltiplas atividades celulares incluindo vacuolização das células, formação de canais de membrana e apoptose (84; 65).

1.5.5. Gene *cagE*

O predomínio de neutrófilos na mucosa gástrica, observado em pacientes infectados por cepas *cag-PAI+*, é ligado ao aumento de secreção de interleucina-8 (IL-8) secretada pelas células epiteliais. Entretanto, cepas *cagA-* também induzem aumento da secreção de IL-8 (86). Isto se deve ao fato de que a proteína CagA não atua diretamente sobre IL-8. O gene ligado ao aumento da produção de IL-8 é o *cagE* (gene associado à citotoxina E), que é um dos genes da ilha *cag* (87).

1.5.6. Gene *babA*

Embora três alelos deste gene tenham sido descobertos, *babB*, *babA1* e *babA2*, somente o produto deste último, uma adesina denominada BabA (*blood group antigen binding adhesion*) é necessária para a atividade de ligação ao antígeno b de Lewis (expresso nas células epiteliais gástricas humanas) (88). Ele pode ser um importante produto de patogenicidade ao permitir o contato entre a bactéria e o epitélio e ainda, facilitar a liberação de fatores de virulência como as proteínas CagA e VacA (63). Alguns estudos mostram que *babA2*, *cagA* e *vacA* s1m1 quando expresso na mesma linhagem, agem sinergicamente aumentando a inflamação, podendo ser risco em potencial para a metaplasia intestinal (89; 11).

1.5.7. Gene *dupA*

A função deste gene (*duodenal ulcer promoting gene A*) não está completamente entendida, tendo sido associado ao aumento na produção de IL-8 na mucosa antral *in vivo*, assim como de células epiteliais gástricas *in vitro* (11). Descrito pela primeira vez em 2005 por Lu e colaboradores, foi relatado que a infecção por linhagens *dupA+* em diferentes populações estariam fortemente associadas a úlceras duodenais e negativamente associadas ao câncer gástrico (90). Opostamente, outros estudos relacionam o *dupA* ao câncer gástrico, mostrando que sua função não está ainda completamente entendida (11).

Embora haja muito conhecimento a respeito dos fatores de virulência de *H. pylori*, há diversas questões ainda sem respostas, especialmente aquelas referentes à especificidade de cada um dos fatores de virulência e o desfecho clínico relacionado (11).

1.6 Resposta Imune

H. pylori pode colonizar seu hospedeiro humano por toda a vida sendo, portanto, bem adaptado à vida no estômago. Como toda linhagem deflagra ao menos alguma inflamação no hospedeiro, o organismo deve encontrar um equilíbrio de modo a não provocar uma resposta imune vigorosa o suficiente para ser eliminado (5). Embora os fatores determinantes para desfechos clínicos não sejam completamente conhecidos, o

desenvolvimento de uma atividade inflamatória e resposta imune sustentada parecem ser essenciais para o desenvolvimento da doença (91).

Faremos aqui uma breve descrição das etapas que levam à resposta inflamatória do hospedeiro (figura 10) iniciando com a ingestão de *H. pylori* que tem que evadir-se da atividade bactericida da luz gástrica, atravessar a camada de muco e estabelecer contato com o epitélio, o que é feito através da enzima urease e dos flagelos. Uma vez sobre o epitélio gástrico, a bactéria se adere fortemente por intermédio de adesinas, como a proteína BabA, e desencadeia a resposta imune inata e adaptativa (91).

O contato da bactéria com monócitos e outras células apresentadoras de antígenos leva à secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-8 que exercem quimiotaxia sobre neutrófilos (92). Vários estudos demonstram ainda que o contato entre *H. pylori* e as células epiteliais gástricas resulta em rápida ativação do NF- κ B e do fator de transcrição ativador de proteína 1 (AP-1) que é seguido pelo máximo aumento de IL-8 (93). A ruptura celular junto às “tight junctions” (junções apertadas) aumenta a apresentação de antígenos na lâmina própria resultando também no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-8 (92).

H.pylori causa uma inflamação gástrica contínua em praticamente todos os indivíduos levando à resposta imune adaptativa que consiste inicialmente de neutrófilos, seguida de linfócitos T e B, células plasmáticas e macrófagos com variados graus de degeneração celular e injúria (94). A produção de inúmeras substâncias antigênicas incluindo, urease e LPS (lipopolissacarídeos) que são processados por macrófagos na lâmina própria ativam as células T (95).

Esta resposta do hospedeiro é predominantemente Th-1, e por sua vez se associa a maiores níveis de INF- γ e promove a resposta celular. Estes achados levantam a hipótese de que uma resposta Th-1 aberrante do hospedeiro contra um organismo que deveria induzir uma resposta secretora (Th-2) deve influenciar e perpetuar a inflamação gástrica (79). O aumento de células T na lâmina própria caracteriza a gastrite crônica (91).

Para sobreviver no ambiente gástrico hostil e escapar da resposta imune, *H. pylori* ativa uma série de mecanismos para modificar o microambiente a seu favor e reduzir a atividade fagocítica e apresentadora de antígenos (96). A exemplo podemos citar a resistência ao menos parcial ao ataque de fagócitos, talvez devido ao dano nas

membranas dos fagossomos causado pela amônia produzida pela bactéria (97). A expressão dos antígenos de Lewis na superfície de *H. pylori* pode ajudar na sua camuflagem. Outro mecanismo em potencial para a evasão do sistema imune pode ser a modificação de sua morfologia. Seu significado na infecção é desconhecido, podendo representar uma forma ambiental latente de resistência ou fase dormente que pode ser induzida a reverter à forma bacilar virulenta *in vivo* (6). Formas cocoides já foram demonstradas na mucosa gástrica humana (98).

A colonização por *H. pylori* induz uma resposta humoral sistêmica vigorosa, assim como uma resposta local. No entanto, a produção destes anticorpos não leva à erradicação, sugerindo que o muco gástrico funcione como barreira protetora contra o acesso destes anticorpos (79). Ainda, a ineficaz resposta humoral contra *H. pylori* e seus componentes pode na verdade contribuir para a patogênese, pois alguns anticorpos monoclonais contra esta bactéria apresentam reação cruzada com o epitélio gástrico (99).

Sabemos que LPSs são clássicos ativadores da inflamação, no entanto, quando se comparou a estrutura dos LPSs de *H. pylori* com a de enterobactérias, observou-se que aqueles são 1000 vezes menos ativos e fracamente ativam macrófagos (100). A dificuldade de entender a resposta imune protetora e porque a resposta natural parece ser ineficaz, se deve ao incompleto conhecimento da patogênese da bactéria e também da contribuição dos fatores do hospedeiro (61) .

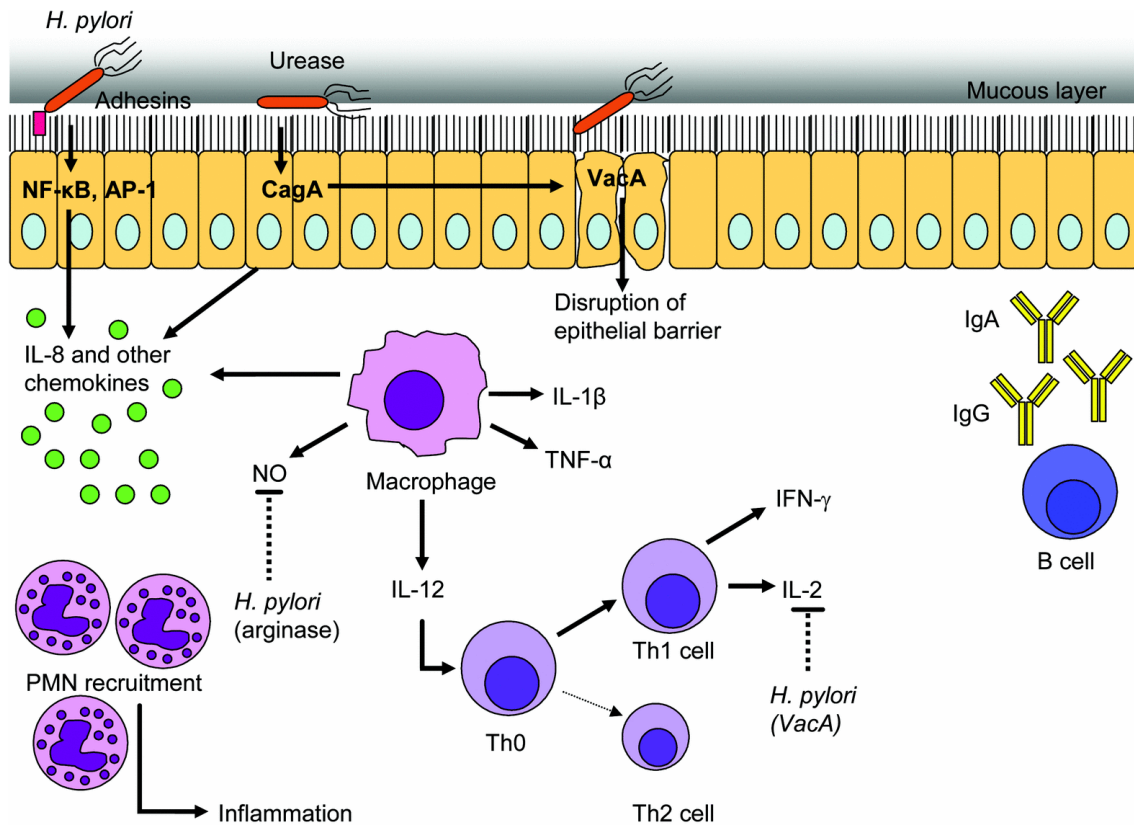


Figura 10-Patogênese de *H. pylori* e resposta inflamatória. *H. pylori* coloniza o epitélio gástrico através da urease. A adesão de *H. pylori* às células epiteliais e a injeção da CagA resulta em produção de IL-8 e outras quimiocinas e ativação da resposta inata e adaptativa. Para evadir-se da resposta imune a bactéria desenvolveu mecanismos para redução de seu reconhecimento pelos sensores imunes, de redução da ativação de células imunes e escapar de efetores imunes. **PMN**=células polimorfonucleares **IL**=interleucina **Th**=células T "helper" **INF γ** =interferon gama **NO**=óxido nítrico. Esquema retirado de Portal-Celhay e Perez-Perez (Clin Sci 2006, 110; 305-14)

A persistência da colonização depende da capacidade de responder às mudanças do microambiente e de contornar os mecanismos de defesa do hospedeiro que se iniciaram durante a infecção. Um importante fator para persistência da infecção é o rearranjo genômico do DNA que permite a expressão de antígenos de superfície e evasão da resposta imune.

2. JUSTIFICATIVA

A infecção por *H. pylori* é uma das mais prevalentes no mundo. Há uma grande variabilidade nas taxas de infecção entre os diversos países, podendo estar presente em 80% ou mais nas populações de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, a exemplo o Brasil.

Dada a sua importância na etiologia de doenças gastroduodenais, como a gastrite, a úlcera gástrica, a úlcera duodenal, o câncer gástrico, o linfoma MALT e ainda, a grande variabilidade genética característica deste microrganismo, é de fundamental importância que estudos regionais sejam desenvolvidos.

Embora o Rio de Janeiro seja a segunda maior cidade do Brasil e a trigésima-quinta mais populosa do planeta raros estudos abordam a caracterização de linhagens e os aspectos relacionados à patogenicidade e consequente desfecho clínico, podendo contribuir para futura otimização da abordagem terapêutica. Esta dissertação se alinha com esta proposta e busca associar o gene *cagA* com a intensidade do infiltrado inflamatório no tecido gástrico.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar casos humanos com lesões gastroduodenais associados a infecção por *H. pylori*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Diagnosticar lesões gastroduodenais nos pacientes incluídos no estudo.

3.2.2 Detectar a infecção por *H. pylori* a partir de biópsias gástricas dos pacientes.

3.2.3 Caracterizar geneticamente *H. pylori* através da identificação do gene de virulência *cagA*.

3.2.4 Relacionar o status *cagA* de *H. pylori* com o processo inflamatório do epitélio gástrico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos da pesquisa

Este estudo foi aprovado pela direção do Hospital Escola São Francisco de Assis (H.E.S.F.A), cenário de prática deste trabalho (Anexo 1). Após inscrição na Plataforma Brasil, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz estando registrado com o número do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 12423113.8.0000.5248.

4.2 População estudada e critério de exclusão

A população do estudo foi constituída por 72 indivíduos com idade variando entre 19 e 77 anos, provenientes da demanda espontânea do Serviço de Endoscopia Digestiva do Hospital Escola São Francisco de Assis (HESFA) - unidade pertencente ao Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e, portanto, integrante do Sistema Único de Saúde (SUS). A participação destes indivíduos se deu no período de 18/06/2013 à 08/04/2014.

Indivíduos com queixas digestivas e encaminhados para a realização de exame endoscópico foram convidados a participar e receberam orientações sobre o exame e os objetivos do projeto de pesquisa. Após leitura e informações sobre o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” foi obtida a assinatura que formalizou a autorização destes pacientes como voluntários neste estudo.

Pacientes sem tratamento prévio para erradicação de *H. pylori* e que apresentaram achados endoscópicos de gastrite, úlcera duodenal, úlcera gástrica, linfoma MALT e/ou câncer gástrico foram incluídos. Em contrapartida, os critérios de exclusão consistiram de: pacientes que fizeram uso de IBP (inibidores de bomba de prótons), bloqueadores H₂ ou anti-inflamatórios nos últimos 15 dias, de antibióticos nas últimas 8 semanas, pacientes em programa de anticoagulação ou com distúrbios da coagulação sanguínea e gestantes.

Considerando o sintoma/motivo predominante relatado por cada paciente que justificava o exame, podemos listar: epigastralgia (56,9% dos casos), pirose e sintomas

relacionados à DRGE (23,6%), plenitude pós-prandial (5,5%), dor abdominal (1,3%), controle de úlcera gástrica (2,7%), gases estomacais (1,3%), queimação epigástrica (8,3%).

4.3 Coleta e processamento de material biológico

Antes do exame de endoscopia, foi preenchido protocolo com dados de identificação, história clínica, medicamentos em uso e comorbidades (Anexo 2). A endoscopia digestiva foi realizada sob sedação consciente, utilizando-se 4 ou 5 borrifadas de xilocaína spray à 10% na faringe posterior, além de meperidina 100mg/mL em doses que variavam de 20 a 50 mg intravenosa e midazolam 5mg/mL em doses de 3 a 7mg intravenoso. Sob visão direta, o aparelho foi introduzido pela cavidade oral, examinando-se todo o trato digestório até a segunda porção duodenal. As biópsias gástricas foram coletadas ao final do exame, usando pinça reutilizável, sem espícula, cardíaca e saturação de oxigênio foram continuamente monitorados e, ao término do mesmo, o paciente foi encaminhado à sala anexa onde permanecia o tempo necessário para se recuperar da sedação

Todos os exames foram realizados com videoendoscópio GIF160 (Olympus, Japan). Após cada procedimento todo equipamento era submetido à limpeza, enxague e à desinfecção com Cidex® OPA (Johnson & Johnson, UK) durante 30 minutos conforme recomendação da ANVISA. Nos exames incluídos neste estudo foram coletados tecido gástrico do antro e corpo, que foram processadas de acordo com os ensaios experimentais. Para cultivo bacteriano *in vitro*, um fragmento do antro foi transferido para microtubo de 1,5 mL contendo 1,0 mL de solução salina a 0,85% e agitado em vórtex por 10 segundos. Após lavagens sucessivas (3x), o fragmento foi transferido para outro microtubo (2,0 mL) contendo 500 µL de caldo Tioglicolato e conservado a 4°C por um período de até 6 horas para posterior cultivo em placa.

Outro fragmento do antro foi transferido para tubo estéril, seco e preservado a -20 °C até seu processamento para extração do DNA bacteriano. As amostras de antro e corpo destinadas às análises histopatológicas foram fixadas e processadas como descrito a seguir.

4.4 Análise histopatológica

Após coleta e fixação em 20 mL de formol a 10%, dois fragmentos de tecido (3 a 5 mm), sendo um do antro e um do corpo gástrico, foram desidratados em série crescente de álcool etílico (70%-99,7%, 1h cada), clarificados com xilol (3X durante 1h) seguido de infiltração e inclusão em parafina. Esta etapa foi realizada em autotécnico (Lupe, Brasil). Os espécimes emblocados em parafina foram seccionados em micrótomo (Leica, Alemanha), e cortes de 4 µm foram coletados e dispostos para flutuação em superfície de água aquecida, permitindo sua aderência às lâminas. Em seguida, o material foi colocado em estufa à 60°C para desparafinização por 30 min. Posteriormente corado pelo método de Giemsa durante 10 minutos e por Hematoxilina e Eosina num total de 5 minutos, sendo lavado e montado, entre lâmina e lamínula, com meio de montagem Bálsamo do Canadá. As preparações foram então, examinadas ao microscópio de luz (Nikon e200, Japan) por médicos patologistas experientes da UFRJ.

Com o objetivo de uniformizar os laudos histológicos para as gastrites, foi aplicada a classificação internacionalmente conhecida como Sistema Sydney. Este sistema utiliza uma escala visual análoga que representa a intensidade de 5 variáveis histológicas analisadas: a densidade de *H. pylori* na amostra estudada, a atividade neutrofílica polimorfonuclear, a inflamação crônica, a atrofia glandular e a presença de metaplasia intestinal. Todas estas variáveis são classificadas quanto à sua intensidade em leve, moderada e intensa (acentuada). Em relação à inflamação crônica, o infiltrado inflamatório inicial é composto por neutrófilos, sendo logo seguido pela migração de células mononucleares como mastócitos, eosinófilos, monócitos, linfócitos B, mas, principalmente linfócitos T. De modo geral, aceita-se como esperado um número de 2 à 5 linfócitos intra-epiteliais por campo de grande aumento sendo valores acima destes, diagnosticados como gastrite crônica (101).

4.5 Cultivo em placa e extração térmica do DNA

Os fragmentos de tecido destinados ao isolamento de *H. pylori* em cultivo *in vitro* foram transportados para o Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz e, em cabine de segurança biológica, foram macerados com a parte posterior de uma alça de Drigalski dentro do

próprio frasco de transporte, com mínima quantidade do Tioglicolato. A seguir, as amostras foram semeadas em placa de Petri com auxílio de uma alça flambada, por técnica de esgotamento, em meio de cultura seletivo constituído de agar Brucella com albuMAX II[®] a 1% (Gibco-BRL[®], EUA) e suplemento seletivo de Skirrow[®] (Oxoid,UK) composto de vancomicina 10 mg/l, trimetropim 5mg/l e polimixina B 2.500 UI/L.

As placas foram incubadas em jarra hermeticamente fechada contendo uma placa adicional aberta, com um comprimido de Sonrisal[®] (GSK, UK) e um pedaço de cerca de 2 cm de lã de aço em 20 mL de água. O período de incubação foi de até 10 dias em estufa bacteriológica a 37 °C.

As colônias foram identificadas morfológicamente como puntiformes, translúcidas e sem pigmentação. Identificação fenotípica foi realizada através do teste da urease ao inocular com agulha bacteriológica flambada algumas colônias em microtubo de 0,2 mL contendo 0,1 mL de ureia e indicador de pH. Após sua identificação, parte das colônias visualizadas foram preservadas em criotubos (2,0 mL) com TSB (*Tryptona Soya Broth*) e glicerol a 20% e ainda, em microtubos com leite desnatado a 10%, sendo mantidas a -70°C. O restante (aproximadamente 1/3 das colônias visualizadas) foi colocado em microtubo (2,0 mL) com cerca de 500 µL de água destilada, agitadas em vórtex por alguns segundos e levadas à fervura em banho-maria durante 15 minutos, sendo o DNA total obtido pelo método de choque térmico após imediato resfriamento a -20°C. Este material foi posteriormente descongelado à temperatura ambiente e centrifugado a 13000 rpm (Brinkmann Eppendorf Centrifuge 5415C, Alemanha), por 1 minuto para utilização nas reações em cadeia da polimerase (em inglês *Polymerase Chain Reaction* - PCR).

4.6 Extração do DNA bacteriano a partir de amostras de tecido gástrico

Para as amostras negativas para *H. pylori* no cultivo *in vitro*, a extração do DNA bacteriano a partir do tecido gástrico (preservado a -70°C) foi realizada com o kit QIAamp DNA Mini Kit[®] (QIAGEN, Holanda) de acordo com as instruções do fabricante (3ª edição-2012).

4.7 Reações de PCR

Os genes *glmM*, *cagA* e *vacA* foram alvos das reações de PCR de amostras positivas no cultivo bacteriano *in vitro*, enquanto para amostras onde não se obteve o cultivo da bactéria, o alvo foi o gene *glmM*, por ser um gene constitutivo. As reações de PCR foram realizadas no termociclador TX 96 (AmpliTherm, EUA) e consistiram da incubação de 5µL de DNA total em 10µL de tampão 1x, 6 µL de MgCl₂ 3mM, 0,3µL de Taq DNA polimerase 1,5 UI (todos da marca Promega[®], EUA), 1µL de dNTP 0,2 mM (ultrapure dNTP set – GE Healthcare[®], UK), 2µL do *primer* (iniciador) específico (100-200ng) dos genes alvo (Tabela 1), completando a reação para um volume final de 50µL com água Mili-Q. Em seguida, as amostras foram submetidas a diferentes condições de termociclagem (Tabela 1).

Para cada reação foi adicionado um padrão de peso molecular de 668 pb para os genes *cagA* e *vacA* e 294 pb para o gene *glmM*, um controle negativo composto pelo *mix* de reagentes sem DNA e um controle positivo que consistiu de amostra inicial do estudo cujo sequenciamento e comparação com banco de dados GenBank confirmou a presença dos genes de *H. pylori* em questão. Em caso de amplificação negativa para os genes alvos *cagA* proveniente do cultivo e do gene *glmM* proveniente da amostra de tecido gástrico, a reação de PCR era repetida mais uma vez.

Tabela 1- Sequência dos primers, tamanho dos produtos de PCR em pares de base (pb) e condições de termociclagem para os genes *glmM*, *cagA* e *vacA*

Primers	Sequência do primer (5' – 3')	Tamanho do produto de PCR	Condições da reação de PCR
<i>glmM</i> F	AGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT	294 pb	94°C – 3' hold 94°C – 30" } 55°C – 30" } 40x 72°C – 30" }
<i>glmM</i> R	AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC	294 pb	72°C – 10' hold 4° C - infinito
<i>cagA</i> F	AATACACCAACGCCTCCAAG	493 pb	95°C – 5' hold 95°C – 30" } 55°C – 30" } 40x 72°C – 1' }
<i>cagA</i> R	TTGTTGGCGCTT GCTCTC	493 pb	72°C – 10' hold 4°C - infinito
<i>vacA</i> F	ACAACCGTGATCATTCCAGC	600 pb	95°C – 5' hold 95°C – 30" } 55°C – 30" } 40x 72°C – 1' }
<i>vacA</i> R	ATACGCTCCCACGTATTGC	600 pb	72°C – 10' hold 4°C - infinito

4.8 Análise dos produtos amplificados

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% para o gene *glmM* e à 1,5% para os genes *cagA* e *vacA* em cuba contendo TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA). Foram utilizados 10 µL de cada amplicon. O tempo e voltagem iniciais para o gene *glmM* foram de: 15 min – 80 volts seguido de 30 min- 60 volts. Após impregnação em brometo de etídio por 30 segundos, o gel foi submetido novamente à 60 volts por mais 10 minutos. Para os genes *cagA* e *vacA* foi utilizado tempo e voltagem de 15 min-60 volts seguido de 30 min-40 volts. Após impregnação com brometo de etídio aplicou-se novamente a voltagem de 40 volts por mais 10 minutos. Os produtos amplificados foram analisados em transiluminador UV (Kodak Gel Logic 112 Imaging System- Carestream Health, EUA).

4.9 Purificação e Sequenciamento dos produtos de PCR

Para se obter as sequências dos genes *glmM*, *vacA* e *cagA* de cada amostra, os produtos amplificados nas reações de PCR foram purificados com o kit PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK) seguindo as instruções do fabricante. Novas reações de PCR foram realizadas com 5µL dos amplicons purificados acrescidos de 5µL de solução tampão (corante azul de Bromofenol e TAE 50X). A concentração de DNA purificado foi estimada pela visualização das bandas em gel de agarose. A reação de sequenciamento foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pelo kit Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v 3.1 (Applied Biosystems, EUA), utilizando somente os *primers* “R”. As sequências foram obtidas no sequenciador automático 3730xl DNA Analyser (Applied Biosystems, EUA). Esta técnica encontra-se padronizada e vem sendo rotineiramente utilizada no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do IOC.

4.10 Análise dos dados gerados pelo sequenciamento

Os resultados foram analisados através do programa CHROMAS versão 2.01 e comparadas com as sequências depositadas na base de dados do NCBI, (GenBank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) para que através da identidade com as linhagens depositadas, efetivamente se confirmasse *H. pylori*.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

No presente estudo coletamos biópsias gástricas através de exame endoscópico para isolamento de *H. pylori* e confirmação de sua presença utilizando o método da urease e análise histopatológica e amplificação dos genes *glmM* e *vacA*. As amostras foram coletadas de 72 pacientes consistindo de 51 mulheres (70,8%) e 21 homens (29,2%) com idades entre 19 e 77 anos. O principal achado endoscópico foi de gastrite (86,1%), seguido de úlcera péptica em diferentes estágios (11,1%), câncer gástrico e duodenite erosiva (1,3% cada) (Figura 11).

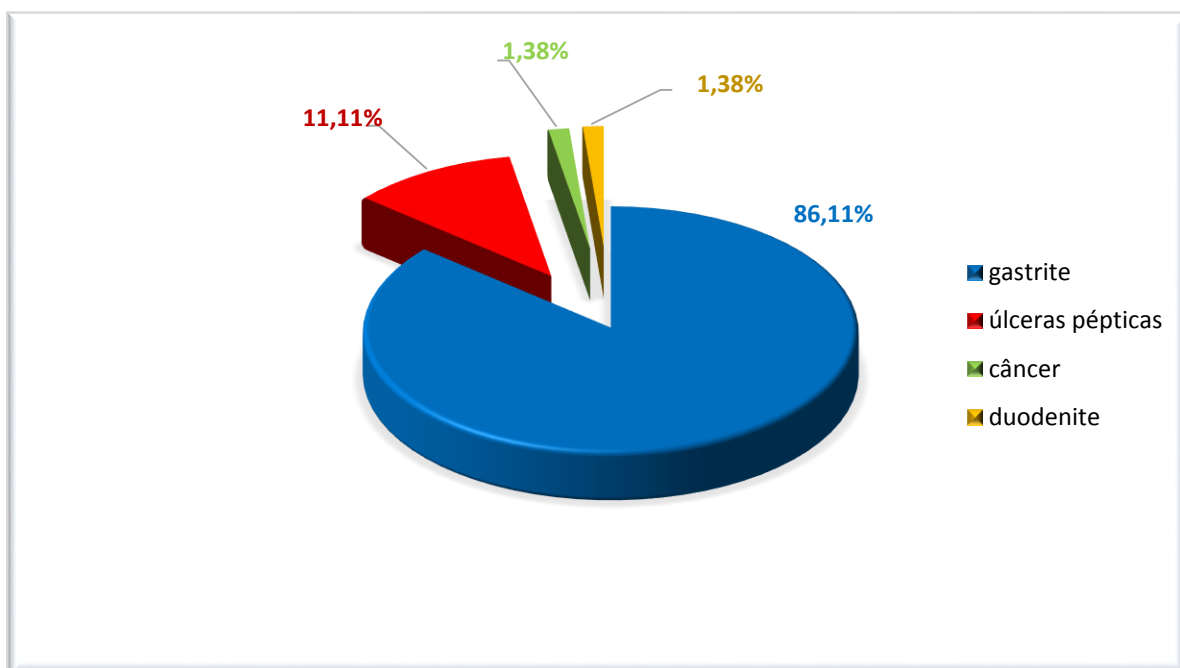


Figura 11 – Perfil de lesões gástricas evidenciadas à endoscopia digestiva alta (%). Note a maior incidência de gastrite quando comparada às demais lesões gástricas diagnosticadas.

Das 72 amostras, 71 foram submetidas ao cultivo em meio seletivo com albuMAX II® a 1%, um suplemento altamente purificado à base de albumina bovina e rico em lipídeos, adicionado ao meio como substituto do tradicional uso de sangue. Após um

período de incubação que variou de 2 a 10 dias, obtivemos o crescimento de colônias bacterianas em 64% (46/71) das amostras, com um período mínimo de tempo para crescimento e visualização adequada das colônias de 3 a 5 dias em 76% (35/46) das amostras positivas cultivadas.

Usualmente o reconhecimento das colônias de *H. pylori* é realizado através de sua visualização. Em nosso estudo, realizamos tanto a caracterização fenotípica quanto genotípica. No primeiro caso, as diminutas colônias translúcidas, não pigmentadas, características de *H. pylori* (Figura12), foram submetidas ao teste de urease. Este teste colorimétrico, que detecta a presença de urease produzida por *H. pylori* através da quebra de ureia em amônia e CO₂ acarretando mudança de coloração do meio amarelo para rosa, demonstrou a presença da bactéria em todas as amostras positivas (64%) em meio albuMAX II®, revelando-se, portanto, um método de isolamento de *H. pylori* bastante eficiente.



Figura 12 - Cultivo de material biológico proveniente de biópsia gástrica em meio sólido com albuMAX II®. A manutenção das culturas em microaerofilia revelou diminutas colônias translúcidas características de *H. pylori*.

Além da análise fenotípica, identificamos a bactéria nas amostras positivas em cultivo (46/71) por PCR, através da amplificação dos genes *glmM* e *vacA*. Obtivemos a

amplificação do gene *glmM* em 91% (42/46) dos isolados, e do gene *vacA*, em 82% (38/46).

Dando continuidade à identificação genotípica dos isolados obtidos em cultura, os fragmentos amplificados resultantes das PCRs foram purificados e sequenciados utilizando somente os *primers* R do gene *glmM*, comparando-se com as sequências depositadas no banco de dados GenBank, a fim de obter por identidade a confirmação com as linhagens de *H. pylori*. Nas amostras de cultivo negativas para o gene *glmM* o sequenciamento foi realizado para a identificação do gene *vacA*. Em ambos os casos foi confirmada identidade de todas as nossas amostras sequenciadas com as linhagens de *H. pylori* depositadas no banco de dados.

Nas 26 amostras negativas em meio Brucella com albuMAX II[®], avaliamos a presença de *H. pylori* pela detecção do gene *glmM* através da PCR. *H. pylori* foi identificado em 15% (4/26) das amostras de tecido do antro que se revelaram negativas em cultura. Neste conjunto de amostras (4), somente 1 biópsia se revelou positiva apenas por este método. De um total de 72 amostras, 13 (18%) não evidenciaram a bactéria por nenhum método.

Além de utilizarmos PCR como ferramenta para identificação, estas reações também foram usadas para caracterizar as linhagens cultivadas (46 amostras) através da identificação do gene *cagA*. Os resultados das amplificações e sequenciamento de fita única “R” deste gene de virulência revelaram a presença do *cagA* em 65% (30/46) dos isolados de cultura.

A figura 14 evidencia os valores absolutos e percentuais da positividade no teste da urease e da amplificação dos genes *glmM*, *vacA*, *cagA* para os isolados obtidos.

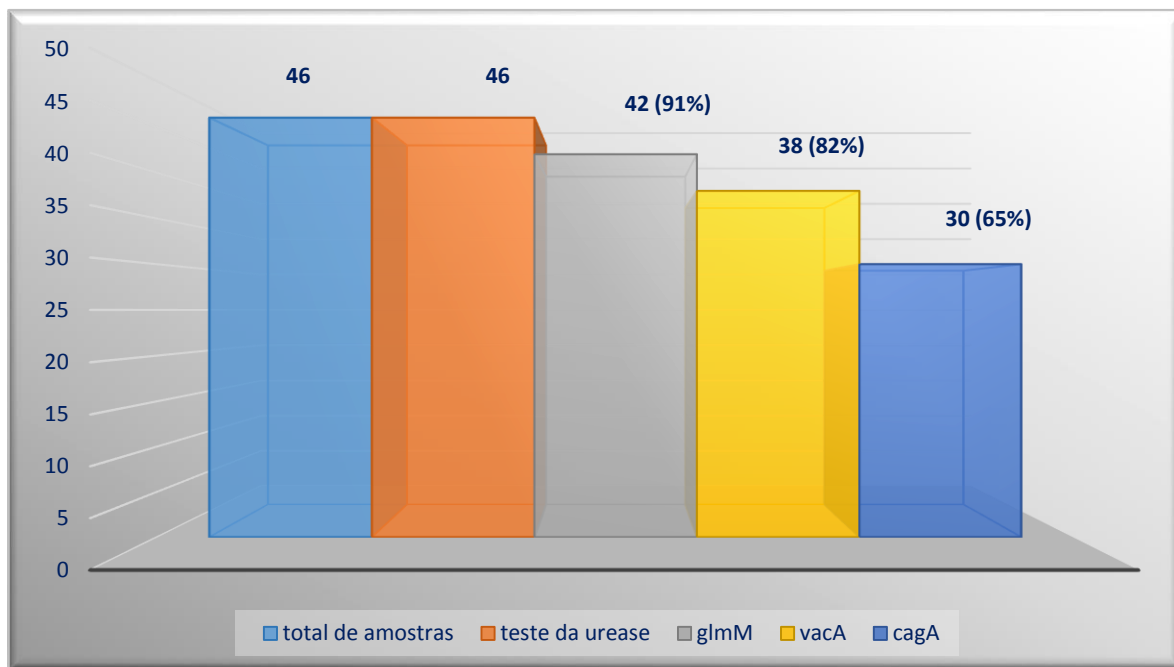


Figura 13 - Teste da urease e amplificação dos genes *glmM*, *vacA* e *cagA* a partir dos isolados obtidos. Os resultados estão expressos em valores absolutos e percentuais

Considerando o *cagA* um gene de virulência de *H. pylori* e sua relação com a patogenicidade, avaliamos a correlação dos achados endoscópicos com a presença deste gene em bactérias isoladas em cultivo (46). Nossos resultados revelaram a presença de linhagem *cagA*+ em 60% dos casos de gastrite (24/40), 100% dos casos de úlcera (5/5) e no único caso de câncer gástrico da população estudada (figura 14).

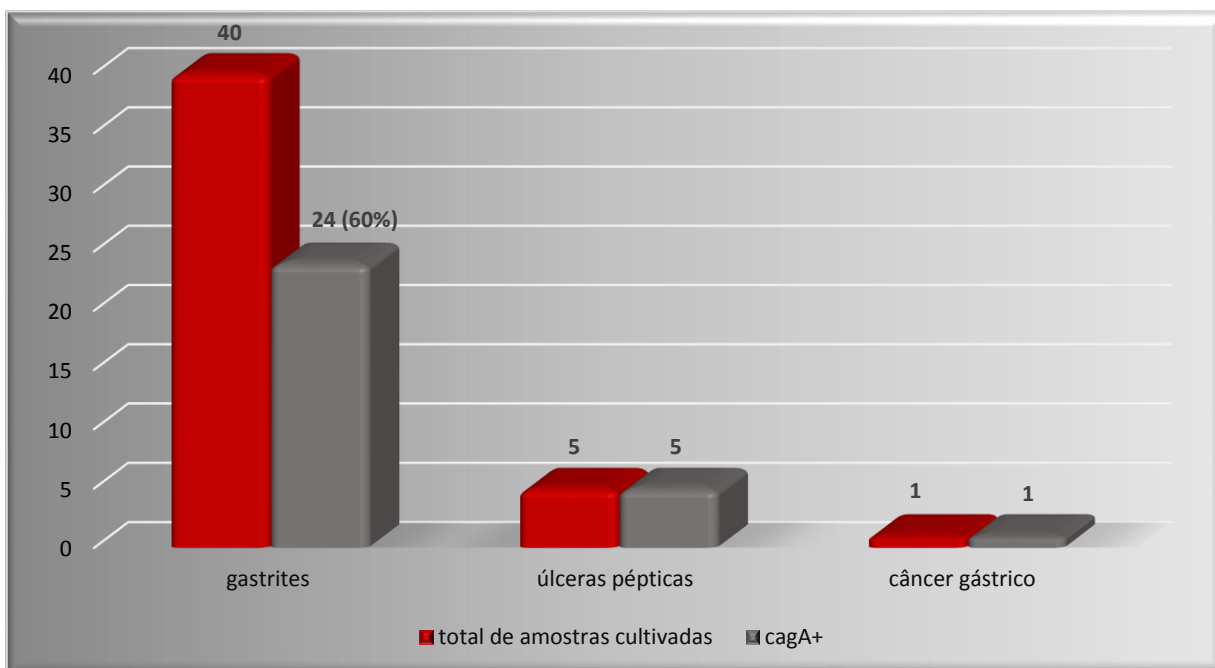


Figura 14 – Achados endoscópicos e status *cagA+* nas linhagens cultivadas

Ainda, as biópsias gástricas processadas rotineiramente para análise histopatológica foram coradas pelo método de Giemsa e hematoxilina e eosina, permitindo assim a confirmação do diagnóstico de gastrite, úlceras e câncer dentre outras lesões, além da pesquisa de atividade inflamatória, alterações precursoras do câncer gástrico, da presença de *H. pylori* e sua densidade nos fragmentos de biópsia coletados.

A presença de *H. pylori*, evidenciada pela coloração de Giemsa, foi demonstrada em 77% (56/72) dos pacientes. A figura 16 exemplifica a presença de *H. pylori* em amostra de tecido gástrico corado pelo método de Giemsa.

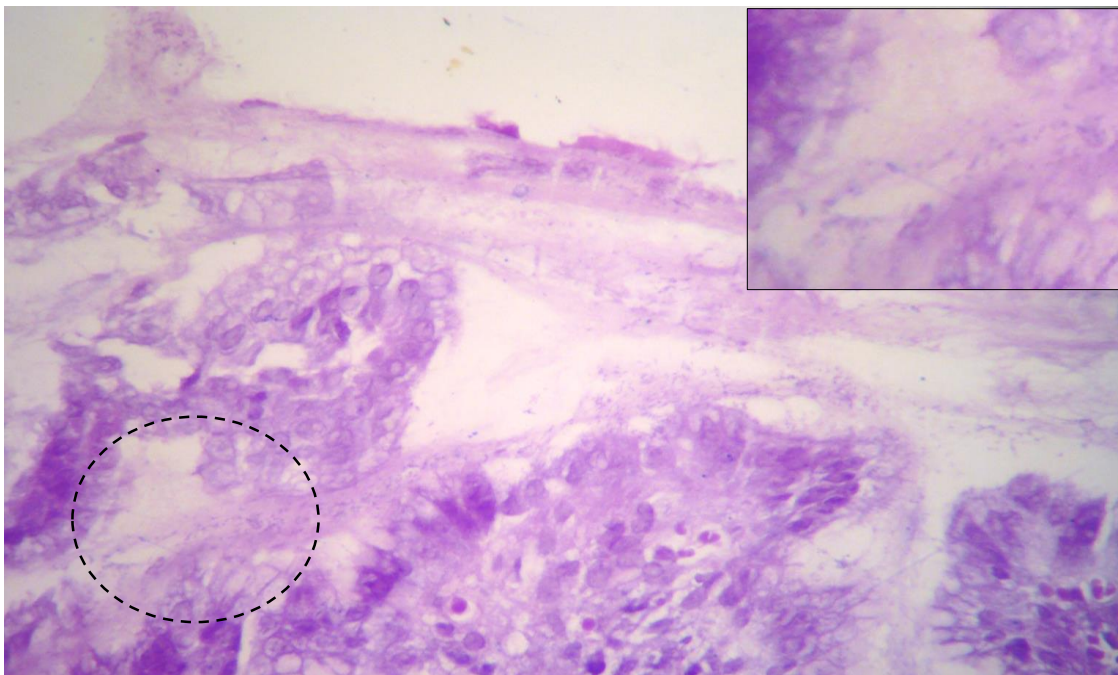


Figura 15- Imagem representativa de 56 amostras positivas para H. pylori ao histopatológico. A coloração pelo método de Giemsa permitiu evidenciar microrganismos espiralados (círculo) na região do antro. Aumento 400x. Inseto com imagem da bactéria e sua associação com o epitélio gástrico.

Na tabela abaixo uma visão detalhada dos métodos utilizados para detecção e caracterização de *H. pylori* com seus respectivos resultados.

Tabela 2- Resultados obtidos com os métodos de detecção e caracterização de *H. pylori* nas 72 amostras do estudo. NA=não se aplica; +=positivo; -=negativo

Nº amostras	Cultivo	Histopatológico	glmM tecido	glmM cultivo	cagA cultivo	vacA cultivo
21	+	+	NA	+	+	+
11	+	+	NA	+	-	+
5	+	+	NA	+	+	-
3	+	+	NA	-	+	+
1	+	+	NA	-	-	+
3	+	+	NA	+	-	-
1	+	-	NA	+	+	-
1	+	-	NA	+	-	+
9	-	+	-	NA	NA	NA
2	-	+	+	NA	NA	NA
1	-	-	+	NA	NA	NA
13	-	-	-	NA	NA	NA
1	NR	+	+	NA	NA	NA
Total 72	46/72 (64%)	56/72 (77%)	4/26 (15%)	42/46 (91%)	30/46 (65%)	38/46 (82%)

Em nosso estudo, nos casos de gastrite em que *H. pylori* foi isolado, correlacionamos a intensidade do infiltrado inflamatório das regiões do antro e corpo gástrico, com o perfil de virulência das linhagens, ou seja, com a presença do gene *cagA*. As análises histopatológicas das amostras *cagA+* (total de 24 amostras) demonstraram

um predomínio de inflamação moderada e acentuada na região do antro e corpo. Para as linhagens *cagA*⁻ (total de 13 amostras) o perfil do infiltrado inflamatório variou entre as intensidades leve a acentuada no antro e majoritariamente leve no corpo. Destacamos a ausência de infiltrado inflamatório de intensidade leve nas amostras positivas para o gene *cagA*. Uma diferença relevante foi evidenciada na região do corpo gástrico, onde o infiltrado inflamatório leve estava presente no maior número de amostras *cagA*⁻, embora exibisse em outro extremo, valor semelhante às linhagens *cagA*⁺ para amostras com acentuado grau de inflamação no corpo (Figura 17). Vale ressaltar que três amostras *cagA*⁻ não foram incluídas nas análises por falta de representação de uma das regiões (antro ou corpo).

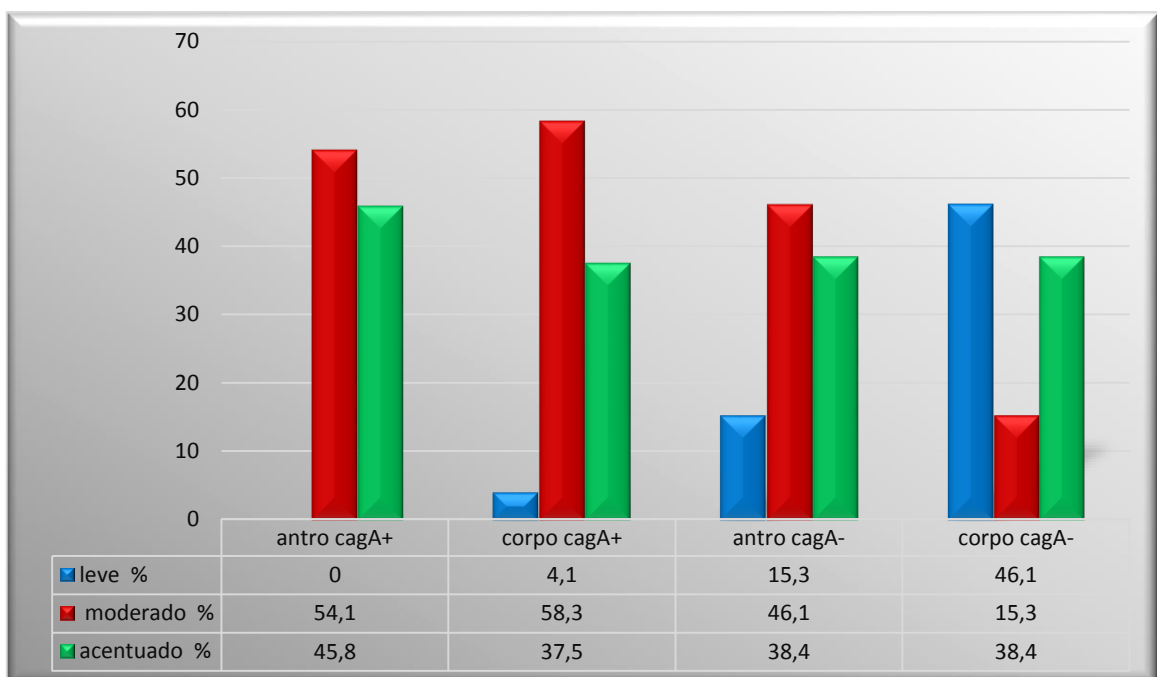


Figura 16 - Os dados mostram o valor percentual de amostras *cagA*⁺ e *cagA*⁻ e sua associação com a intensidade da inflamação tecidual nas regiões do antro e corpo gástrico

A figura 18 revela a presença de infiltrados inflamatórios na mucosa gástrica do antro. Intenso infiltrado inflamatório, frequentemente observado nos casos de linhagens *cagA*⁺ e casos de gastrite crônica com evidência de infiltrado inflamatório acentuado e difuso e ainda a presença de hemorragia no tecido gástrico.

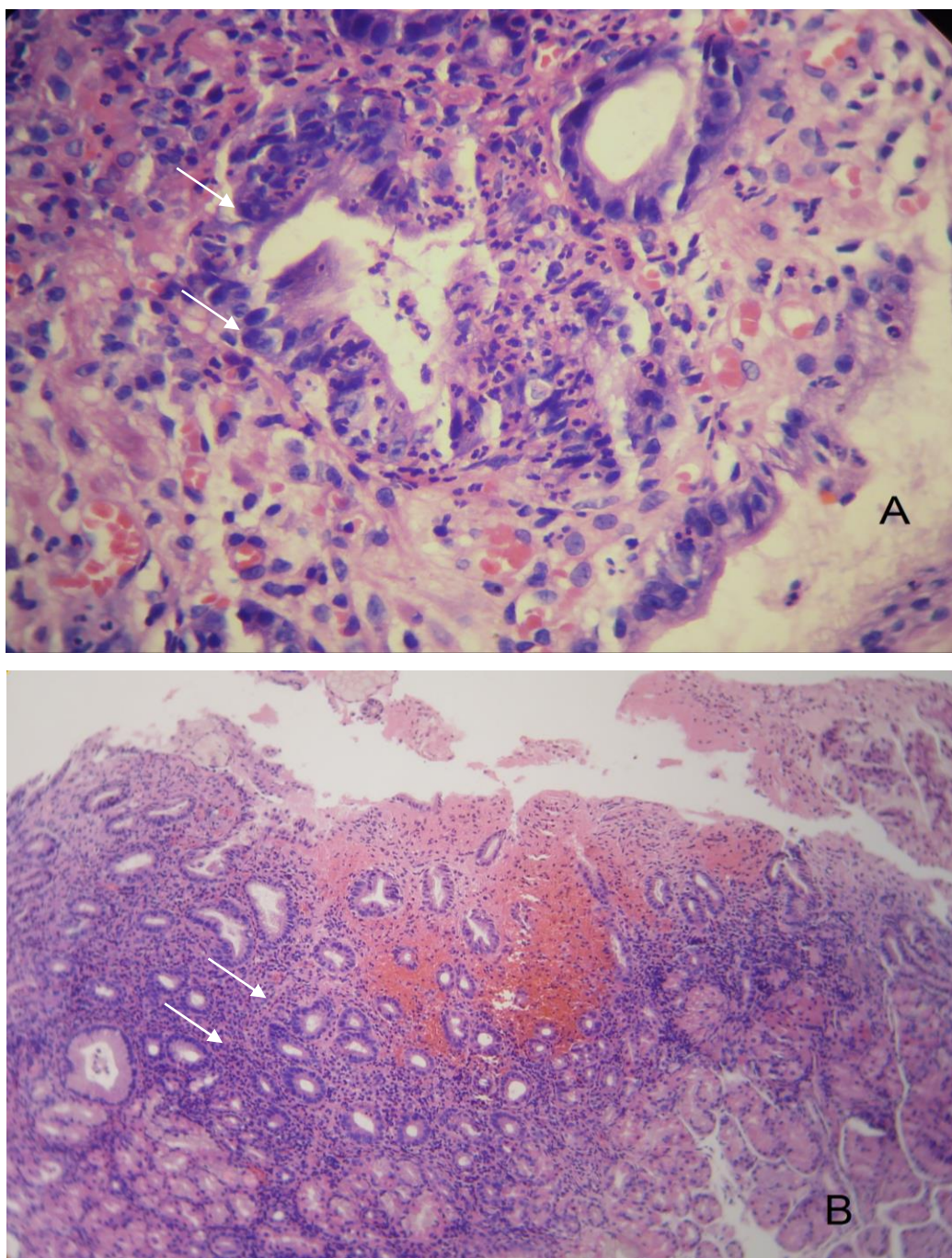


Figura 17 - As figuras acima evidenciam infiltrados inflamatórios em lâminas coradas pela H&E. A- intensa infiltração de neutrófilos no antro gástrico (setas brancas). Aumento 100x. B- Inflamação crônica com intenso infiltrado linfocitário (setas brancas) e hemorragia. Aumento 40x.

Por fim, avaliamos a prevalência da infecção por *H. pylori* de acordo com a faixa etária dos pacientes. Nossos resultados revelaram a presença de *H. pylori* em 81,9% da população adulta, com pico na faixa etária de 30-39 anos (27,11%). Em faixas etárias

superiores, há redução global na prevalência da infecção, com decréscimo acentuado no grupo da terceira idade (≥ 60 anos). Alcançando uma prevalência de apenas 10,16% (figura 18).

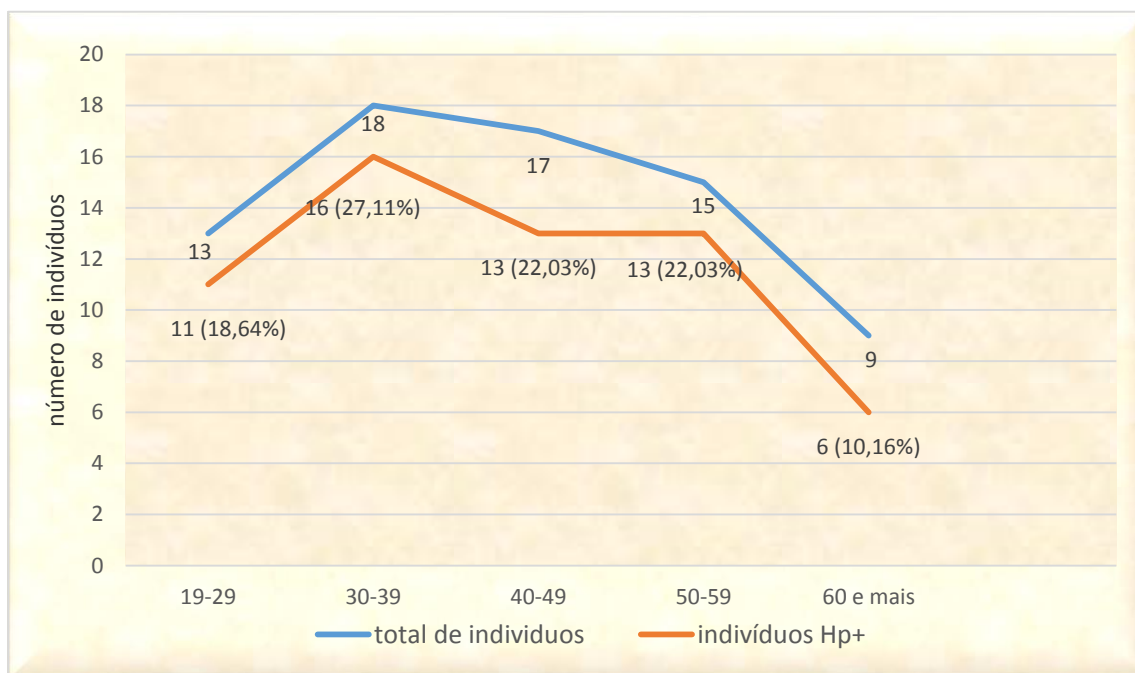


Figura 18 - O gráfico mostra a curva de prevalência para as diferentes faixas etárias em relação ao total de participantes em cada faixa etária. Observar o pico de prevalência na faixa dos 30-39 anos e seu decréscimo a partir dos 60 anos.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Desde seu isolamento e caracterização como agente patogênico e causador de lesões gastroduodenais em 1982, *H. pylori* tem sido objeto de intensas pesquisas no mundo todo. Pouco mais de trinta anos depois, sabe-se que *H. pylori* coloniza aproximadamente 50% da população mundial e que, no entanto, somente cerca de 15-20% destes indivíduos irão apresentar um dos desfechos clínicos relacionados à infecção: úlceras pépticas, adenocarcinoma gástrico e linfoma MALT. Estas duas últimas patologias levaram *H. pylori* a ser classificado pela Organização Mundial de Saúde como carcinógeno tipo I. Para o restante dos infectados algum grau de resposta inflamatória ocorre, mas nem sempre associada a sintomas detectáveis.

Está bem estabelecido que fatores relacionados ao ambiente, ao hospedeiro e à própria bactéria são fundamentais para se entender o resultado desta infecção. Até o presente momento, fatores inerentes do hospedeiro ainda têm muito a ser desvendado, enquanto os fatores relacionados à bactéria estão em constante descoberta, a exemplo, a presença ou ausência de linhagens portadoras de genes de virulência como o *cagA*, sua prevalência nas diferentes populações e o resultado da infecção por estas linhagens. A intensa variabilidade genética de *H. pylori*, resulta em diferentes desfechos não só a nível de países, mas também dentro das diversas regiões de um mesmo país. Estes fatos nortearam a realização deste estudo, que na prática teve início com a coleta de biópsias gástricas a partir de exames endoscópicos.

Embora o cultivo seja um método caro e que consome tempo, é essencial quando se deseja otimizar tratamentos através de antibiograma. O isolamento primário de *H. pylori* é um processo difícil com taxas de sucesso variando entre 70-80%, não existindo um meio de cultivo “ideal” (102).

H. pylori é uma bactéria fastidiosa de difícil isolamento (43). Em nosso estudo usamos o albuMAX II[®], suplemento à base de albumina bovina altamente purificada e rica em lipídeos, como alternativa ao uso de sangue. Inicialmente usado para crescimento de *Plasmodium falciparum* como substituto do sangue, o albuMAX II[®] foi usado para crescimento em meio de cultura sólido ou líquido para várias linhagens de *H. pylori* com sucesso. As vantagens desse suplemento estão em fornecer nutrientes (lipídeos e colesterol) em concentrações constantes de um lote para outro, dispensar refrigeração e

evitar as dificuldades existentes em alguns locais para importação de produtos animais (soro fetal bovino) para uso em meio de cultura (103).

Das 71 amostras do antro coletadas para cultivo, 46 (64%) evidenciaram a bactéria. Na tentativa de maximizar os resultados usamos estratégias descritas na literatura como eficazes: agitação em vórtex com solução salina à 0,85%, uso de meio seletivo e realização das coletas para cultivo antes das coletas para o histopatológico (43). Todos os pacientes foram ainda selecionados de modo que nenhum fator externo pudesse alterar a colonização gástrica e, portanto, a representação da bactéria nos fragmentos. No entanto, a distribuição irregular de *H. pylori* na mucosa gástrica, assim como a presença de metaplasia intestinal no antro, a possível contaminação da pinça de biópsia, a perda da viabilidade durante o transporte são fatores que podem contribuir para falsos negativos (104). Ainda assim nossos resultados ficaram dentro do esperado e bem acima de outros a exemplo de estudo realizado no Chile, onde foram observadas colônias em apenas 41,3% das amostras cultivadas em meio ágar com 7% de sangue de carneiro e 1% de extrato de levedura (105) e no Paraná, onde se obteve colônias em 51,9% das amostras usando BHI (*brain heart infusion*) com sangue de carneiro desfibrinado à 10% (106).

Para confirmação genotípica das bactérias, usamos PCR para amplificação dos genes *glmM* e *vacA*. PCR foi desenvolvida nos anos 80 e desde então tem sido aplicada não só para a detecção de *H. pylori*, mas também para genes relacionados à patogenicidade e mutações associadas à quimiorresistência.

A escolha destes genes baseou-se no fato de ambos estarem presentes em todas as linhagens, além disso, foi demonstrada por Lu e colaboradores, maior especificidade do *glmM* na detecção de *H. pylori* quando comparado com 16sRNA e *ureA* dentre outros (107). Em nossos isolados obtivemos taxa de amplificação de 91% (42/46) para o gene *glmM* e de 82% (38/46) para o gene *vacA*. Por ser o *glmM* um gene constitutivo, seria esperado uma amplificação em todas amostras como bem demonstrado (70) no entanto, obtivemos taxa de amplificação de 91%. Como nosso objetivo era somente confirmar geneticamente a presença da bactéria em cada amostra, as reações com resultado negativo não foram repetidas, confirmando-se então a presença do *H. pylori* através do gene *vacA*. É fato conhecido que *H. pylori* exibe significativa diversidade em múltiplos genes incluindo aqueles que codificam proteínas estruturais, *cagA* e *vacA* (6). Esta

grande diversidade, com a presença de múltiplos alelos, pode ser fator limitante nas reações de PCR. Além disso, as concentrações dos reagentes, as condições de reação, (apesar de ajustadas) e a possibilidade da presença de inibidores dentre outros, são fatores limitantes das reações de PCR que não podem ser descartados embora todas as medidas protocolares tivessem sido tomadas para evitar tais interferências.

As reações de sequenciamento que se seguiram e a comparação das sequencias obtidas com as do banco GenBank confirmaram todos os isolados como *H. pylori*.

Para as amostras onde não se observou a presença da bactéria pelo cultivo, demos seguimento às reações de PCR fazendo a extração do DNA diretamente do tecido gástrico tendo como alvo o gene *glmM*. Das 26 amostras testadas, 4 (15%) amplificaram este gene, no entanto em somente uma, nenhum outro método realizado havia evidenciado a bactéria. Há relatos de que a densidade da bactéria nas amostras tem influência nos resultados das PRCs (108), além disso o alto grau de plasticidade genômica entre as linhagens de *H. pylori* também pode gerar resultados negativos (109; 110).

A aplicação da PCR para detecção de fatores de virulência e consequente classificação de linhagens nos permitiu a identificação do gene *cagA* em 30 das 46 amostras ou seja, um percentual de 65% dos isolados caracterizou-se como *cagA+*. Este valor está de acordo com dados da literatura que apontam para uma prevalência global de 60-70% de linhagens *cagA+* (111).

No entanto, outros estudos realizados no Brasil, evidenciaram valores bastante divergentes para as linhagens *cagA+* como 92% em Bragança Paulista -SP- (106), 78% em Belém -PA- (112), 70,5% em Recife -PE- (113) e em 81,7% em Belo Horizonte -MG- (114), exemplificando a grande diversidade regional desta bactéria. As linhagens *cagA+* são tidas como mais agressivas, estando associadas a maior intensidade inflamatória na mucosa e por conseguinte a desfechos como úlcera péptica e câncer gástrico (65).

O único caso de câncer gástrico de nossa amostragem era *cagA+*, bem como os 5 casos de úlceras pépticas em que conseguimos isolar a bactéria (em três amostras com este diagnóstico não obtivemos sucesso no isolamento). As demais amostras *cagA+* estavam relacionadas à gastrite, e para analisar a intensidade da inflamação e verificar sua associação com o *status cagA*, foram realizados exames histopatológicos.

A coleta de biópsias gástricas para realização de exame histopatológico é rotina em todo exame endoscópico. Além de verificar a presença de *H. pylori*, permite ainda determinar o grau de atividade inflamatória e as lesões consequentes da infecção crônica causada pela bactéria. Embora não exista uma coloração específica para detecção de *H. pylori*, existem várias colorações com este fim, sendo a hematoxilina e eosina (H&E) e o método de Giemsa os mais usados. A H&E é uma coloração muito boa para avaliar os tecidos, no entanto não é adequada para a verificação da presença de *H. pylori*, pelo fraco contraste entre a bactéria e o muco. A coloração pelo método de Giemsa é a mais popular devido a sua simplicidade e bom contraste (43). Em nosso estudo foram utilizadas as duas colorações sendo a presença da bactéria verificada em 77% (56/72) das amostras, valor bem acima por exemplo, do encontrado no interior do estado de São Paulo por Rasmussen e colaboradores, que identificaram a bactéria em apenas 30.6% dos casos utilizando a mesma coloração (115). Em nosso estudo detectamos *H. pylori* em um valor bem próximo ao valor total de amostras positivas para este microrganismo, que foi de 81,9%, quando considerados todos os métodos de detecção.

Os achados histopatológicos em sua descrição seguiram as recomendações do Sistema Sydney modificado. Este sistema propõem o uso de uma escala visual análoga para que a classificação dos achados seja replicável. A análise da inflamação crônica (dentre outros fatores), deve ser realizada em todos os casos de gastrite e deve ser graduada em leve, moderada e acentuada (101).

Em nosso estudo, nas amostras *cagA+* a intensidade da inflamação foi semelhante no antro e corpo, variando de moderada (54,1% e 58,3% respectivamente) à acentuada (45,8% e 37,5% respectivamente) enquanto nas amostras *cagA-* a intensidade da inflamação foi maior no antro (moderada 46,1% e acentuada 38,4%). Estes achados estão em conformidade com dados da literatura a exemplo de estudo realizado por Álvares e colaboradores (116). Além disso, inflamação leve no antro para as amostras *cagA+* teve um valor muito pouco expressivo (4,1%), confirmando uma significativa associação entre estas linhagens e a maior severidade da inflamação crônica (117).

A inflamação mais intensa no antro é o esperado, uma vez que, a gastrite por *H. pylori* costuma ser mais acentuada no antro do que no corpo gástrico (101), principal região de colonização da bactéria.

Dado interessante, no entanto, obtivemos na região do corpo colonizada por amostras *cagA*-. Nestas amostras, na região do corpo gástrico, os resultados foram semelhantes nos dois extremos da intensidade da inflamação, ou seja, inflamação acentuada em 38,4% e leve em 46,1%. O achado de inflamação mais intensa no corpo gástrico não reproduz os relatos de estudos anteriores como por exemplo, o de Álvares e colaboradores, sugerindo que outros fatores podem estar envolvidos neste desfecho.

Como bem estabelecido na literatura, um dado fator de virulência por si só não é o único determinante do resultado da inflamação. Polimorfismos genéticos do hospedeiro principalmente em relação aos genes relacionados à atividade inflamatória como os que produzem IL-10, TNF- α , IL-8 e até mesmo fatores ambientais interagem no sentido da seqüela da infecção (118). Estes padrões nem sempre são avaliáveis morfologicamente.

Sabe-se ainda que a inflamação gástrica quase sempre precede o desenvolvimento de úlcera péptica e é um componente crítico no início dos vários passos na progressão para o câncer gástrico (79). No entanto há relatos de casos de úlcera e câncer gástrico, embora pouco comuns, associados a linhagens onde a ilha *cag*-PAI estava ausente (118) e portanto, também o gene *cagA*. Este fenômeno apesar de não ser comum também poderia explicar parte dos achados de intenso infiltrado inflamatório no corpo gástrico associado à linhagens *cagA*-.

Um outro fator a ser mencionado, é que usamos somente biópsias do antro nas análises genótípicas e, portanto, a influência de erros amostrais não pode ser excluída, devido a possibilidade de não haver concordância absoluta entre o genótipo da linhagem estudada e os achados histológicos no corpo, uma vez que que alguns pacientes podem ser infectados por linhagens diferentes nestas duas regiões. Contudo, o antro é o principal local de colonização de *H. pylori*, e a chance de falsos negativos em amostras desta região é menor do que em biópsias do corpo (119).

Apesar de alguns genes como o *cagA* estarem relacionados à maior virulência desta bactéria, ainda não existem estudos conclusivos para boa parte dos genes de virulência relacionados à patogenicidade (84). Embora não tenhamos contemplado outros fatores de virulência, a presença e expressão de outros genes não pode ser descartada. Ainda de acordo com Álvares e colaboradores (116), a gastrite é um processo dinâmico e a utilização de protocolos diferentes implica muitas vezes em resultados diferentes gerando controvérsias.

Um outro fenômeno que não podemos deixar de mencionar, é que o resultado do histopatológico depende da experiência do patologista, da densidade da colonização na mucosa, e de técnicas de coloração específicas para *H. pylori*. O número de fragmentos coletados também influencia o resultado (9). Em nosso estudo dois fragmentos foram coletados, um do antro e outro do corpo para análise histológica. Apesar da sugestão de coleta de cinco fragmentos por protocolos internacionais, na prática isso raramente é realizado, pois a endoscopia é um exame invasivo e demorado (9), além disso, outros métodos para detecção da bactéria foram utilizados neste estudo a partir de biópsias gástricas. Embora tenhamos coletado dois fragmentos para análise histológica, somente em três amostras onde a bactéria não foi detectada, outros métodos a detectaram, duas pelo cultivo e uma por PCR a partir do DNA extraído do tecido, evidenciando assim um bom resultado com a metodologia empregada. A principal limitação, no entanto, foi a não realização dos histopatológicos por um mesmo patologista, sujeitando os resultados a variações de observação (115; 120).

A prevalência do gene *cagA* é bastante heterogênea em diferentes partes do mundo estando presente em cerca de 60-70% das linhagens.

Em vários países da Europa Ocidental e nos Estados Unidos este valor está entre 59-75%; na Itália e Portugal estas taxas estão acima de 80% (106). No Brasil um país de dimensões continentais, as variações regionais na prevalência do gene *cagA* são bem marcantes, tendo sido evidenciado valores como 92% no Paraná (106); 48,5% em Marília, interior de São Paulo (120) e 65% no interior do Rio Grande do Sul (121). Nosso estudo encontrou resultado igual ao de Ramis e colaboradores, (65%) embora este autor obtivesse o DNA diretamente a partir de biópsias gástricas e não do cultivo.

Para as várias patologias relacionadas a *H. pylori*, as gastrites evidenciaram associação com linhagens *cagA+* em 60% das amostras, valor semelhante ao relatado em estudo anterior que mostrou ainda uma associação entre linhagens *cagA+* e o câncer gástrico em 70,6% dos casos (116). Apesar de inúmeros relatos da presença de linhagens *cagA+* nos casos de úlceras pépticas, a exemplo de trabalho realizado em Recife onde foram evidenciadas linhagens *cagA+* em 90,5% dos casos de úlceras duodenais (113), outros estudos não demonstraram esta correlação (106). Em nossa casuística, úlceras pépticas e câncer gástrico representaram 10,8% e 2,17% do total de

lesões endoscópicas a partir do qual se obteve isolamento de *H. pylori*. Todos estes casos estavam associados com linhagens *cagA+*.

Estes dados podem refletir a intensa variabilidade nas linhagens de *H. pylori*, além dos relatados fatores inerentes ao hospedeiro, e ainda a presença de outros genes que podem contribuir decisivamente para um determinado desfecho.

Apesar de ser uma das mais comuns infecções bacterianas no mundo e de ter sua prevalência bem documentada em diversos países, no Brasil há somente alguns poucos relatos epidemiológicos (106), com grande variabilidade regional a exemplo de valores encontrados em Curitiba (51,9%) (106) e no interior de Mato Grosso (84,7%) (21). Valores elevados como o encontrado em nosso estudo (81,9%) são característicos de países em desenvolvimento, onde as questões socioeconômicas/sanitárias principalmente durante a infância, ainda representam um problema para boa parte da população.

Nos países em desenvolvimento a prevalência da infecção tem seu pico dos 20 aos 30 anos de idade, no entanto varia entre subpopulações dentro do mesmo país, principalmente em relação à idade (18), o que pode justificar o pico de prevalência um pouco mais tardio encontrado em nosso estudo.

Redução da prevalência no grupo acima de 60 anos, também foi observado em outros estudos, que relatam a redução no número de microrganismos como resultado da atrofia gástrica decorrente da longa duração da infecção, criando condições adversas para a colonização (20).

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- 1- O percentual de isolamento obtido em nosso estudo foi bastante satisfatório com a metodologia empregada, sendo todas as linhagens confirmadas fenotípica e genotipicamente, através do teste da urease e da amplificação e sequenciamento dos genes *glmM* e *vacA*.
- 2- A caracterização dos isolados com a verificação do gene *cagA* mostrou valores compatíveis com a média mundial, observando-se ainda acentuada atividade inflamatória no antro e corpo gástrico associados a linhagens *cagA+*.
- 3- A identificação de linhagens *cagA-* na região do corpo gástrico, associada à maior intensidade inflamatória, sugere a importância de fatores relacionados ao hospedeiro e a extensa variabilidade genética de *H. pylori*.
- 4- Comparando-se os métodos de detecção de *H. pylori* utilizados em todas as amostras deste estudo (histopatológico e cultivo), o histopatológico evidenciou a presença da bactéria em maior número de casos (77%), confirmando este, como método de escolha na prática diária, embora neste estudo tenha sido utilizado um único fragmento de biópsia para o isolamento desta bactéria.

8. PERSPECTIVAS

Realizar estudos relacionando as linhagens *cagA+* e *cagA-* com a resistência *in vitro*, aos antibióticos utilizados nos tratamentos de primeira e segunda linha no Brasil. As linhagens utilizadas serão as linhagens deste estudo e que foram preservadas à -70°C.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Kodaira MS, Escobar AMU, Grisi S.** Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter yolori* na infância e adolescência. 2002, Vol. 36(3), pp. 356-69.
2. **Araújo MB, Borini P, Guimarães RC.** Etiopathogenesis of peptic ulcer: back to the past? abr/jun de 2014, Vol. 51(2), pp. 155-161.
3. **DY, Graham.** History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 14 de Mai de 2014, Vol. 20(18), pp. 5191–5204.
4. **TO, Cheng.** Glimpses of the past from the recently unearthed ancient corpses in China. nov de 1984, Vol. 101(5), pp. 714-715.
5. **Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL.** Overview. [ed.] Mendz GL, Hazell SL Mobley HLT. *Helicobacter pylori: physiology and Genetics.* Washington (DC) : ASM Press, 2001, 3.
6. **Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ.** *Helicobacter pylori.* oct de 1997, Vol. 10(4), pp. 720-41.
7. **Warren JR, Marshall BJ.** Unidentified curve bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet i:.* jun de 1983, Vol. 321(8336), pp. 1273-1275.
8. **Marshall BJ, Warren JR.** Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet .* jun de 1984, Vol. 323(8390), pp. 1311-1315.
9. **Garza-Gonzalez E, Perez-Perez GI, Maldonado-Garza HJ, Bosques-Padilla FR.** A Review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment and methods to detect eradication. fev 14 de 2014, Vol. 20(6), pp. 1438-49.
10. **Ferreira AC, Isomoto H, Moriyama M, Fujioka T, Machado JC, Yamaoka Y.** *Helicobacter* and gastric malignancies. out de 2008, Vol. 13 suppl 1, pp. 28-34.
11. **Roesler BM, Rabelo-Gonçalves EMA, Zeitune José MR.** Virulence factors of *Helicobacter pylori*: A Review. mar de 2014, Vol. 7(7), pp. 9-17.
12. **WGO.** www.worldgastroenterology.org. *World Gastroenterology Organization.* [Online] WGO, ago de 2010. [Citado em: 10 de 09 de 2014.]
13. **KE, McKoll.** *Helicobacter pylori*-negative nonsteroidal anti-inflammatory drug-negative ulcer. jun de 2009, Vol. 38(2), pp. 353-61.
14. **Parente JML, Da Silva BB, Palha Dias MPS, Zaterka S, Nishimura N, Zeitune JMR.** *Helicobacter pylori* infection in children of low and high socioeconomic status in Northeast Brazil. set de 2006, Vol. 75(3), pp. 509-12.
15. **Brown, LM.** *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. 2000, Vol. 22(2), pp. 283-297.

16. **Porras C, Nodora J, Ferreccio C, Jimenez S, Dominguez RL, Cook P, Anderso G, Morgan DR, Baker LH, Greenberg ER, Herrero R.** Epidemiology of Helicobacter pylori infection in six Latin American countries (SWOG trial). *Cancer Causes Control*. fev de 2013, Vol. 24(2), pp. 209-215.
17. **Dahlerup S, Andersen RC, Nielsen BS, Schjodt I, Christensen LA, Gerdes LU.** First-time urea breath tests performed at home by 36,629 patients: a study of Helicobacter pylori prevalence in primary care. dez de 2011, Vol. 16(6), pp. 468–74.
18. **HM, Malaty.** Epidemiology of Helicobacter pylori infection. 2007, Vol. 21(2), pp. 205-214.
19. **Azevedo NF, Guimarães N, Figueiredo C, Keevil CW, Vieira MJ.** A new model for the transmission of Helicobacter pylori: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. *Critic Rev Microbiol*. 2007, Vol. 33(3), pp. 157-69.
20. **Rodrigues MN, Queirz DMM, Rodrigues RT, Rocha ACM, Braga LLBC.** Prevalence of Helicobacter pylori infection in Fortaleza, Northeastern Brazil. 2005, Vol. 39(5), pp. 847-9.
21. **Souto FJD, Fontes CJF, Rocha GA, Oliveira AMR, Mendes EN, Queirz DMM.** Prevalence of Helicobacter pylori infection in a rural area of the state of Mato Grosso, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. mar/abr de 1998, Vol. 93(2), pp. 171-174.
22. **Solari CA, Araruna RPN, Reis EMF, Hofer E, Dias G, Basilio CA, Rodriguez CMS, Luna LL.** Helicobacter pylori in dyspeptic children and adults: endoscopic, bacteriologic and histologic correlations. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*. out/dez de 1994, Vol. 89(4), pp. 581-586.
23. **Malaty HM, Evans DG, Evans DJJ, et al.** Helicobacter pylori in Hispanics: comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class. *Gastroenterology*. set de 1992, Vol. 103(3), pp. 813-16.
24. **Fraser AG, Scragg R, Metacalf P, McCullough S, Yeates NJ.** Prevalence of Helicobacter pylori infection in different ethnic groups in New Zealand children and adults. *Aust N Z J Med*. out de 1996, Vol. 26(5), pp. 646-51.
25. **Malaty HYM, Graham DY, Wattigney WA, et al.** Natural history of Helicobacter pylori infection in childhood: 12 year follow up cohort study in a biracial community. *Clin Infect Dis*. fev de 1999, Vol. 28(2), pp. 279-82.
26. **KR, McQuaid.** Trato Alimentar. [A. do livro] McPhee SJ, Papadakis MA Jr Tierney LM. [ed.] McPhee SJ, Papadakis MA Jr Tierney LM. *Lange. Diagnóstico e Tratamento*. 41ª. s.l. : The MacGraw-Hill Companies, 2004, 14, pp. 628-29.
27. **O, Oluwasola A.** Genetic determinants and clinico-pathological outcomes of Helicobacter pylori. jun de 2014, Vol. 12(1), pp. 22-30.
28. **KR, McQuaid.** Trato Alimentar. [A. do livro] McPhee SJ, Papadakis MA Jr Tierney LM. [ed.] McPhee SJ, Ppadakis MA Jr Tierney LM. *Lange. Diagnóstico e Tratamento*. 41ª. s.l. : The MacGraw -Hill Companies, 2004, 14, pp. 618-619.
29. **A, Sonnenberg.** Time trends of ulcer mortality in Europe. abr de 2007, Vol. 132(7), pp. 2320-27.

30. **JC., Atherton.** H. pylori virulence factors. 1998, Vol. 54(1), pp. 105-120.
31. **Hagymási K, Tulassay Z.** Helicobacter pylori infection: New pathogenic and clinical aspects. jun 7 de 2014, Vol. 20(21), pp. 6386-6399.
32. **P., Malfertheiner.** The intriguing relationship of Helicobacter pylori infection and acid secretion in peptic ulcer disease and gastric cancer. nov de 2011, Vol. 29(5), pp. 459-64.
33. **Correa P, Piazeulo MB.** The gastric precancerous cascade. 2012, Vol. 13(1), pp. 2-9.
34. **IARC (OMS).** Globocan 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. *Globocan*. [Online] 2012. [Citado em: 01 de jan de 2015.] <http://globocan.iarc.fr/>.
35. **KM, Fock.** Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. ago de 2014, Vol. 40(3), pp. 250-60.
36. **Parkin, DM.** The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. jun de 2006, Vol. 118(12), pp. 3030–3044.
37. **Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ.** Helicobacter pylori infection and gastric cancer. set de 2001, Vol. 345(11), pp. 784-89.
38. **Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzolli F.** Management of Helicobacter pylori infection- the Maastricht IV/Florence Consensus Report. mai de 2012, Vol. 61(5), pp. 646-64.
39. **Muhsen K, Barak M, Henig C, Alpert G, Ornoy A, Cohen D.** Is the association between Helicobacter pylori infection and anemia age dependent? out de 2010, Vol. 15(5), pp. 467–72.
40. **Goh K-L, Chan W-K, Shiota S, Yamaoka Y.** Epidemiology of Helicobacter pylori infection and public health implications. Set de 2011, Vol. 16(1), pp. 1-9.
41. **Dattoli VCC, Veiga RV, da Cunha SS, Pontes-de-Carvalho LC, Barreto ML, Alcântara-Neves NM.** Seroprevalence and potencial risk factros for Helicobacter pylori infection in brazilian children. *Helicobacter*. 2010, Vol. 15(4), pp. 273-278.
42. **Zou QH, Li RQ.** Helicobacter pylori in the oral cavity and gastric mucosa: a meta-analysis. abr de 2011, Vol. 40(4), pp. 317-24.
43. **Mégraud F, Lehours P.** Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing. abr de 2007, Vol. 20(2), pp. 280-322.
44. **Kim do H, Jung HM, Hwang YJ, Ahn YS, Mun JS, Myoung BH, et al.** Culture and polymerase chain reaction of Helicobacter pylori from rectal and terminal ileal fluid after polyethylene glycol (colyte) ingestion in healthy adults with positive urea breath test. 2010, Vol. 56(1), pp. 27–32.
45. **G, Eslick.** Sexual Transmission of Helicobacter pylori via oral-anal intercourse. *Int J Std Aids*. jan de 2002, Vol. 13(1), pp. 7-11.

46. **The Eurogast Study Group.** Epidemiology and risk factors for *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. *Gut*. 1993, Vol. 34(12), pp. 1672-76.
47. **Asaka M, Kato M, Takahashi S, Fukuda Y, Sugiyama T, Ota H, et al.** Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection in Japan: 2009 revised edition. *Helicobacter*. fev de 2010, Vol. 15(1), pp. 1-20.
48. **Coelho LG, Maguinilk I, Zaterka S, Parente JM, Passos MCF, Moraes-Filho JP.** 3rd Brazilian Consensus on *Helicobacter pylori*. *Arq Gastroenterol*. 2013, Vol. 50(2), pp. 81-96.
49. **Coelho LG, Mattos AA, Francisconi CF, Castro LP, André SB.** Efficacy of the dosing regimen of pantoprazole 40 mg, amoxicillin 1000 mg and clarithromycin 500 mg, twice daily for 7 days, in the eradication of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer. jan/mar de 2004, Vol. 41(1), pp. 71-76.
50. **Van der PD, Katelaris PH.** The effectiveness of rifabutin triple therapy for patients with difficult to eradicate *Helicobacter pylori* in clinical practise. 2007, Vol. 26, pp. 1537-42.
51. **Hagymási K, Tulassay Z.** Peptic ulcer: facts and questions . 2010, Vol. 151(26), pp. 1054-61.
52. **Harvey RF, Lane JA, Nair P, Egger M, Harvey Y, Donovan J, et al.** Clinical trial: prolonged beneficial effect of *Helicobacter pylori* eradication on dyspepsia consultations-The Bristol *Helicobacter* Project. *Aliment Pharmacol Ther*. ago de 2010, Vol. 32(3), pp. 394-400.
53. **Laine L, Lewin DN, Naritoku W, Cohen H.** Prospective comparison of H&E, Giemsa, and Genta stains for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. jun de 1997, Vol. 45(6), pp. 463-7.
54. **Y, Glupczynski.** Microbiological and serological diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: an overview. 1998, Vol. 54 (1), pp. 175-186.
55. **JP, Euzéby.** List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *LPSNbacterio.net*. [Online] 1997/2015. [Citado em: 30 de 04 de 2015.] <http://www.bacterio.cict.fr/h/helicobacter.html>.
56. **Taxonomy. NCBI.** [Online] 2015. [Citado em: 18 de 06 de 2015.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>.
57. **Goodwin CS, Armstrong JA.** Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). jan de 1990, Vol. 9 (1), pp. 1-13.
58. **Bode G, MAuch F, Maltheiner P.** The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for the viability. dez de 1993, Vol. 111(3), pp. 483-490.
59. **Westblom TU, Madan E, Riff BR.** Improved growth of *Helicobacter pylori* using a liquid medium supplemented with human serum. *Ital J Gastroenterol*. 1991, Vol. 29(Suppl. 2), p. 48.
60. **Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S.** Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. ago de 1992, Vol. 37(2), pp. 123-7.
61. **P, Ruggiero.** *Helicobacter pylori* and inflammation. 2010, Vol. 16(38), pp. 4225-36.

- 62. Blaser MJ, Berg DE.** *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. 2001, Vol. 107 (7), pp. 767-73.
- 63. Ladeira MSP, Salvadori DMF, Rodrigues MAM.** Biopatologia do *Helicobacter pylori*. jan de 2003, Vol. 39 (4), pp. 335-342.
- 64. Höfler C, Fischer W, Hofreuter D, Haas R.** Cryptic plasmids in *Helicobacter pylori*: putative functions in conjugative transfer and microcin production. 2004, Vols. 294(2-3), pp. 141–148.
- 65. Y, Yamaoka.** **Mechanisms of disease:** *Helicobacter pylori* virulence factors. nov de 2010, Vol. 7(11), pp. 629-41.
- 66. Penfold SS, Lastovica AJ, Elisha BG.** Demonstration of plasmids in *Campylobacter pylori*. abr de 1988, Vol. 157(4), pp. 850-1.
- 67. Jiang Q, Hiratsuka K, Taylor DE.** Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. mai de 1996, Vol. 20 (4), pp. 833-42.
- 68. Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blasser MJ.** Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. abr 8 de 1994, Vol. 269 (14), pp. 10566-73.
- 69. De Reuse H, A Labigne, and D Mengin-Lecreulx.** The *Helicobacter pylori* ureC gene codes for a phosphoglucosamine mutase. jun de 1997, Vol. 179(11), pp. 3488–3493.
- 70. Espinoza MGC, Vasquez RG, Mendez IM, Vargas CR, Cerezo SG.** Detection of the glmM gene in *Helicobacter pylori* isolates with a novel primer by PCR. abr de 2011, Vol. 49(4), pp. 1650–1652.
- 71. Kuipers EJ, Thijs JC, Festen HPM.** The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. 1995, Vol. 9 (Suppl 2), pp. 59-70.
- 72. EM, El-Omar.** Role of host genes in sporadic gastric cancer. ago de 2006, Vol. 20(4), pp. 675-86.
- 73. Bridge DR, Merrel DS.** Polymorphism in the *Helicobacter pylori* CagA and VacA toxins and disease. mar/abr de 2013, Vol. 4(2), pp. 101-117.
- 74. Graham DY, Lu H, Yamaoka Y.** African, Asian or Indian enigma, the East Asian *Helicobacter pylori*: facts or medical myths. 2009, Vol. 10(2), pp. 77–84.
- 75. Jenks PJ, Kusters JG.** Pathogenesis and virulence of *Helicobacter pylori*. 2000, Vol. 16(suppl 1), pp. S11-8.
- 76. Abdollahi H, Tadjrobehkar O.** The role of different sugars, amino acids and few other substances in chemotaxis directed motility of *Helicobacter pylori*. mai-jun de 2012, Vol. 15(3), pp. 787–794.
- 77. Aspholm-Hurtig M, Dailide G, Lahmann M, Kalia A, Ilver D, Roche N et al.** Functional adaptation of BabA, the *Helicobacter pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. jul de 2004, Vol. 305(5683), pp. 519-22.

- 78. Weeks DL, Sachs G.** Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. jun de 2001, Vol. 40(6), pp. 1249-59.
- 79. Israel DA, Peek RM.** Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. set de 2001, Vol. 15(9), pp. 1271-1290.
- 80. Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G.** H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. jan de 2000, Vol. 287(5452), pp. 482-5.
- 81. Peek RM Jr, Miller GG, Tham KT.** Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. dez de 1995, Vol. 73(6), pp. 760-70.
- 82. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H.** Risk for gastric cancer in people with cagA positive or cagA negative *Helicobacter pylori* infection. 1997, Vol. 40(3), pp. 297-301.
- 83. Covacci A, Rappuoli R.** Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. fev de 2000, Vol. 191(4), pp. 587-92.
- 84. Lima VP, Rabenhorst SHB.** Genes associados à virulência de *Helicobacter pylori*. 2009, Vol. 55(4), pp. 389-396.
- 85. Atherton JC, Cao P, Jr RMP, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL.** Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. jul de 1995, Vol. 270(30), pp. 17771-77.
- 86. Queiroz DMM, Mendes EN, Rocha GA, Oliveira AM, Oliveira CA, Magalhães PP, Moura SB, Cabral MM, Nogueira AM.** CagA-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. out de 1998, Vol. 78(2), pp. 135-9.
- 87. Naito Y, Yoshikawa T.** Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. ago de 2002, Vol. 33(3), pp. 323-36.
- 88. Abadi ATB, Taghvaei T, Mobarez AM, Vaira G, Vaira D.** High correlation of babA2-positive strains of *Helicobacter pylori* with the presence of gastric cancer. 2013, Vol. 8(6), pp. 497-501.
- 89. Zambon CF, Navaglia F, Basso D, Rugge M, Plebani.** *Helicobacter pylori* babA2, cagA, and s1 vacA genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. 2003, Vol. 56(4), pp. 287–291.
- 90. Lu H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y.** Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. abr de 2005, Vol. 128(4), pp. 833–848.
- 91. Portal-Celhay C, Perez-Perez GI.** Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. 2006, Vol. 110(3), pp. 305–314.
- 92. JE, Crabtree.** Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. 1996, Vol. 10, pp. 1S-10S.

- 93. Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A, Wakebe H, Ohmoto Y et al.** Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *ago de 1997*, Vol. 65(8), pp. 3218-24.
- 94. Goodwin CS, Armstrong JA, Marshall BJ.** *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration. *abr de 1986*, Vol. 39(4), pp. 353–365.
- 95. Di Tommaso A, Xiang Z, Bugnoli M, Pileri P, Figura N, Bayeli PF.** *Helicobacter pylori*-specific CD4+ T-cell clones from peripheral blood and gastric biopsies. *mar de 1995*, Vol. 63(3), pp. 1102-6.
- 96. Montecucco C, Rappouli R.** Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *jun de 2001*, Vol. 2(6), pp. 457-66.
- 97. Kist M, Spiegelhalder C, Moriki, Schaefer HE.** Interaction of *Helicobacter pylori* (strain 151) and *Campylobacter coli* with human peripheral polymorphonuclear granulocytes. 1993, Vols. 280(1-2), pp. 58-72.
- 98. Chan WY, Hui PK, Leung KM, Chow J, Kwok F, Ng CS.** Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in human stomach. *out de 1994*, Vol. 102(4), pp. 503-7.
- 99. Negrini R, Lisato R, Zanella I, Cavazzini R, Gulinni S, Villanacci V et al.** *Helicobacter pylori* infection induces antibodies cross-reacting with human gastric mucosa. *ago de 1991*, Vol. 101(2), pp. 437-45.
- 100. Perez-Perez GI, Shepherd VL, Morrow JD, Blaser MJ.** Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *abr de 1995*, Vol. 63(4), pp. 1183-87.
- 101. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P.** Classification and grading of gastritis- The updated Sydney System. 1996, Vol. 20(10), pp. 1161-1181.
- 102. Al-Sulami A, Al-Kiat HS, Bakker LK, Hunnon H.** Primary isolation and detection of *Helicobacter pylori* from dyspeptic patients; a simple and rapid method. 2008, Vol. 14(2), pp. 268-276.
- 103. Hutton ML, Kaparakis-Liaskos, Ferrero RL.** The use of albuMAX II® as a blood or serum alternative for the culture of *Helicobacter pylori*. 2011, Vol. 17(1), pp. 68-76.
- 104. Piccolomini R, Bonaventura GD, Festi D, et al.** Optimal combination of media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. *fev de 1997*, Vol. 35(6), pp. 1541-1544.
- 105. Otth L, Wilson M, Fernández H, Otth C, Toledo C, Cárcamo V,.** Isolation of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa and susceptibility to five antimicrobial drugs in Southern Chile. *abr/jun de 2011*, Vol. 42(2), pp. 442-447.
- 106. Cogo LL, Monteiro CLB, Nogueira KS, Palmeiro JK, Ribeiro ML, Camargo ER et al.** Characterization of virulence genes *cagA* and *vacA* in *Helicobacter pylori* and their prevalence in gastrointestinal disorders. 2011, Vol. 42(4), pp. 1289-1295.

- 107. LU JJ, PERNG C-L, SHYU R-Y et al.** Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissue. mar de 1999, Vol. 37(3), pp. 772–774.
- 108. Park C-Y, Kwak M, Gutierrez O.** Comparison of genotyping *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens and genotyping from bacterial cultures. jul de 2003, Vol. 41(7), pp. 3336–3338.
- 109. Fonseca TL, Moraes EP, Juliano CR, Silva AM, Scaini CJ, Mendoza-Sassi RA, Silva PEA.** Detection of *Helicobacter pylori* by phenotypic and genotypic methods. 2010, Vol. 55(6), pp. 643–648.
- 110. Ramis IB, Moraes EP, Fernandes MS, Mendoza-Sassi R, Rodrigues O, Juliano CRV, Scaini CJ, Silva PEAS.** Evaluation of diagnostic methods for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens of dyspeptic patients. jul de 2012, Vol. 43(3), pp. 903-909.
- 111. Takamura A, Ito M, Imagawa S, Takata S, Tanaka S, Teixeira CR.** *Helicobacter pylori* *cagA* polymorphism and gastric inflammation: An international comparison between Japanese and Brazilian patients. set de 2011, Vol. 46(9), pp. 1051–1056.
- 112. Martins LC, Corvelo TCO, Demachki S, Araújo MTF, AssumpçãoMA, Villar SCAV, et al.** Clinical and pathological importance of *vacA* allele heterogeneity and *cagA* status in peptic ulcer disease in patients from North Brazil. dez de 2005, Vol. 100(8), pp. 875-881.
- 113. Brito CAA, Silva LMB, Jucá N, Leal NC, Souza W, Queiroz D.** Prevalence of *cagA* and *vacA* genes in isolates from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. set de 2003, Vol. 98(6), pp. 817-21.
- 114. Ashour AAR, Magalhães PP, Mendes EN, Collares GB, Gusmão VR, Queiroz DMM et al.** Distribution of *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. mai de 2002, Vol. 33, pp. 173-178.
- 115. Rasmussen LT, de Labio RW, Neto AC, Silva LC, Queiroz VF, Smith MAC, Payão SLM.** Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies, saliva and dental plaques of dyspeptic patients from Marília, São Paulo Brazil: presence of *vacA* and *cagA* genes. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2012, Vol. 18(2), pp. 180-187.
- 116. Alvares MMD, Marino M, Oliveira CA, MendesCC, Costa ACF, Guerra J et al.** Características da gastrite crônica associada a *Helicobacter pylori*: aspectos topográficos, doenças associadas e correlação com o status *cagA*. fev de 2006, Vol. 42(1), pp. 51-59.
- 117. Warburton VJ, Everett S, Mapstone NP, Axon ATR, Hawkey P, Dixon MF.** Clinical and histological associations of *cagA* and *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis. jan de 1998, Vol. 51(1), pp. 5-61.
- 118. Kusters JG, Vliet AHM, Kuipers EJ.** Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. jul de 2006, Vol. 19(3), pp. 449-90.
- 119. Nogueira C, Figueiredo C, Carneiro F, Gomes AT, Barreira R, Figueira P et al.** *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. fev de 2001, Vol. 158(2), pp. 647-54.
- 120. Pereira WN, Ferraz MA, Zabaglia LM, Labio RW, Orcini WA, Ximenez JPB.** Association among *H. pylori* virulence markers *dupA*, *cagA* and *vacA* in Brazilian patients. 2014, Vol. 20(1), pp. 1-5.

121. Ramis IV, Fonseca TL, Moraes EP, Fernandes MS, Mendoza-Sassi R, Rodrigues O, et al. Molecular basis of pathogenicity in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *out de* 2010, Vol. 48(10), pp. 3776–3778.

10- ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL ESCOLA SÃO FRANCISCO DE ASSIS
DIVISÃO DE DESENVOLVIMENTO ACADÊMICO -
CIENTÍFICO



Parecer

Trata o presente analisar e emitir Parecer a cerca da solicitação de desenvolvimento do Projeto de Pesquisa da Dra. Leticia Vellozo dos Reis , intitulado: " Isolamento e Caracterização do Helicobacter pylori em Lesões Gastroduodenais na População Adulta do Rio de Janeiro", a ser desenvolvido na Unidades de Cuidados Básicos (UCB) no setor de Endoscopia, período de junho de 2013 á maio de 2014 .

Consta o projeto de pesquisa com suas etapas de desenvolvimento e a carta de solicitação para realização da Pesquisa no Hospital Escola São Francisco de Assis .

Considerando a importância e pertinência do estudo, somos de parecer FAVORÁVEL a aprovação da solicitação.

Rio de Janeiro, 30 de novembro de 2012.

Ligia de Oliveira Viana

Profª Dra. Ligia de Oliveira Viana

Diretora da Divisão de Desenvolvimento Acadêmico - Científico - HESFA/UFRI

Profª Drª Ligia de Oliveira Viana
Diretora Adjunta da Divisão
de Desenvolvimento
Acadêmico - Científico - HESFA/UFRI
SIAPE: 0374809

Encaminhado ao Conselho Diretor do HESFA para Homologação .

Av. : Presidente Vargas , 2.863 - Cidade Nova - Rio de Janeiro - CEP 20210 - 030
TELEFONE : (21) 3184 - 4407

*Discurso em Reunião de Conselho Técnico Deliberativo
do Hospital Escola São Francisco de Assis em
5 de dezembro de 2012.*

Deliberado

ANEXO II

HOSPITAL ESCOLA SÃO FRANCISCO DE ASSIS- HESFA /UFRJ

BOLETIM DE ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA

EDA _____

Data: ___/___/___ Pront: _____

Procedência: HESFA

Externa

Nome: _____

Endereço: _____ Bairro: _____

_____ Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____

Telefone: _____ Idade: _____ DN: _____ Sexo: F M

Procedência externa: _____

I- Registro pré-exame /Anamnese

Queixa atual (motivo do exame) _____

EDA anterior? () N° de vezes: _____ Última em : _____ Diag: _____

Preparo para o exame adequado: () SIM () NÃO

II – HPP

Hipertensão arterial? () SIM () NÃO PA: _____ mmHg Pulso: _____ bpm

Medicações usadas: _____

Diabetes: () SIM () NÃO Tempo: _____ Medicação: _____

Alergia medicamentosa: () SIM () NÃO Qual? _____

Hematêmese / melena? () SIM () NÃO Qual? _____

Comprometimento cardíaco? () SIM () NÃO Qual? _____

Comprometimento respiratório? () SIM () NÃO Qual? _____

Faz uso de anti-inflamatório? Qual? _____

Hep B, Hep C, HIV? Qual? _____

Faz uso de outras medicações? Quais? _____

Outros (etilismo, tabagismo, outras doenças)? _____

III – Durante o procedimento

Medicações: 1) Xilocaina spray 10% () SIM () NÃO

2) Midazolam IV () SIM () NÃO

Exame realizado? () SIM () NÃO

_____ mg

IV – Registro pós-exame

Hora: _____

Hora da alta: _____

Alta acompanhado? () SIM () NÃO _____

ASS: _____