Vanessa de Paula e Silva Rossi Aguiar

**Pesquisa da cepa de
Helicobacter pylori na cavidade
bucal.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de **Mestre** em Ciências

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica
Orientador: Prof. Dr. Jaime Natan Eisig

São Paulo
2008

Vanessa de Paula e Silva Rossi Aguiar

**Pesquisa da cepa de
Helicobacter pylori na cavidade
bucal.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de **Mestre** em Ciências

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica
Orientador: Prof. Dr. Jaime Natan Eisig

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Aguiar, Vanessa de Paula e Silva Rossi

Pesquisa de cepa de *Helicobacter pylori* na cavidade bucal / Vanessa de Paula e Silva Rossi Aguiar. -- São Paulo, 2008.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Departamento de Gastroenterologia.

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica.

Orientador: Jaime Natan Eisig.

Descritores: 1.*Helicobacter pylori* 2.Boca 3.Dispepsia 4.Reação em cadeia da polimerase 5.Placa dentária 6.Saliva

USP/FM/SBD-419/08

Ao Flávio
Pelo amor, apoio e
compreensão

À minha mãe, ao Jorge e ao Renê,
Por estarem sempre ao
meu lado, pelo estímulo
e pelo carinho.

Aos meus queridos avós
Pela força, exemplo de
vida e por todo amor.

Aos meus familiares e amigos
Por acompanharem os
meus passos.

À memória de meu pai

A Deus

AGRADECIMENTOS:

Ao meu orientador Dr. Jaime Natan Eisig pela dedicação ao projeto, pelos ensinamentos e pelo apoio constante.

Ao Dr. Tomás Navarro Rodriguez pela orientação, pela idealização do projeto e pela confiança.

À Dra. Rejane Mattar pela capacidade, ensinamentos e dedicação.

Ao Prof. Dr. Flair José Carrilho, Professor Titular da Disciplina de Gastroenterologia Clínica e Chefe da Pós-Graduação pelo incentivo e sugestões.

Ao Dr. Ricardo Correa Barbuti e Dr. Fernando Marcuz Silva pela convivência, pelo aprendizado e por toda a participação no protocolo.

Aos residentes da Gastroenterologia Clínica que ajudaram na seleção dos pacientes, ensinamentos e companheirismo.

Ao Sr. Aníbal Ferreira dos Santos e Maria do Socorro Monteiro pelo excelente trabalho e ensinamentos no Laboratório de Provas Funcionais do Aparelho Digestivo.

À Daniela Barone Della Cruz pela amizade e por ser o elo com a Gastroenterologia Clínica da FMUSP.

À Cibelle e Maísa pela convivência agradável e amizade.

À Sra. Rosemeire Micheletti, Fátima Gomes, Fabiana Renata Soares Bispo e Cláudia de Arruda pela ajuda e amizade.

Aos professores, médicos assistentes e colegas de pós-graduação da Disciplina de Gastroenterologia Clínica pela colaboração em algum momento da realização deste trabalho.

À Dra. Maria Paula Perez, diretora da Divisão de Odontologia por disponibilizar espaço físico e materiais necessários para o atendimento dos pacientes na divisão de Odontologia, pelas sugestões e apoio.

Aos funcionários da Divisão de Odontologia e cirurgiões dentistas pela colaboração e convivência.

Ao NAPESq, em especial à Gianni Mara Silva dos Santos pela assessoria estatística.

Aos pacientes, pela compreensão e colaboração durante a investigação.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *Internacional Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3 MÉTODOS.....	15
4 RESULTADOS.....	30
5 DISCUSSÃO.....	33
6 CONCLUSÕES.....	44
7 ANEXOS.....	45
8 REFERÊNCIAS.....	52

Apêndice

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1 - Fases Clínicas do Estudo.....	16
Figura 2 – Teste respiratório para diagnóstico de <i>H. pylori</i> no estômago.....	27
Figura 3 – Coleta das amostras da cavidade bucal.....	27
Figura 4 – Extração de DNA por sal: Primeira Etapa.....	28
Figura 5 – Extração de DNA por sal: Segunda Etapa.....	28
Figura 6 – Extração de DNA por sal: Terceira Etapa.....	29
Figura 7 – Resultados da amplificação de amostras bucais primers P1/P2.....	32
Figura 8 – Resultados da amplificação de amostras bucais primers P1/P2.....	32

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1 - Sequências de oligonucleotídeos utilizadas para detecção de <i>H. pylori</i> ...	23
Tabela 2 - Condições de amplificação de PCR para cada segmento estudado.....	23
Tabela 3 - Sequências de oligonucleotídeos para <i>vacA</i>	24
Tabela 4 - Sequências de oligonucleotídeos para <i>cagA2</i>	24
Tabela 5 - Sequências de oligonucleotídeos para <i>cagA1</i>	25
Tabela 6 - Distribuição de <i>H. pylori</i> no estômago e nos sítios da cavidade bucal.....	30

RESUMO:

Rossi-Aguiar VPS. Pesquisa da cepa de *Helicobacter pylori* na cavidade bucal [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 62p.

No Brasil, cerca de 65% da população é infectada por *H. pylori*, bactéria associada à patogênese de gastrite, úlcera péptica e considerada fator de risco de câncer gástrico. A transmissão da bactéria parece ocorrer de pessoa para pessoa, nas formas oral-oral, gástrica-oral e fecal-oral, e a cavidade bucal pode ser importante neste processo de transmissão. Os objetivos deste estudo foram: pesquisar a presença de *H. pylori* na cavidade bucal de pacientes dispépticos e identificar as possíveis cepas existentes. Para tanto, 43 pacientes com dispepsia funcional do Ambulatório de Estômago do Departamento de Gastroenterologia, Disciplina de Gastroenterologia Clínica – FMUSP foram selecionados para o estudo. Todos realizaram exame de endoscopia digestiva alta e coleta de fragmento da mucosa gástrica para pesquisa de *H. pylori* através de teste da urease. A presença de *H. pylori* no estômago foi também evidenciada pelo teste respiratório com ^{14}C ou sorologia, e em 30 pacientes foi identificado *H. pylori* no estômago. Foram coletadas 144 amostras da cavidade bucal: 43 de saliva, 43 de dorso de língua, 43 de placa supra-gengival e 15 de placa sub-gengival. A detecção de *H. pylori* das amostras bucais realizou-se através de PCR utilizando os primers espécie-específicos: P1/P2, Urease A/B e primers para investigar os genótipos *cagA* e *vacA* (m1, m2, s1a, s1b, s2). Não foi possível detectar

o microorganismo em nenhuma amostra da cavidade bucal. Esse estudo mostrou que a cavidade bucal de pacientes dispépticos não representa reservatório para a bactéria.

Descritores: *Helicobacter pylori*, boca, dispepsia, reação em cadeia da polimerase, placa dentária, saliva.

SUMMARY:

Rossi-Aguiar VPS. Evaluation of *Helicobacter pylori* genotype in the oral cavity [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 62p.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection is very prevalent in Brazil, infecting almost 65% of our population, being associated with peptic ulcer disease, gastric cancer, lymphoma and functional dyspepsia. The aim of this study was to evaluate the presence of this bacterium in the oral cavity of epigastric pain syndrome (functional dyspepsia) patients and assess the frequency of *cagA* and *vacA* genotypes of oral *H. pylori*. All 43 epigastric pain syndrome outpatients, who entered the study, were submitted to upper gastrointestinal endoscopy to rule out organic diseases. *H. pylori* infection was confirmed by rapid urease test, urea breath test and sorology, and thirty patients harbored *H. pylori* in the stomach. 144 samples of the oral cavity were collected: 43 samples of saliva, 43 of the tongue dorsum and 43 of supra-gingival dental plaque and 15 of sub-gingival dental plaque which were collected from the patients with periodontitis; *H. pylori* infection was verified by polymerase chain reaction (PCR) using primers (P1 and P2) that amplify the DNA sequence of a species-specific antigen present in all *H. pylori* strains, primers Urease A/B and primers for *cagA* and *vacA* (m1, m2, s1a, s1b, s2) genotyping. It was not possible to detect *H. pylori* in any oral samples using P1/P2 and Urease A/B. The genotype *cagA* was also negative in all samples and *vacA* genotype could not be characterized (s-m-). In this study, the oral cavity seemed not to be a reservoir for *H. pylori* in patients with epigastric pain syndrome being detected exclusively in the stomach.

Disriptors: *Helicobacter pylori*, mouth, dyspepsia, polymerase chain reaction,
dental plaque, saliva.

1- INTRODUÇÃO:

A infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) nos seres humanos é muito comum. Aproximadamente, metade da população mundial está infectada pelo *H. pylori*, patógeno responsável por gastrite, úlcera péptica e risco de câncer gástrico¹.

No Brasil, a seroprevalência do *H. pylori* foi estimada em 65% por Zaterka e colaboradores em 2007. Essa prevalência está associada a ambientes populosos, condições de higiene precárias, falta de saneamento básico e contato próximo².

A transmissão desta bactéria parece ocorrer de pessoa para pessoa nas formas oral-oral³, gástrica-oral⁴ e fecal-oral⁵, e a cavidade bucal pode ser importante no processo de transmissão da bactéria ou na reinfecção do estômago após a terapia de erradicação⁶.

H. pylori foi isolado de saliva⁷, de raspado de dorso de língua⁸, placa ou biofilme dentário supra-gengival⁹, biofilme sub-gengival¹⁰ e em superfície de câncer na cavidade bucal¹¹; entretanto, os resultados encontrados são controversos. Assim, a prevalência de *H. pylori* encontrada na cavidade bucal varia de 0%¹² a 100%¹³.

Os resultados distintos contribuem para a dúvida se o *H. pylori* constitui-se como microbiota permanente da cavidade bucal ou transiente. Métodos para a detecção do *H. pylori* no estômago já estão bem estabelecidos como teste rápido de urease, exame histológico dos tecidos, cultura, teste respiratório com C¹³ ou C¹⁴ e biologia molecular. Por outro lado, o método mais preciso devido a sua sensibilidade e especificidade, para identificação do microorganismo em sítios da cavidade bucal, é o método de reação de polimerase em cadeia (PCR)¹³.

Estudos em relação à genotipagem da bactéria no estômago têm sido feitos no intuito de se conhecer fatores de virulência do *H. pylori* como *cagA* e *vacA*, porém pouco se sabe sobre a genotipagem na cavidade bucal.

1.1- OBJETIVOS :

Os objetivos deste estudo foram:

- avaliar se a cavidade bucal de pacientes com dispepsia funcional pode ser considerada reservatório para *Helicobacter pylori*;
- avaliar se a saliva, microbiota de dorso de língua, biofilme supra-gengival e biofilme sub-gengival podem abrigar a bactéria, em pacientes com e sem o patógeno no estômago;
- identificar as cepas de *Helicobacter pylori* na cavidade bucal de pacientes dispépticos com e sem a bactéria no estômago.

2- REVISÃO DE LITERATURA:

Helicobacter pylori, denominada inicialmente como *Campylobacter pyloridis*, é uma bactéria gram-negativa espiralada, microaerofílica e flagelada¹⁴.

Rubin Warren e Barry Marshall mostraram à comunidade médica mundial que uma espiroqueta (*H. pylori*), primeiramente observada por Warren em biópsias gástricas e posteriormente cultivada (em abril de 1982, na Austrália) estaria associada à infecção na mucosa gástrica causando gastrite¹⁴. Essa descoberta foi reconhecida em outubro de 2005, quando esses pesquisadores ganharam o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina.

O papel do *H. pylori* na patogênese da gastrite crônica e sua associação com úlcera duodenal e carcinoma gástrico estão bem estabelecidos¹⁵.

O *H. pylori* causa três principais fenótipos gástricos que determinam diferentes manifestações clínicas. O fenótipo mais comum é a gastrite simples ou benigna, caracterizada pela presença de pangastrite leve com pouca alteração na secreção de ácido gástrico. Este fenótipo é freqüentemente encontrado em indivíduos assintomáticos que não desenvolvem doenças gastrintestinais mais severas. O segundo fenótipo é designado como úlcero-duodenal e acomete mais de 15% dos indivíduos infectados pela bactéria. Outro fenótipo possível causado pela infecção do estômago pelo *H. pylori* é o de câncer gástrico, caracterizado por presença de gastrite, atrofia gástrica e hipo ou acloridria. Essas anormalidades afetam 1% dos indivíduos infectados que desenvolvem inflamação, induzida pela infecção, que aumenta o risco de câncer gástrico. Os indivíduos que desenvolvem úlcera duodenal

parecem estar “livres” de desenvolverem câncer gástrico, uma vez que as manifestações dos últimos dois fenótipos descritos são mutuamente exclusivas¹⁶.

O balanço entre os fatores de virulência bacterianos e a resposta do hospedeiro frente à infecção determina diferentes quadros clínicos. Diversos são os fatores de virulência relacionados à patogenicidade do *H. pylori*, como o flagelo, necessário para que a bactéria penetre na camada de muco; a urease, essencial para que o ambiente ácido do estômago seja neutralizado e ocorra a colonização; e proteínas citotóxicas¹⁷; adesinas (*babA*, *sabA*); toxinas vacuolizadora (*vac A*) e produtos da ilha de patogenicidade (*cag PAI*)¹⁸.

Para colonizar o estômago, o *H. pylori*, através da enzima urease, quebra a uréia em amônio e dióxido de carbono tornando o ambiente ao seu redor menos ácido. A bactéria fica próxima à superfície do epitélio, onde o pH é neutro, e para se manter na camada de muco, que é constantemente secretado, a bactéria utiliza seu flagelo para se movimentar e controlar a direção do movimento através de respostas quimotáticas¹⁶.

A citotoxina vacuolizante, codificada pelo gene *vacA*, induz a vacuolização das células eucariontes e mimetiza a ação imunossupressora de drogas¹⁸, e confere sobrevivência da bactéria no estômago, uma vez que permite a entrada de uréia e nutrientes para a bactéria, através da formação de poros (e perda das “tight junctions” das células epiteliais)¹⁹.

VacA inicialmente se apresenta em maior tamanho, e é reduzida nas duas extremidades quando secretada pela bactéria. A terminação contém a região “s” ou sequência sinal que apresenta variações. Cepas contendo s1 estão mais freqüentemente relacionadas à úlcera e câncer gástricos²⁰. A região mediana do gene,

“m” também apresenta variação nos alelos, com o tipo m1 apresentando maior atividade vacuolizadora¹⁶.

VacA também induz morte celular no hospedeiro através de apoptose²¹.

Estudos demonstraram uma associação entre expressão de *cagA* e produção de atividade vacuolizadora, o que confirma um forte elo genético entre presença de *cagA* e *vacA* tipo s1²⁰.

O gene associado à citotoxina é denominado de *cagA*. Cepas *cagA* positivas estão associadas com aumento de inflamação²², proliferação celular²³ e metaplasia²¹ da mucosa gástrica. Trabalhos apontam este gene como marcador de cepas mais virulentas já que o mostra associado à úlcera gástrica²⁴ e câncer gástrico²⁵.

O gene *cagA* faz parte da inserção de DNA de *cagPAI* (ilha de patogenicidade)¹⁸.

A infecção por *Helicobacter pylori* é restrita a seres humanos. A transmissão da bactéria ocorre mais frequentemente na infância e alguns países apresentam índice de mais de 90% de crianças infectadas com 10 anos de idade e há até evidências de infecção precoce nos primeiros meses de vida, podendo seguir por toda vida¹⁶. Na maioria dos casos (80 – 90%), os indivíduos carregam e transmitem a bactéria sem apresentar nenhum sintoma dispéptico. A aquisição da infecção está relacionada à infecção na mãe, irmãos e também a um grande número de pessoas residindo no mesmo ambiente¹⁶.

Diversos estudos abordam possíveis formas de transmissão da bactéria e vetores em potencial, porém resultados discrepantes não permitem apontar como a infecção é disseminada com certeza.

A transmissão oral-oral possivelmente envolve a transferência de *H. pylori* entre indivíduos via saliva. A transmissão fecal-oral também é aceita por muitos pesquisadores, visto que estudos anteriores obtiveram cultura de *H. pylori* de fezes de crianças e adultos. Essa segunda forma de transmissão é indiretamente sustentada por resultados do estudo de Grübel e colaboradores que isolaram *H. pylori* em moscas⁵.

Resultados contraditórios foram observados em outro trabalho que investigou moscas expostas a fezes humanas de pacientes com *H. pylori* no estômago, a fezes de indivíduos sem *H. pylori* e a fezes inoculadas posteriormente. Os autores do trabalho não detectaram *H. pylori* nas moscas expostas a fezes infectadas naturalmente ou artificialmente por *H. pylori*, fato que os fizeram acreditar que as moscas não fossem vetores para a transmissão da bactéria²⁶.

O papel das mãos e da cavidade bucal na transmissão de *H. pylori* também são considerados. Dowsett e colaboradores desenvolveram um trabalho que objetivou elucidar possíveis fontes de infecção por *H. pylori* em uma população rural isolada da Guatemala. As hipóteses de a mão ser um instrumento na transmissão e da cavidade bucal ser reservatório da bactéria foram abordadas no estudo. A prevalência da bactéria na língua foi de 56%, número que se correlacionou com a presença da bactéria sob a unha do dedo indicador da mão dominante que foi de 58%. Esses resultados sustentam a hipótese da cavidade bucal ser reservatório para a *H. pylori* e a mão possível instrumento para a transmissão da bactéria⁸.

Evidências indicam que a infecção por *H. pylori* parece ter relação direta com a classe econômica da população e saneamento básico.

Ahmed e colaboradores realizaram um estudo utilizando PCR que envolveu 500 adultos da população do Sul da Índia com o objetivo de conferir os hábitos de higiene e fonte de água na transmissão de *H. pylori*. A prevalência de *H. pylori* encontrada na população estudada foi de 80% e a infecção por *H. pylori* foi detectada em maior número em indivíduos que bebiam água de poço (comparada com água de torneira), mais comum em indivíduos que utilizavam banheiros fora da residência e que viviam em ambientes mais populosos²⁷.

Fatores como: idade, fonte de água, número de cômodos na casa, presença de banheiro interno à casa, número de pessoas que dividem o mesmo cômodo ao dormir, nível de educação, renda familiar e até o fato de terem passado por exame de endoscopia prévia, estão associados com uma maior prevalência de *H. pylori*². Porém, nenhuma associação foi estabelecida entre presença de *H. pylori* e gênero, uso de cigarro, álcool e drogas². Um estudo sobre prevalência de *H. pylori* realizado em 993 adultos, assintomáticos doadores de sangue da cidade de São Paulo, Brasil, verificou uma prevalência de *H. pylori* de 65%². Mudanças em relação ao acesso a saneamento (água e esgoto encanados na residência, presença de banheiro na casa) e hábitos de higiene (lavar as mãos, fonte de consumo de água: filtrada ou fervida) podem representar barreiras para a transmissão da bactéria. Melhorias em saneamento e higiene, segundo Zaterka e colaboradores, são responsáveis pelo decréscimo na prevalência em países industrializados como Estados Unidos da América, países do oeste europeu e Japão.

Megraud e colaboradores observaram um aumento na prevalência de *H. pylori* em crianças africanas cujas mães mastigavam a comida antes de alimentá-las²⁸. Um aumento na prevalência da infecção pela bactéria também foi observado em outro

estudo que detectou a presença do microorganismo em imigrantes chineses que dividiam o mesmo talher (“hashi”)²⁹.

Dados como esses apontam a cavidade bucal como reservatório de *H. pylori*. Muitos estudos foram realizados com o intuito de verificar o papel da cavidade bucal na transmissão e possível reinfecção do estômago, bem como, se a bactéria constitui parte da microbiota permanente ou transitória da cavidade bucal.

Shames e colaboradores detectaram a existência da mesma cepa de *H. pylori* na placa dentária e no estômago do mesmo indivíduo³⁰. Por outro lado, Loster e colaboradores acharam cepas totalmente diferentes entre amostras da cavidade bucal e do estômago, sugerindo que a infecção nos dois sítios ocorreria em eventos diferentes não relacionados³¹.

Várias pesquisas têm avaliado sítios da cavidade bucal quanto à presença de *H. pylori*. A bactéria foi detectada em saliva^{7, 13, 20, 32, 33, 34, 35, 36}, língua^{8, 36}, placa supra-gengival^{3, 9, 34, 36, 37}, placa sub-gengival^{10, 20, 35, 36}, ulcerações bucais³⁸ e em neoplasias bucais³⁹.

A placa dentária, chamada de biofilme dental é uma estrutura constituída por microorganismos organizados em uma matriz cujos principais componentes são EPS (exopolissacarídeos) e água e toda essa estrutura está aderida à superfície dentária.

A maior vantagem que o biofilme confere às espécies colonizadoras é a proteção contra outros microorganismos, contra mecanismos de defesa do hospedeiro e substâncias potencialmente tóxicas (como quimioterápicos e antibióticos). Além disso, a estrutura do biofilme facilita o acesso a nutrientes, permite “cross-feeding” (uma espécie provendo outra com nutrientes), remoção de metabólitos prejudiciais

(que são utilizados por outras bactérias) e constitui ambiente físico-químico apropriado (como redução do potencial de oxidação)⁴⁰.

Adesinas com similaridades funcionais encontradas em bactérias de gêneros diferentes podem reconhecer os mesmos receptores em outras células bacterianas. A maioria das bactérias bucais se adere a outras bactérias também bucais. Essa aderência célula-a-célula é conhecida como coagregação⁴⁰.

Algumas bactérias componentes do biofilme dentário estabelecem relações de coagregação com *H. pylori* como *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*³⁹.

Por outro lado, outros microorganismos exercem um efeito inibitório ao crescimento de *H. pylori*. Aiba e colaboradores observaram que o *Lactobacillus salivarius* quando misturado à cultura de *H. pylori* promove inibição em seu crescimento, provavelmente pela produção de ácido láctico⁴¹. Okuda e colaboradores encontraram comportamento semelhante ao cultivar *H. pylori* com sobrenadantes de *Streptococcus mutans* e *Prevotella intermedia*. O crescimento de *H. pylori* foi significativamente maior nas culturas sem a inoculação das bactérias bucais¹¹.

A prevalência de *H. pylori* em diferentes sítios da cavidade bucal variam muito. Estudos encontraram desde a ausência da bactéria^{12, 42} até 100% de detecção^{6, 34}.

Cammarota e colaboradores⁴³, com intuito de compreender melhor o papel da placa dentária na transmissão de *H. pylori*, coletaram amostras de 31 pacientes que iriam fazer endoscopia. Realizou-se a pesquisa da bactéria no estômago através de coloração de Giemsa e teste rápido de urease. A abordagem da bactéria na boca foi realizada através de PCR obtendo-se uma prevalência da bactéria na boca de apenas

3,2%, sem relação aparente com o estômago. Portanto, para os autores a placa dentária não representou um “santuário” para *H. pylori*.

Outro trabalho que objetivou a detecção de *H. pylori* no meio bucal através de nested-PCR encontrou uma prevalência na placa dentária extraída de dentes molares de 82%¹³.

Para alguns autores, uma maior prevalência de *H. pylori* na cavidade bucal está condicionada à presença de outras patologias bucais como glossite⁴⁴, carcinoma¹¹, infecção por HSV³⁸ e periodontite³⁶.

Dentre as patologias bucais, a doença periodontal é uma das mais prevalentes. Sua característica mais marcante é a destruição das fibras colágenas do periodonto, o que favorece a formação da bolsa periodontal⁴⁵. O biofilme subgengival é mais complexo, pois está associado à estrutura dentária e a tecidos. Muitas espécies de microorganismos são causadores da doença periodontal que levam a perda dos tecidos de sustentação do elemento dental⁴⁰.

Um estudo realizado no Brasil³⁵ em 2008 envolveu 56 pacientes sem sintomas dispépticos com o periodonto saudável (ausência de bolsas periodontais e inflamação nos tecidos de suporte dentário) e 169 pacientes com periodontite crônica e objetivou a pesquisa de *H. pylori* na saliva e em placa subgengival (presente nas bolsas periodontais e sulcos gengivais) destes dois grupos. Através de PCR, Souto e Colombo, observaram a prevalência da bactéria em 33,3% das amostras de placa subgengival enquanto que a prevalência em amostras de saliva foi de 20%, significativamente menor. A prevalência em placa subgengival e em saliva se apresentou maior em pacientes com doença periodontal. Analisando os resultados, os autores destacaram a frequência em que *H. pylori* foi encontrado na cavidade bucal

de pacientes com periodontopatia e inflamação, o que pode contribuir para a colonização da espécie no ambiente bucal³⁵.

Em outro estudo envolvendo 336 indivíduos com periodontite pesquisou-se a presença de *H. pylori* nas bolsas periodontais dos participantes. Através de PCR e utilizando primers para gene da urease A, Asikainem e colaboradores⁴⁶ concluíram que a bolsa periodontal não constitui reservatório natural para *H. pylori* já que os resultados para as amostras coletadas indicaram ausência do microorganismo.

Anand e colaboradores pesquisaram *H. pylori* em placa dentária de 134 pacientes e correlacionaram-na com a infecção do estômago, doença periodontal, índice de higiene bucal, nível de educação e condições de moradia. Presença de doença periodontal e má higiene bucal não estiveram relacionadas com a infecção por *H. pylori* na boca, entretanto, houve relação entre periodontite e infecção no estômago⁴⁷.

Umeda e colaboradores estudaram 56 japoneses e encontraram, através de nested-PCR, *H. pylori* na cavidade bucal de 13 (46,4%) pacientes com a infecção no estômago ou duodeno e apenas em 2 (16, 7%) pacientes sem história de úlcera ou gastrite. Em relação à presença de doença periodontal, 41,2% dos pacientes com doença periodontal apresentaram *H. pylori* nas amostras de placa dentária e os autores destacaram o fato observado de um indivíduo com bolsa periodontal de profundidade maior que 4mm que continuou apresentando *H. pylori* em amostra da placa dentária mesmo após o tratamento para a erradicação da bactéria no estômago. No mesmo estudo, porém, utilizando-se a cultura como método de detecção de *H. pylori* na boca apenas uma amostra foi positiva³⁶.

Diferentes metodologias utilizadas podem determinar taxas de prevalência distintas. A grande discrepância na prevalência da bactéria no ambiente bucal pode estar associada a diferentes especificidade e sensibilidade de PCRs realizadas e à dificuldade em se obter cultura de *H. pylori* proveniente da cavidade bucal³⁴.

A detecção da bactéria no estômago tem sido feita através do teste rápido de urease (RUT) ou teste CLO (Campylobacter-like organisms) que permite a confirmação da presença de *H. pylori* baseado na produção de urease⁴⁸, já que *H. pylori* é a única bactéria produtora de urease conhecida como hospedeira no estômago.

Alguns autores, como Ozdemir e colaboradores, realizaram a pesquisa de *H. pylori* na cavidade bucal através de RUT e obtiveram altos índices de prevalência como o de 83% em placa dentária e 59% em raspado de língua³⁷.

Resultados tão altos encontrados através de RUT são discutíveis, uma vez que a cavidade bucal, diferente do estômago, constitui micro-ambiente para várias espécies produtoras de urease como: *Streptococcus spp*, *Haemophilus ssp* e *Actinomyces spp*, portanto, é precipitado concluir que grande atividade de urease no biofilme dental possa servir de identificação para *H. pylori*.

O uso de PCR permite a amplificação de uma região de DNA e subsequente detecção no gel de agarose através de eletroforese, sendo o método mais indicado para a avaliação de amostras coletadas da boca, devido a sua alta sensibilidade que permite a detecção de DNA bacteriano em amostras com pequeno número de células bacterianas^{32, 44}.

Muitos estudos são realizados com o objetivo de avaliar a presença de *H. pylori* na cavidade bucal, entretanto, não há consenso em relação ao papel da cavidade

bucal na transmissão do patógeno, reinfecção do estômago e se constitui, de fato, reservatório para a bactéria.

3- MÉTODOS:

Foram selecionados 43 pacientes do ambulatório de Gastroenterologia Clínica (Grupo do Estômago e Duodeno) do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no Hospital das Clínicas, no período compreendido entre abril e dezembro de 2007.

Os indivíduos incluídos nesse estudo apresentavam dispepsia funcional (DF), definida como presença de sintomas na região gastroduodenal, na ausência de doenças orgânicas, sistêmicas ou metabólicas. A realização de exame de endoscopia digestiva alta (EDA) foi essencial para a identificação apropriada da dispepsia funcional. O comitê Roma III definiu a dispepsia funcional em dois tipos: síndrome da dor epigástrica (SDE) e síndrome pós-prandial⁴⁹. Os participantes do presente estudo apresentavam dispepsia funcional do tipo síndrome da dor epigástrica, em que epigástrio refere-se à região entre o umbigo e porção inferior do esterno, marcada pelas linhas claviculares⁵⁰.

Os pacientes passavam por consulta no Ambulatório do Estômago, quando era realizada a história clínica, o exame físico e a solicitação de exames complementares para investigar a doença, conforme ilustrado no fluxograma (Fig. 1).

Fig.1- Fases Clínicas do Estudo

Rotina do Ambulatório do Estômago

Consulta no Ambulatório de Estômago: anamnese, exame clínico e solicitação de exames complementares.

EDA e exames: os participantes foram submetidos a EDA com pesquisa de *H. pylori* através de urease, teste respiratório e/ou sorologia.

Retorno ao ambulatório: No dia do retorno, os pacientes eram encaminhados à Divisão de Odontologia para exame clínico odontológico e coleta das amostras da cavidade bucal.

Coleta: Amostras de saliva, placa supra-gengival, placa sub-gengival e placa de dorso de língua eram coletadas.

Tratamento para o Estômago: após a coleta de material, os participantes eram reencaminhados ao ambulatório de Gastroenterologia para o tratamento proposto pelo médico Gastroenterologista.

Para a seleção dos participantes foram considerados como fatores de inclusão: indivíduos com idade mínima de 18 anos e máxima de 85 anos de ambos os sexos, que apresentaram estômago normal ou com gastrite enantemática, evidenciados por endoscopia digestiva alta.

Foram considerados como fatores de exclusão:

- indivíduos edêntulos;

- portadores de úlceras pépticas complicadas por hemorragia (Forrest I, Forrest II);
- que tivessem utilizando antiinflamatórios não-hormonais nas quatro semanas que antecederem o estudo, assim como antibióticos ou quimioterápicos;
- mulheres grávidas ou amamentando;
- indivíduos que apresentassem estenose do canal pilórico; esôfago de Barrett; doenças benignas obstrutivas do esôfago; neoplasias malignas do esôfago; ressecções gástricas ou vagotomia prévia;
- doenças consuptivas e insuficiência renal;
- insuficiência hepática aguda ou crônica;
- presença de doenças crônicas, cuja sintomatologia pudesse propiciar viés na análise, como diabetes melitos descompensado, neuropatias, tiroidopatias descompensadas, moléstias infecciosas crônicas sob tratamento prolongado, doenças pulmonares obstrutivas crônicas sob descompensação, miocardiopatias dilatadas ou hipertróficas descompensadas;
- e, pacientes com distúrbios psiquiátricos que inviabilizassem o acompanhamento ambulatorial.

Os pacientes selecionados concordaram em participar do estudo, através de consentimento livre e esclarecido informado por escrito (Anexo A). O presente estudo foi aprovado pela comissão de Ética do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo B) e pela comissão de ética para análise de projetos de pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade

de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq), protocolo nº 0036/07 (Anexo C).

Deteção de *H. pylori* no estômago

A presença da bactéria no estômago foi determinada através dos testes: urease por biópsia do estômago, respiratório e sorológico para *H. pylori*.

Coleta das amostras do Estômago

Os pacientes, em jejum de 8 horas, após sedação foram submetidos à EDA. Os canais do Videoendoscópio (Olympus GIF 100-130 V, Tokio, Japão) eram lavados e passavam por desinfecção química de alto nível com glutaraldeído a 2% por 30 minutos após cada uso. Biópsias da mucosa do corpo e do antro do estômago eram extraídas para pesquisa de *H. pylori* (teste da urease).

Teste de Urease

Para o teste de urease (RUT), os fragmentos excisionados foram inoculados em tubos contendo 100mL de solução preparada no Laboratório de Provas Funcionais do Aparelho Digestivo do Hospital das Clínicas composta por: 0,010g de “bacto-yeast extract”, 0,0091g KH_2PO_4 , 0,0095g Na_2HPO_4 , 2g uréia e 15 gotas de fenol vermelho a 0,5%. A solução teve o pH ajustado para 6,9, foi esterilizada por processo de filtração e dividida em alíquotas de 0,5 mL que foram acondicionadas à -20°C até o uso. A presença de urease (enzima produzida em abundância por *Helicobacter pylori*) nos fragmentos coletados leva a um aumento do pH, alterando a coloração da solução de amarelo para um rosa claro e indicando assim, a presença de *H. pylori*,

responsável pela conversão de uréia em amônia¹⁸. O resultado era verificado em até 7 dias.

Teste Respiratório para *H. pylori*

O teste respiratório (UBT- Urea Breath Test) é baseado em hidrólise enzimática no estômago através de urease. Este teste foi realizado com o paciente em jejum de 6 horas, sem que tivesse feito uso de antibióticos durante as 8 semanas que antecederem a data do exame, assim como uso de inibidores de bomba de prótons (IBP) durante os 10 dias que antecederem o exame. Bochecho com peróxido de hidrogênio 10 vol foi realizado para assepsia bucal anteriormente à ingestão de uma cápsula contendo 1 μCi de ^{14}C -uréia com 20 mL de água. Três minutos após, o paciente ingeriu mais 20 mL de água e foi observado durante 10 minutos, permanecendo em repouso (sentado, sem esforço) para então expirar através de um tubo de silicone acoplado a um sistema intermediário constituído por Erlenmayer, e bquer com 2,5 mL de solução de hidróxido de benzetônio, que na presença de timolftaleína tem a coloração azul. O participante do estudo soprava até que a solução se tornasse incolor (Fig. 2). A viragem da cor para incolor significava que 1nM de CO_2 ficou dissolvido no líquido. Foram acrescentados 10 mL de líquido de cintilação às amostras obtidas (Tolueno 2:1 Triton X-100, PPO 5,5g/L e POPOP 0,2g/L). A contagem foi feita em contador β em 1 minuto⁴⁸. Contagem igual ou inferior a 562 cpm (contagem por minuto) indicou amostra negativa para *H. pylori*. Contagens entre 562 e 1.000 cpm eram duvidosas e acima de 1.000 cpm positivas.

Na presença da infecção por esse microorganismo, a uréia sofre quebra e é convertida em amônia e dióxido de carbono (CO_2). O CO_2 marcado exalado pelo

paciente foi medido por radioatividade. Outras bactérias que produzem urease não conseguem sobreviver na mucosa gástrica, o que faz com que o carbono marcado expirado pelo paciente indique a infecção por *H. pylori*.

Sorologia para *H. pylori*

A sorologia para *H. pylori* foi realizada em pacientes que nunca haviam feito tratamento para a *H. pylori*, devido ao fato de que este ensaio não sofre interferência de antibióticos ou inibidores de secreção ácida, pois a concentração do anticorpo anti-*H. pylori* demora a diminuir e o paciente ainda pode ter anticorpo positivo um ano após ter erradicado o *H. pylori*.

Para a sorologia foi empregado teste rápido qualitativo para detecção de anticorpo IgG específico para *H. pylori*. Foi coletado 20 µL de sangue total de ponta de dedo após assepsia da região. A amostra foi colocada na cavidade da placa do teste (kit comercial de ELISA) e diluída em 150 µL de diluente. A leitura foi visual após 10 minutos de incubação e o método foi imunocromatográfico⁴⁸.

Detecção de *H. pylori* no meio bucal

Os pacientes foram encaminhados à Divisão de Odontologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para exame clínico odontológico e coleta de amostras da cavidade bucal.

Coleta das amostras da cavidade bucal

O material a ser pesquisado foi removido de vários sítios: biofilme dentário supra-gengival (placa dentária supra-gengival), biofilme sub-gengival (placa dentária

sub-gengival), saliva e material de dorso de língua. Amostras de biofilme supra-gengival foram coletadas de dois dentes diferentes para cada indivíduo, escolhidos aleatoriamente na cavidade bucal, com uma cureta periodontal estéril do tipo Gracey 7-8 (Fig. 3-1 e 3-2). “Swabs” estéreis foram utilizados para coletar saliva do assoalho de língua e mucosa jugal (Fig. 3-3) e biofilme do terço posterior de dorso da língua (Fig. 3-4). Indivíduos que apresentavam bolsa periodontal com profundidade de sondagem maior ou igual a 5mm, tiveram amostras de biofilme sub-gengival extraídas com um cone de papel estéril posicionado na bolsa periodontal por 20 segundos (Fig. 3-5), após remoção prévia de biofilme supra-gengival.

As amostras colhidas da cavidade bucal foram imediatamente inoculadas em tubos contendo solução para o teste de urease (Fig. 3-6) e encaminhadas para extração de DNA genômico e reação de polimerase em cadeia, para detecção de *H. pylori* nas amostras bucais.

Extração por sal de DNA das amostras da cavidade bucal

As amostras bucais em tubos contendo solução para teste de urease foram observadas por 7 dias no laboratório de provas funcionais do Hospital das Clínicas. As amostras com resultado positivo, de coloração rosa, foram transferidas para eppendorfs de 1,5mL e centrifugadas (12.000 X g) por 25 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e o “botão” ressuspensionado em: 50mmol/L EDTA (pH 8), 0,1 mol/L NaCl (correspondente a 300µl de tampão de extração para cada eppendorf), 0,1% SDS(30µl) e 0,1mg/mL de proteinase K(15µL). O botão ressuspensionado foi encubado a 37°C por 24 horas¹⁸ (Fig. 4).

Após 24 horas adicionou-se 6 mol/L NaCl seguido por um processo de centrifugação por 5 minutos das amostras, de transferência do sobrenadante a novos eppendorfs e no acréscimo do dobro do volume de álcool absoluto refrigerado (1022µL). Os eppendorfs foram conservados a -80°C por mais 24 horas (Fig. 5).

A última etapa da extração (Fig. 6) iniciou-se com a centrifugação das amostras por 20 minutos e lavagem com álcool etílico 70% (1mL) por três vezes e com álcool absoluto uma vez. O sobrenadante foi desprezado e após a secagem do botão, o mesmo foi ressuspenso em 30µL de água destilada estéril e conservado a 4°C até ser utilizado.

Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e Genotipagem

A amplificação do material genético obtido em termocicladora (2400 GeneAmp PCR system, PerkinElmer, Branchburg, NJ, USA) objetivou a correta identificação do genótipo bacteriano através de processo de PCR. DNA genômico foi usado como molde em reação com volume de 25µL contendo 20mmol/L de TrisHCl (pH 8,4), 50mmol/L KCl, 1,5 mmol/L de MgCl₂, 50pmol de cada primer, 200µmol/L de cada dNTP e 2,0U Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil).

Os jogos de oligonucleotídeos P1/P2³² que amplificam a região gênica que codifica o antígeno presente em todas as cepas de *Helicobacter pylori* e A/B que amplificam o gene da urease⁵¹ foram empregados para indicar a presença da bactéria nas amostras coletadas da cavidade bucal antes de realizar genotipagem. Características dos primers espécie-específicos utilizados neste estudo estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos utilizadas para detecção de *H. pylori*

Região	Primer	Sequências	Tamanho de produto de PCR (bp)	Localização	Número de acesso ao GenBank
Ag	P1	5'-TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC-3'	298	220-242	M55507
	P2	5'-CGTGCTGGGCATACTTCACCATG-3'			M55507
Urease	A	5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3'	295	1291-1317	M60398
	B	5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3'			M60398

As condições de amplificação (tabela 2) para P1/P2 e para A/B foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 93°C por 1 minuto, temperatura de anelamento a 57°C por 2 minutos e extensão por 2 minutos a 70°C . A extensão final foi realizada a 70°C por 10 minutos¹⁸.

Tabela 2. Condições de amplificação de PCR para cada segmento estudado.

Região	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
Ag	94°C 5'	93 °C 1' 40cycl.	57 °C 2'	70 °C 2'	70 °C 10'
Urease	94°C 5'	93 °C 1' 40cycl.	57 °C 2'	70 °C 2'	70 °C 10'
<i>vacA</i>	94 °C 5'	94 °C 30'' 27cycl.	53 °C 30''	72 °C 30''	72 °C 7'
<i>cagA2</i>	94 °C 5'	94 °C 30'' 27cycl.	53 °C 30''	72 °C 30''	72 °C 7'
<i>cagA1</i>	94 °C 5'	94 °C 30'' 40cycl.	52°C 30''	72 °C 30''	72 °C 7'

Outros oligonucleotídeos foram utilizados para amplificação de regiões da sequência sinal “s” (s1a, s1b e s2) e da sequência do meio “m” (m1,m2) da citotoxina *vacA* e do gene *cagA* (*cagA1* e *cagA2*).

Os primers utilizados para amplificar os segmentos da citotoxina *vacA* tanto da região de sequência sinal (s), quanto da sequência do meio (m), estão caracterizados na tabela 3.

Tabela 3. Sequências de oligonucleotídeos para *vacA*.

Região	Primer	Sequências	Tamanho de produto de PCR (bp)	Localização	Número de acesso ao GenBank
m1	VA3-F VA3-R	5´-GGTCAAAATGCGGTCATGG-3´ 5´-CCATTGGTACCTGTAGAAAC-3´	290	2741-2759 3011-3030	U05676 U05676
m2	VA4-F VA4-R	5´-GGAGCCCCAGGAAACATTG-3 5´-CATAACTAGCGCCTTGACAC-3	352	976-994 1309-1327	U05677 U05677
S1a	SS1-F VA1-R	5´-GTCAGCATCACACCGCAAC-3 5´-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3´	190	866-884 1037-1055	U05676 U05676
s1b	SS3-F VA1-R	5´-AGCGCCATACCGCAAGAG-3 5´-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3´	187	1037-1055	* U05676
s2	SS2-F VA1-R	5´-GCTAACACGCCAAATGATCC-3´ 5´-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3´	199	433-452 1037-1055	U29401 U05676

* - Segundo Atherton 1995²⁰ não há coordenadas publicadas para cepas deste tipo.

A amplificação para *vacA* e *cagA2* (primers seqüenciados na tabela 4) seguiu os seguintes passos (tabela 2): desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos seguida de 27 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a uma temperatura de 53°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos seguida de extensão final a 72°C por 7 minutos¹⁸.

Tabela 4. Sequências de oligonucleotídeos para *cagA2*.

Região	Primer	Sequências	Tamanho de produto de PCR (bp)	Localização	Número de acesso ao GenBank
<i>cagA2</i>	CAG-1 CAG-2	5´-AGACAACCTTGAGCGAGAAAG3´ 5´-TATTGGGATTCTTGGAGGCG3´	320	1764-1783 2064-2083	X70039 X70039

Além do *cagA2*, um outro segmento do gene *cagA* foi pesquisado neste estudo. O seguimento *cagA1*, que fica próximo à região promotora presente em quase todos isolados de *H. pylori* e cujos primers utilizados estão com as características descritas na tabela 5.

Tabela 5. Sequências de oligonucleotídeos para *cagA1*

Região	Primer	Sequências	Tamanho de produto de PCR (bp)	Localização	Número de acesso ao GenBank
cagA1	CagA-F2 CagA-R2	5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGA-3' 5'-CTGCAAAAGATTGTTGGCAGA-3'	349	157-176 505-484	AF001357 AF001357

As condições de amplificação para o *cagA1* foram realizadas através de 40 ciclos com temperatura de anelamento a 52°C (tabela 2).

DNA de *H. pylori* de perfil genético já determinado em estudos anteriores^{18, 24} foi utilizado como controle positivo para as PCRs de cada gene. Controles negativos consistiam nos reagentes das PCRs sem DNA genômico.

Os produtos de PCR foram colocados em gel de agarose 2% onde a eletroforese foi realizada para a separação cromossômica. Os fragmentos cromossômicos da amostra do microorganismo foram separados de acordo com o tamanho e visualizados através de coloração por brometo de etídio¹⁸.

Parâmetro-padrão de positividade do *H. pylori*

Considerou-se como infecção no estômago pelo *H. pylori* quando, além do teste de urease, o teste respiratório e/ou o teste de sorologia também fossem positivos (Anexo D).

Considerou-se a presença da bactéria na cavidade bucal quando o produto de PCR tivesse o tamanho esperado para cada gene amplificado.

Fig.2 - Teste respiratório para diagnóstico de *H. pylori* no estômago

Fig.3 — Coleta das amostras da cavidade bucal

1-Coleta de biofilme supra -gingival de dente anterior. 2 -Biofilme supra -gingival em cureta. 3 - Coleta de saliva de assoalho lingual com swab. 4 - Swab em dorso de língua. 5 - Coleta de biofilme sub-gingival de bolsa periodontal com cone de papel. 6 - Introdução de swab com raspado de dorso de língua em tubo contendo solução para teste de urease.

Fig.4 – Extração de DNA por sal: Primeira etapa. **Fig.5** – Extração de DNA por sal: Segunda etapa.

Fig.6 – Extração de DNA por sal: Terceira etapa.

4- RESULTADOS:

O grupo estudado foi constituído por 43 pacientes com dispepsia funcional do tipo síndrome da dor epigástrica. A média de idade dos participantes foi de 46,9 anos, sendo o grupo constituído por 26 mulheres (60,4%) (Anexo D).

A amostra totalizou 144 espécimes da cavidade bucal, sendo: 43 de saliva, 43 de raspado de dorso de língua, 43 de biofilme dentário supra-gengival e 15 de biofilme de bolsa periodontal (sub-gengival) e 43 espécimes de fragmentos de mucosa gástrica.

H. pylori foi encontrado no estômago de 30 (69,7%) pacientes (Tabela 6).

Das amostras da cavidade bucal, 80 (55,5%) obtiveram resultados positivos para o teste de urease (Anexo D), porém, DNA de *H. pylori* não foi detectado em nenhuma amostra da cavidade bucal através de PCR (Fig. 7 e 8).

Tab. 6 - Distribuição de *H. pylori* no estômago e nos sítios da cavidade bucal

	Estômago	Cavidade Bucal			
		Língua	Saliva	Biof. Supra-Gengival	Biof. Sub-Gengival
Positivo	30 (69,7%)	0	0	0	0
Negativo	13 (30,3%)	43 (100%)	43 (100%)	43 (100%)	15 (100%)
Total	43 (100%)	43 (100%)	43 (100%)	43 (100%)	15 (100%)

Os resultados negativos para as amostras bucais foram confirmados utilizando-se primers para o gene da urease.

Reações com primers para genotipagem *cagA* e *vacA* foram realizadas, não sendo amplificada nenhuma amostra.

O cálculo da amostragem foi realizado e se mostrou suficiente. Devido à falta de variabilidade nos resultados encontrados na cavidade bucal não houve necessidade em se realizar análise estatística dos grupos envolvidos. Não houve diferença em relação à presença de *H. pylori* na cavidade bucal entre o grupo de pacientes com e o grupo sem *H. pylori* no estômago.

Fig. 7— Resultado da amplificação de amostras bucais utilizando Primers P1/P2

Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. M= Marcador. C= Controles positivos de biópsias gástricas. 1 a 5= Amostras bucais não amplificadas com os primers P1/P2.

Fig. 8— Resultado de amplificação de amostras bucais utilizando primers P1/P2.

Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. M= Marcador de DNA. 1 a 10 = Smear de DNA genômico de amostras bucais.

5- DISCUSSÃO:

Todos os pacientes apresentaram sintomas dispépticos, porém, nem todos estavam infectados, resultado que está de acordo com a literatura⁴⁹. Muitos indivíduos assintomáticos podem apresentar infecção no estômago, assim como, indivíduos com dores na região epigástrica podem não ser hospedeiros para *H. pylori*¹⁶. A erradicação da bactéria, indicada em muitos casos, devido ao fato do *H. pylori* ser fator de risco de câncer, não implica em remissão dos sintomas⁴⁹.

A diferença de prevalência do *H. pylori* no estômago (69,7%) e na cavidade bucal (0%) pode ser explicada devido à habilidade do *H. pylori* conseguir sobreviver no estômago em razão de produzir grandes quantidades de urease⁵². O ambiente bucal é bastante diferente do estômago, habitat de escolha do patógeno⁶. O crescimento de *H. pylori* na cavidade bucal é influenciado por diversos fatores como: temperatura, pH, potencial de redução de oxidação, oferta de nutrientes, fluxo salivar e substâncias antimicrobianas¹³.

Muitos estudos^{7, 8, 9, 10, 12, 20, 36, 37, 38, 39} têm sido realizados com o intuito de avaliar o papel da cavidade bucal na transmissão do *H. pylori*³⁶ e reinfecção após a erradicação do patógeno no estômago^{10, 36}. Porém, ainda não há consenso em relação à cavidade bucal ser reservatório para a bactéria.

Pesquisadores que encontraram alta prevalência de *H. pylori* na cavidade bucal⁵³ consideram este meio como reservatório da bactéria fora da ambiente gástrico humano.

Gebara e colaboradores detectaram, após a tripla terapia, DNA da bactéria em 10% das amostras do estômago e em 60% das amostras da cavidade bucal¹⁰, mostrando que a antibioticoterapia não foi tão eficiente contra o patógeno no meio bucal.

Outra corrente de pesquisadores^{12, 39, 42, 43} que identificaram prevalência baixa da bactéria ou não isolaram o patógeno em amostras bucais, não consideram o meio bucal como reservatório de *H. pylori* e defendem uma passagem transitória da bactéria pela boca.

Achados do presente estudo reforçam a teoria de que a bactéria não se constitui como flora permanente da cavidade bucal. Resultados semelhantes foram encontrados por Olivier e colaboradores em um estudo que envolveu amostras de saliva e placa dentária de 79 indivíduos saudáveis sul-africanos. DNA de *H. pylori* não foi identificado através de PCR, nested-PCR e heminesned-PCR em nenhum espécime¹².

Essa discrepância de resultados encontrada em estudos envolvendo *H. pylori* e cavidade bucal pode ser atribuída a diferenças nas populações estudadas, procedimentos de coleta das amostras e metodologias^{12, 13}.

A detecção do patógeno no estômago é frequentemente realizada através de teste da urease, exame histológico, cultura e teste respiratório com ¹³C ou ¹⁴C⁴⁸.

Pesquisas de *H. pylori* na cavidade bucal já foram realizadas utilizando metodologias como: cultura^{36, 38, 54, 55}, teste de urease^{37, 47}, histologia⁴⁴, PCR^{9, 12, 32, 35, 43, 44, 46, 52, 56, 57}, Nested-PCR^{8, 12, 33, 36} e real-time PCR⁴².

Trabalhos que fizeram uso do teste de urease para detectar o patógeno na placa dentária obtiveram alta prevalência de *H. pylori*, como Anand e colaboradores que

obtiveram prevalência de *H. pylori* na placa dentária equivalente a 89,2%⁴⁷ e Özdemir e colaboradores que encontraram prevalência de 79% no mesmo sítio³⁷.

No presente estudo, a detecção da bactéria no estômago foi realizada através de teste da urease, respiratório e sorológico. As amostras da cavidade bucal também foram incluídas em tubos contendo solução para o teste de urease. O resultado da maioria foi positivo, porém ao realizar-se PCR, nenhum resultado se confirmou.

A cavidade bucal abriga um largo espectro de microorganismos, incluindo bactérias produtoras de urease como *Streptococcus vestibularis* e *Actinomyces viscosus*³⁷, diferentemente do estômago, em que apenas o *H. pylori* consegue colonizar, tornando precipitado concluir que resultados positivos para teste de urease na cavidade bucal impliquem em presença de *H. pylori*.

Outro método empregado para a pesquisa de *H. pylori* é o de cultura. Porém, a obtenção de cultura de *H. pylori* proveniente de amostras da cavidade bucal é um processo difícil⁶. Alguns investigadores dizem que o *H. pylori* pode existir em um estado dormente, como um esporo, em forma viável, porém não cultivável¹⁶.

Sob condições adversas ou escassez de nutrientes, o *H. pylori* sofreria uma mudança de um bacilo em espiral nadante para um coco inativo, explicando a dificuldade em se isolar *H. pylori* da cavidade bucal^{11, 38}. A bactéria é frágil fora do ambiente gástrico e pode ser morta rapidamente pela presença de oxigênio e até mesmo pela luz¹⁶.

O uso da técnica de PCR para a detecção da bactéria na cavidade bucal é bem estabelecido devido a sua grande sensibilidade comparada a outras metodologias como cultura que pode subestimar a prevalência de *H. pylori* nas amostras clínicas¹³.

Há estudos que tiveram resultados negativos para a presença de *H. pylori*, utilizando metodologia de cultura⁵², enquanto PCRs das mesmas amostras apresentaram resultados positivos⁵².

Através de PCR, o DNA do microorganismo pode ser detectado na amostra, mesmo quando há pouca quantidade de células^{32,43}, o que não necessariamente implica que há vitalidade celular.

Nas PCRs efetuadas no estudo, 9 jogos de iniciadores foram utilizados. As reações com iniciadores P1/P2 são baseadas na sequência de DNA de uma proteína espécie-específica presente em todas as cepas de *H. pylori* testadas por O'Toole e colaboradores⁵⁸ e que não hibridizou com o DNA de outras bactérias entéricas testadas, evidenciando a eficácia dos iniciadores para uma rápida, sensível e específica detecção de *H. pylori* em espécimes gástricos. O uso dos mesmos iniciadores em saliva foi reportado por Hammar e colaboradores que detectou a bactéria na saliva em 9 de 19 pacientes examinados³², validando o uso dessas sondas para amostras da cavidade bucal.

Um outro jogo de iniciadores, específico para a espécie, com uma sequência alvo para o gene da urease^{51, 59} foi utilizado e confirmaram-se os resultados negativos.

O estudo do genótipo da bactéria é importante para conhecer-se a patogênese e identificar cepas de maior virulência. *H. pylori* de cepas *cagA* são de maior virulência, estando relacionadas com uma maior prevalência de úlcera e adenocarcinoma, assim como cepas *vacA*s1¹⁸.

Três genótipos de maior virulência foram pesquisados no estudo. Para o genótipo *vacA*, 5 jogos de iniciadores foram utilizados com sequências para as

regiões m1, m2, s1a, s1b e s2. Além destas regiões, iniciadores para *cagA2* e *cagA1* foram empregados. Diversos trabalhos identificaram cepas de *H. pylori* com tais genótipos, utilizando-se as mesmas seqüências alvo^{18, 24}. Portanto, a eleição dos iniciadores utilizados foi baseada em evidências e critérios científicos, sendo adequada para elucidar os objetivos do presente estudo.

Siavoshi e colaboradores, através de microscopia e PCR, observaram a presença de *H. pylori* em vacúolos de lêvedos do gênero *Candida* de 18 amostras da cavidade bucal e a cepa *cagA* foi identificada em 83% das amostras da bactéria⁵⁶. A bactéria foi identificada apenas no interior de lêvedos. Comparados ao *H. pylori*, lêvedos são mais tolerantes a adversidades ambientais como temperaturas elevadas e presença de antibióticos, por exemplo. Lêvedo de *Candida* é membro conhecido da microflora bucal, do estômago, trato gastrointestinal e genitália e pode ser considerado como agente primário para a transmissão de *H. pylori* para humanos, já que a aquisição de lêvedos acontece durante o parto ou logo após o nascimento em contato com alimentos contaminados⁵⁶.

O ambiente bucal por diferir do ambiente gástrico em fatores como pH, teor de oxigênio e presença de biofilme com inúmeras espécies colonizadoras pode constituir ambiente inóspito para a espécie. Alguns autores descreveram microorganismos colonizadores do biofilme dentário que inibem o crescimento de *H. pylori*^{11, 41}, o que causaria uma alteração morfológica na bactéria que assumiria uma forma cocóide¹¹. Colônias de *H. pylori* cultivadas com sobrenadante de *Streptococcus mutans* e *Prevotella intermedia* tiveram o crescimento reduzido, comparadas a colônias cultivadas sem a inoculação de outros microorganismos, com

o número de células viáveis (unidades formadoras de colônias) diminuído e o número de células cocóides aumentado¹¹.

No entanto, Okuda e colaboradores verificaram uma relação de coagregação entre *H. pylori* e *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*³⁹, o que facilitaria a permanência de *H. pylori* na cavidade bucal.

Para alguns pesquisadores, *H. pylori* é descrito como microorganismo constituinte do biofilme dentário de colonização tardia, coagregado a outras bactérias bucais¹¹. O patógeno foi cultivado de placa supra-gengival³⁶ e detectado através de PCR em diversos estudos^{9, 13, 43, 53} onde desde baixas prevalências (2,4%)⁹ até índices elevados (82%)¹³ foram estabelecidos.

Podem-se associar diferenças nas populações estudadas a essa discrepância de resultados encontrados em estudos envolvendo *H. pylori* na cavidade bucal. No presente estudo o grupo estudado constituiu-se por indivíduos com dispepsia funcional do tipo síndrome da dor epigástrica e não se detectou o patógeno em nenhuma amostra bucal.

Gebara e colaboradores encontraram *H. pylori* na cavidade bucal dos pacientes estudados, com prevalência de 10% em amostras de saliva, 20% em placa supra-gengival e 26,6% em placa sub-gengival. Os grupos estudados foram constituídos por indivíduos com doenças periodontais (gingivite e periodontite) e não foram avaliados quanto à presença de úlceras pépticas, dispepsia funcional ou doença do refluxo gastroesofágica¹⁰. Souto e Colombo, detectaram *H. pylori* em 20% das amostras de saliva e 33,3% das amostras de placa sub-gengival³⁵. A população foi estudada de acordo com a presença de periodonto normal ou doença periodontal. Os dois trabalhos descritos foram realizados no Brasil. Entretanto, apesar da população

estudada no presente estudo também ser constituída por brasileiros, o objetivo dos dois estudos descritos foi de relacionar doença periodontal e *H. pylori* na cavidade bucal, inclusive após a antibioticoterapia¹⁰.

Trabalhos que acessaram *H. pylori* na cavidade bucal de japoneses encontraram relação entre detecção de *H. pylori* e presença de bolsas periodontais³⁶.

Miyabayashi e colaboradores encontraram *H. pylori* em 38,3% das amostras de placa supra-gengival e em 23,4% de saliva⁶⁰. A população japonesa apresenta um índice de 55% de infecção no estômago por *H. pylori*⁶¹, apresenta alta prevalência de câncer gástrico⁶²; portanto, maiores taxas encontradas na cavidade bucal em estudos com japoneses podem estar associados a estas particularidades da população.

Diferenças no método de coleta das amostras também podem gerar resultados assimilares. Song e colaboradores encontraram maior prevalência de *H. pylori* em placa supra-gengival extraída de molares (82%), seguida de pré-molares (64%) e incisivos (59%)¹³. A cavidade bucal constitui-se de microambientes com diferentes concentrações de oxigênio. Biofilmes aderidos a molares tem menor teor de oxigênio, o que explicaria os resultados encontrados por Song e colaboradores¹³.

Ao elegerem-se dentes posteriores para a coleta de placa supra-gengival, ambiente com menor concentração de oxigênio, a possibilidade de detectar-se *H. pylori* poderia ser maior, já que o patógeno é microaerofílico. No presente estudo, a coleta de placa supra-gengival foi realizada com cureta periodontal extraída de dois dentes escolhidos aleatoriamente. A não padronização de dentes específicos para a coleta deveu-se aos fatos de que nem todos indivíduos apresentavam dentes posteriores e que a maior quantidade de material possível era coletada, portanto elegiam-se os dentes com mais placa. Não houve diferença nos resultados obtidos em

pacientes que tiveram material coletado de molares e indivíduos que tiveram a placa supra-gengival extraída de pré-molares e incisivos.

Asikainen e colaboradores não detectaram *H. pylori* em placa sub-gengival de 1000 indivíduos estudados⁴⁶. O método de coleta, através de cone de papel foi a mesma realizada no presente estudo. Os autores discutiram o fato de que o *H. pylori* pode estar aderido ao epitélio da bolsa; portanto, o procedimento de extração do material através de cone de papel poderia coletar menor número de células bacterianas se comparado com o uso de cureta⁴⁶. Entretanto, outros estudos utilizaram-se do cone de papel para obter material da bolsa periodontal e realizar a pesquisa do *H. pylori* e detectaram a bactéria⁵³, validando o procedimento para este fim.

O método de coleta de saliva também difere. Há pesquisadores que coletaram saliva total não estimulada⁵³, que abrange um maior número de microorganismos, outros saliva estimulada³⁴ e o uso de swab como instrumento também foi reportado³. Allaker e colaboradores encontraram *H. pylori* na cavidade bucal de crianças infectadas no estômago em uma prevalência de 68%³, utilizando swabs estéreis, resultado que também valida o procedimento utilizado no presente estudo.

Quatro sítios diferentes da cavidade bucal foram estudados. Não foi possível detectar *H. pylori* em nenhuma amostra de raspado de dorso de língua. Esse resultado diverge da prevalência encontrada no mesmo sítio por Adler e colaboradores, que incluíram uma população com patologias na língua. Os autores observaram relação entre presença de *H. pylori* na cavidade bucal dos participantes que apresentavam câncer, hiperplasia e outras doenças na língua⁴⁴. Dos indivíduos que participaram do presente estudo, nenhum apresentava tais patologias na língua, resultados que

reforçam a idéia de que o *H. pylori* permaneceria na cavidade bucal apenas em situações adversas, como inflamações e patologias. Outro trabalho realizado no Japão detectou *H. pylori* na cavidade bucal exclusivamente na superfície de câncer bucal¹¹.

Em alguns estudos foi possível detectar *H. pylori* em indivíduos com periodontite, sugerindo que a presença de bolsa periodontal e inflamação favoreceriam a colonização do *H. pylori*^{10, 35, 36, 53}.

A microbiota da bolsa periodontal foi descrita pelos autores como diversa e complexa, e a presença de inflamação pode prover o ambiente com nutrientes tornando-o apropriado para o estabelecimento de *H. pylori*. Bactérias semelhantes ao *H. pylori*, como *Campylobacter spp*, em bolsas periodontais aumentaram em frequência e número. Os autores sugeriram que alguns microorganismos como *Fusobacterium spp* estabeleceriam uma relação de coagregação com *H. pylori*, por produzirem metabólitos que são utilizados por outras espécies. Se a colonização por *Fusobacterium* favorece o estabelecimento de *H. pylori*, para os autores, nas bolsas periodontais, a bolsa pode ser provida com grande quantidade de urease, selecionando o meio para bactéria produtoras de urease³⁹.

Todos os participantes passaram por exame clínico odontológico e registro da profundidade de sondagem, onde 15 apresentaram periodontite com bolsas periodontais de profundidade entre 5 e 8mm (Anexo D), sítios em que não foi possível detectar DNA genômico da bactéria.

Apesar de existir associação entre bactérias patogênicas causadoras de doença periodontal e *H. pylori*, há estudos que atestam que componentes salivares comprometeriam esta associação³⁹.

Pesquisas realizadas na Polônia encontraram alta prevalência do patógeno em bolsas periodontais de pacientes dispépticos (48,3%)⁵⁴ e de pacientes com úlcera péptica (50%)⁵⁵, inclusive após a erradicação da bactéria no estômago (23,8%)⁵⁵. Prevalência divergente das encontrada no presente estudo para bolsas periodontais podem ser explicadas pelo emprego de metodologia distinta, pois esses trabalhos utilizaram a cultura como método para a detecção de *H. pylori* na cavidade bucal, enquanto utilizou-se PCR no protocolo atual.

Não foi detectado DNA bacteriano nas amostras de saliva dos indivíduos que participaram do protocolo, indicando que a cavidade bucal não contribuiria para o processo de transmissão do patógeno através da passagem da bactéria de um indivíduo a outro via saliva. A bactéria, possivelmente, passa pela cavidade bucal, porém, os resultados encontrados apontam pela não permanência da bactéria na saliva dos indivíduos dispépticos.

Um estudo⁶³ em pacientes hospitalizados detectaram *H. pylori* através de PCR em vômito. Resultados negativos para amostras da cavidade bucal indicaram que não há uma colonização prolongada de *H. pylori* na população estudada, o que leva a pensar que a boca não parece contribuir para a transmissão do patógeno¹².

O papel do refluxo na presença de *H. pylori* na cavidade bucal ainda não é bem estabelecido, mas pode ser responsável por uma transmissão gástrica-oral do patógeno assim como o endoscópio durante a EDA⁶⁴. A população investigada foi constituída por indivíduos com dispepsia funcional do tipo síndrome da dor epigástrica. Não foi acessado, nem solicitado exames como pHmetria para a verificação de doença do refluxo gastroesofágico; portanto, não há dados sobre episódios de refluxo e relação com o horário de coleta de saliva.

No presente estudo, *H. pylori* não foi detectado na cavidade bucal dos pacientes dispépticos infectados, o que aponta por uma passagem transitória da bactéria por este meio relacionada, talvez, a episódios de refluxo ou adversidades na cavidade bucal.

6- CONCLUSÕES:

Conclui-se após a realização do estudo:

6.1 - A cavidade bucal de pacientes com dispepsia funcional não pode ser considerada reservatório para *H. pylori*.

6.2 – A saliva, microbiota de dorso de língua, biofilme supra-gengival e biofilme sub-gengival de pacientes com e sem *H. pylori* no estômago não abrigam a bactéria.

6.3 – Não foi possível caracterizar cepas de *H. pylori* em amostras da cavidade bucal dos pacientes dispépticos funcionais que participaram do estudo.

7- ANEXOS:

Anexo A

Anexo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO.:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Pesquisa da cepa de *Helicobacter pylori* na cavidade oral.**

PESQUISADOR: Vanessa de Paula e Silva Rossi Aguiar

CARGO/FUNÇÃO: Dentista INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRO – SP: 76352

UNIDADE DO HCFMUSP: Ambulatório de Estômago da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Departamento Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☒ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 (doze) meses.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa

Você está sendo convidado a participar de um estudo por apresentar gastrite ou sintomas semelhantes a má-digestão (dores e/ou desconforto no estômago). Nesta pesquisa iremos avaliar se você possui uma bactéria que é associada a sua doença no estômago que se chama *Helicobacter pylori* e também avaliaremos se ela se encontra na boca ou não.

Para participar deste estudo você irá primeiramente conversar com o seu médico que irá perguntar sobre a sua saúde e de sua família.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais

Se aceitar participar desta pesquisa você irá fazer alguns exames para verificar se há uma bactéria associada a sua doença. Um desses exames é a endoscopia digestiva alta, onde você tomará um remédio que o deixará sonolento para o médico introduzir um tubo com uma pequena câmera de vídeo na ponta. Através das imagens da câmera o médico irá avaliar as lesões do seu estômago, esôfago e duodeno. Durante o exame de endoscopia, serão retirados dois pequenos fragmentos da superfície do seu estômago (biópsia). A retirada desses dois pequenos fragmentos não irá doer e têm pouca chance de causar sangramento que, se houver, poderão ser controlados durante o próprio exame. Os fragmentos retirados do seu estômago irão para o laboratório, onde serão analisados.

Você irá também realizar uma avaliação dentária para verificar o estado geral dos dentes e gengiva e a presença ou não dessa bactéria na boca.

3. desconfortos e riscos esperados

Os desconfortos e riscos que você irá ter se participar do estudo eventualmente serão os causados pelo exame de endoscopia. A endoscopia pode causar incômodo quando da passagem do tubo, com a pequena câmera, pela sua boca.

4. benefícios que poderão ser obtidos

O benefício será saber se você tem a bactéria na boca.

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Se você decidir não participar deste estudo você poderá continuar com seguimento no hospital.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefício relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. Você terá acesso qualquer momento a todas as informações relacionadas ao estudo, e seu médico e demais membros da equipe estarão disponíveis para responder às suas dúvidas.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Sua participação neste estudo é voluntária. A qualquer momento seu consentimento poderá ser retirado. Não haverá qualquer prejuízo para o seu tratamento aqui no hospital.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. Todos os dados referentes a você e seu tratamento são confidenciais, somente o médico e sua equipe sabem que você estará participando deste estudo. Se o estudo for publicado você não será identificado pelo nome.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa. Se você sofre algum dano causado por sua participação neste estudo os recursos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo lhe prestará assistência médica, sem nenhum custo para você, seja em caso de emergência ou não.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.
Não há.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Vanessa de Paula e Silva Rossi
Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Enéas de Aguiar , 255 Telefone: (11) 3069 – 7830

Dr. Tomás Navarro Rodriguez
Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Enéas de Aguiar , 255 Telefone: (11) 3069 – 7830

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Anexo B

São Paulo, 21 de setembro de 2006.

Ilma. Sr.
Vanessa de Paula e Silva Rossi Aguiar

Prezada Sra. Vanessa,

Atendendo sua solicitação, a Comissão Ético-Científica do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP, em sua 120ª Reunião Ordinária de 21 de setembro de 2006 analisou e aprovou o seu projeto de pesquisa, intitulado: "PESQUISA DA CEPA DE HELICOBACTER PYLORI NA CAVIDADE ORAL"

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Eduardo Monteiro da Cunha
Presidente da Comissão Ético-Científica do
Departamento de Gastroenterologia da FMUSP

Anexo C

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18.04.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0036/07**, intitulado: **"PESQUISA DA CEPA DE HELICOBACTER PYLORI NA CAVIDADE ORAL"**, apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Jaime Natan Eisig**

Pesquisador(a) Executante: **Vanessa de Paula e Silva Rossi Aguiar**

CAPPesq, 18 de abril de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: cappesa@hcnet.usp.br / secretariacappesa2@hcnet.usp.br
sol

Pacientes				H. pylori Estômago				H. pylori Cavidade Bucal							
	Nome	Sexo	Idade	UBT	RUT	Sorologia	Resultado Estômago	Lingua		Saliva		Pl. Supra		Pl. Sub	
								RUT	PCR	RUT	PCR	RUT	PCR	RUT	PCR
1	Oliveira, FS	M	32	Positivo	Positivo		Positivo	+	-	+	-	+	-	+	-
3	Cinqueti, E	M	57	Positivo	Positivo		Positivo	-	-	-	-	-	-	+	-
4	Oliveira, TR	F	34	Positivo	Positivo		Positivo	+	-	+	-	+	-		
5	Souza, DAA	F	52	Positivo	Positivo		Positivo	-	-	-	-	-	-	+	-
6	Souza, IA	F	29	Positivo	Positivo		Positivo	+	-	-	-	+	-	+	-
7	Nakiri, SAM	F	51	Negativo	Negativo		Negativo	-	-	+	-	+	-		
8	Cazoto, MAS	F	42	Positivo	Positivo		Positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Souza, FR	M	23	Positivo	Positivo		Positivo	-	-	+	-	+	-		
11	Silva, MAA	M	53	Positivo	Positivo		Positivo	+	-	-	-	+	-	+	-
12	Scherenda, C	M	57	Positivo	Positivo		Positivo	+	-	+	-	-	-		
13	Souza, MV	M	63	Positivo	Positivo		Positivo	-	-	+	-	+	-		
14	Barbosa, LG	F	66		Positivo	Positivo	Positivo	-	-	+	-	+	-	+	-
15	Ferreira, LS	F	33	Positivo	Positivo		Positivo	-	-	-	-	+	-		
16	Melo, TA	F	74		Positivo	Positivo	Positivo	-	-	-	-	-	-		
17	Brito, EMD	F	51	Positivo	Positivo		Positivo	+	-	+	-	+	-		
18	Penha, AG	M	57	Positivo	Positivo		Positivo	-	-	-	-	+	-		
19	Migães, MRS	F	51		Positivo	Positivo	Positivo	-	-	-	-	+	-	+	-
20	Costa, IMS	F	56		Positivo	Positivo	Positivo	+	-	+	-	+	-	-	-
21	Souza, CC	F	54	Positivo	Positivo		Positivo	-	-	-	-	+	-	+	-
23	Lima, FJ	M	46	Positivo	Positivo		Positivo	+	-	+	-	-	-		
25	Silva, DJ	M	20	Positivo	Positivo		Positivo	-	-	-	-	-	-		
26	Souza, MIS	F	45	Positivo	Positivo		Positivo	+	-	+	-	+	-	+	-
27	Araújo, A	M	30	Negativo	Negativo		Negativo	-	-	+	-	-	-		
28	Reina, RC	F	44	Positivo	Positivo		Positivo	-	-	-	-	+	-		
31	Lima, MRS	F	54	Positivo	Positivo		Positivo	+	-	+	-	+	-		

Pacientes				H. pylori Estômago						H. pylori Cavidade Bucal					
	Nome	Sexo	Idade	UBT	RUT	Sorologia	Resultado Final Estômago	Língua		Saliva		Pl. Supra		Pl. Sub	
								RUT	PCR	RUT	PCR	RUT	PCR	RUT	PCR
32	Santos, LM	F	51		Positivo	Positivo		+	-	-	-	+	-		
34	Machado, EB	F	47	Positivo	Positivo		Positivo	+	-	-	-	-	-		
36	Gonçalves, AM	F	67		Positivo	Positivo	Positivo	-	-	+	-	+	-	+	-
37	Silva, DP	M	47	Positivo	Positivo		Positivo	-	-	-	-	+	-		
38	Silva, AG	M	48	Positivo	Positivo		Positivo	+	-	-	-	+	-		
39	Souza, VO	M	48	Positivo	Positivo		Positivo	-	-	-	-	-	-		
41	Soares, MC	F	47	Negativo	Negativo		Negativo	+	-	-	-	+	-	+	-
42	Mateus, EFM	F	44	Negativo	Negativo		Negativo	-	-	-	-	+	-		
43	Souza, EJO	M	33	Negativo	Negativo		Negativo	+	-	+	-	+	-		
44	Souza, OE	M	46	Negativo	Negativo		Negativo	+	-	-	-	-	-		
45	Gorga, DLA	F	59		Negativo	Negativo	Negativo	-	-	-	-	+	-	+	-
46	Araújo, ECM	F	60	Negativo	Negativo		Negativo	+	-	+	-	-	-		
47	Cavalcante, MSC	F	57		Positivo	Positivo	Positivo	-	-	+	-	+	-		
48	Silva, MV	F	55	Negativo	Negativo		Negativo	-	-	-	-	+	-		
49	Oliveira, CFS	F	54	Negativo	Negativo		Negativo	+	-	+	-	-	-		
50	Silva, VRP	F	49	Negativo	Negativo		Negativo	-	-	-	-	+	-	+	-
51	Mendes, MC	F	24	Negativo	Negativo		Negativo	-	-	+	-	-	-		
52	Baltazar, NRR	F	54	Negativo	Negativo		Negativo	+	-	-	-	+	-		

8- REFERÊNCIAS:

- 1- Shi R, Xu S, Zhang H, Ding Y, Sun G, Huang X, Chen X, Li X, Yan Z, Zhang G. Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Chinese populations. *Helicobacter*. 2008;13:157-65.
- 2- Zaterka S, Eisig JN, Chinzon D, Rothstein W. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. *Helicobacter*. 2007;12:82-8.
- 3- Allaker RP, Young KA, Hardie JM, Domizio P, Meadows NJ. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. *J Med Microbiol*. 2002;51:312-7.
- 4- Nguyen TN, Barkun AN, Fallone CA. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter*. 1999;4:185-97.
- 5- Grübel P, Hoffman JS, Chong FK, Burstein NA, Mepani C, Cave DR. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1300-3.
- 6- Dowset SA, Kowolik MJ. Oral *Helicobacter pylori*: can we stomach it? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14:226-33.

- 7- Fergusson DA, Li C, Patel NR, Mayberry WR, Chi DS, Thomas E. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2802-4.

- 8- Dowsett SA, Archila L, Segreto VA, Gonzalez CR, Silva A, Vastola KA, Bartizek RD, Kowolik MJ. *Helicobacter pylori* infection in indigenous families of Central America: serostatus and oral and fingernail carriage. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2456-60.

- 9- Kignel S, Pina FA, André EA, Mayer MPA, Birman EG. Occurrence of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva of dyspeptic patients. *Oral Dis.* 2005;11:17-21.

- 10- Gebara ECE, Faria CM, Pannuti C, Chehter L, Mayer MPA, Lima LAPA. Persistence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity after systemic eradication therapy. *J Clin Periodontol.* 2006;33:329-33.

- 11- Okuda K, Ishihara K, Miura T, Katakura A, Noma H, Ebihara Y. *Helicobacter pylori* may have only a transient presence in the oral cavity and on the surface of oral cancer. *Microbiol Immunol.* 2000; 44:385-8.

- 12- Olivier BJ, Bond RP, Zyl WB, Delport M, Slavik T, Ziady C, Terhaar sive Droste JS, Lastovica A, Merwe SW. Absence of *Helicobacter pylori* within the oral cavities of members of a healthy South African community. *J Clin Microbiol.* 2006;44:635-6.

- 13- Song Q, Lange T, Spahr A, Adler G, Bode G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J Med Microbiol.* 2000;49:349-53.
- 14- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1984;1:1311-5.
- 15- Eisig JN, Zaterka S, Silva FM, Malfertheiner P, Mattar R, Navarro-Rodrigues T, Hashimoto CL, Iriya K, Laudanna AA, Moraes-Filho JPP. *Helicobacter pylori* recurrence in patients with duodenal ulcer: clinical, endoscopic, histologic, and genotypic aspects. A 10-year brazilian series. *Helicobacter.* 2006;11:431-5.
- 16- Amieva MR, El-Omar EM. Host-Bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology.* 2008;134:306-23.
- 17- Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, Rappuoli R. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90:5791-5.
- 18- Mattar R, Santos AF, Eisig JN, Navarro-Rodrigues T, Silva FM, Lupinacci RM, Iriya K, Carrilho FJ. No correlation of *babA2* with *vacA* and *cagA* genotypes of *Helicobacter pylori* and grading of gastritis from peptic ulcer disease patients in Brazil. *Helicobacter.* 2005;10:601-8.

- 19- Tombola F, Morbiato L, Del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M, Papini E. The *Helicobacter pylori vacA* toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J Clin Invest.* 2001;108:929-37.
- 20- Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 1995;270:7771-7.
- 21- Willhite DC, Blanke SR. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol.* 2004;6:143-54.
- 22- Peek RM Jr, Miller GG, Tham KT, et al. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA+* *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest.* 1995;73:760-70.
- 23- Peek RM Jr, Moss SF, Tham KT, et al. *Helicobacter pylori cagA+* strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:863-8.
- 24- Mattar R, Marques SB, Monteiro MS, Santos AF, Iriya K, Carrilho FJ. *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. *J Med Microbiol.* 2007;55:9-14.

- 25- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou Ph, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 1995;55:2111-5.
- 26- Osato MS, Ayub K, Le HH, Reddy R, Graham DY. Houseflies are an unlikely reservoir or vector for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2786-8.
- 27- Ahmed KS, Khan AA, Ahmed I, Tiwari SK, Habeeb A, Ahi D, Abid Z, Ahmed N, Habibullah CM. Impact of household hygiene and water source on the prevalence and transmission of *Helicobacter pylori*: a south Indian perspective. *Singapore Med J.* 2007; 48:543-9.
- 28- Megraud F. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment Pharmacol Ther.* 1995;9:85-91.
- 29- Chow TK, Lambert JR, Wahlqvist ML, Hsu-Hage BH. *Helicobacter pylori* in Melbourne chinese immigrants: evidence for oral-oral transmission via chopstick. *J Gastroenterol Hepatol.* 1995;10:562-9.
- 30- Shames B, Krajden S, Fuksa M, Babida C, Penner L. Evidence for the occurrence of the same strain of *Campylobacter pylori* in the stomach and dental plaque. *J Clin Microbiol.* 1989;27:2849-50.

- 31- Loster BW, Majewski SW, Czesnikiewicz-Guzik M, Bielanski W, Pierzchalski P, Konturek SJ. The relationship between the presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric in the stomach. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57:91-100.
- 32- Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadstrom T, O'Toole PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30:54-8.
- 33- Mapstone NP, Lynch DAF, Lewis FA, Axon ATR, Tompkins DS, Dixon MF, Quirke P. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *J Clin Pathol*. 1993;46:540-3.
- 34- Song Q, Spahr A, Schmid R, Adler G, Bode G. *Helicobacter pylori* in the oral cavity: high prevalence and great DNA diversity. *Dig Dis Sci*. 2000;45:2162-7.
- 35- Souto R, Colombo APV. Detection of *Helicobacter pylori* by polimerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. *J Periodontol*. 2008;79:97-103.
- 36- Umeda M, Kobayashi H, Takeuchi Y, Hayashi J, Morotome-Hayashi Y, Yano K, Aoki A, Ohkusa T, Ishikawa I. High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. *J Periodontol*. 2003;74:129-34.

- 37- Ozdemir A, Mass R, Sahin S, Saglamkaya U, Ateskan U. Detection of *Helicobacter pylori* colonization in dental plaques and tongue scrapings of patients with chronic gastritis. *Quintessence Int.* 2001;32:131-4.
- 38- Shimoyama T, Horie N, Kato T, Kaneko T, Komiyama K. *Helicobacter pylori* in oral ulcerations. *J Oral Sci.* 2000;42:225-9.
- 39- Okuda K, Kimizuka R, Katakura A, Nakagawa T, Ishihara K. Ecological and immunopathological implications of oral bacteria in *Helicobacter pylori*-infected disease. *J Periodontol.* 2003;4:123-8.
- 40- Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology.* 2000;28:12-55.
- 41- Aiba K, Suzuki N, Kabir AMA, Takagi A, Hoga Y. Lactic Acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol.* 1998;93:2097-101.
- 42- Martinez-Gomis J, Diouf A, Lakhssassi N, Sixou M. Absence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity of 10 non-dyspeptic subjects demonstrated by real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:407-10.

- 43- Cammarota G, Tursi A, Montalto M, Papa A, Veneto G, Bernardi S, Boari A, Colizzi V, Fedeli G, Gasbarrini G. Role of dental plaque in the transmission of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Gastroenterol*. 1996;22:174-7.
- 44- Adler I, Denninghoff VC, Alvarez MI, Avagnina A, Yoshida R, Elsner B. *Helicobacter pylori* associated with glossitis and halitosis. *Helicobacter*. 2005;10:312-7.
- 45- De Lorenzo JL. Microbiologia para o estudante de odontologia. São Paulo: Editora Atheneu;2004.
- 46- Asikainen S, Chen C, Slots J. Absence of *Helicobacter pylori* in subgingival samples determined by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 1994;9:318-20.
- 47- Anand PS, Nandakumar K, Shenoy KT. Are dental plaque, poor oral hygiene, and periodontal disease associated with *Helicobacter pylori* infection? *J Periodontol*. 2006;77:692-8.
- 48- Mattar R, Silva FM, Alexandrino AM, Laudanna AA. Validation of 14C-Urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1999;41:3-7.

- 49- Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada J, Stanghellini V. Functional gastroduodenal disorders. *Gastroenterol.* 2006;130:1466-79.
- 50- Geeraerts B, Tack J. Functional dyspepsia: past, present, and future. *J Gastroenterol.* 2008;43:251-5.
- 51- Labigne A, Cussac V, Courcoux P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol.* 1991;173:1920-31.
- 52- Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chong SKF, Lee CH. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. *J Clin Microbiol.* 1999;37:772-4.
- 53- Gebara ECE, Pannuti C, Faria CM, Chehter L, Mayer MPA, Lima LAPA. Prevalence of *Helicobacter pylori* detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19:277-80.
- 54- Czesnikiewicz-Guzik M, Karczewska E, Bielanski W, Guzik TJ, Kapera P, Targosz A, Konturek SJ, Loster B. Association of the presence of the *Helicobacter pylori* in the oral cavity and in the stomach. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55:105-15.
- 55- Karczewska E, Konturek JE, Konturek PC, Czesnikiewicz M, Sito E, Bielanski W, Kwiecien N, Obtulowicz W, Ziemniak W, Majka J, Hanh EG, Konturek SJ. Oral

cavity as a potential source of gastric reinfection by *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci*. 2002;47:978-86.

56- Siavoshi F, Salmanian AH, Kbari FA, Malekzadeh R, Massarrat S. Detection of *Helicobacter pylori*-Specific genes in the oral yeast. *Helicobacter*. 2005;10:318-22.

57- Li C, Musich PR, Ha T, Ferguson DA, Patel NR, Chi DS, et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay. *J Clin Pathol* 1995;48:662-6.

58 - O'Toole PW, Logan SM, Kostrynska M, Wadström T, Trust TJ. Isolation, biochemical and molecular analysis of a species-specific protein antigen from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 1991;173:505-13.

59 – Foxall PA, Li-Tai H, Mombley HLT. Use of polymerase chain reaction-amplified *Helicobacter pylori* urease structural genes for differentiation of isolates. *J Clin Microbiol*. 1992;30:739-41.

60- Miyabayashi H, Furihata K, Shimizu T, Ueno I, Akamatsu T. Influence of oral *Helicobacter pylori* on the success of eradication therapy against gastric *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2000;5: 30-7.

61- Singh K, Ghoshal UC. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer: an Asian emigma. *World J Gastroenterol*. 2006; 12:1346-51.

- 62- Hamashima C, Shibuya D, Yamazaki H, Inoue K, Fukao A, Saito H, Sobue T. The Japanese guidelines for gastric cancer screening. *Jpn J Clin Oncol.* 2008; 38:259-67.
- 63- Leung WK, Siu KL, Kwok CKL, Chan SY, Sung R, Sung JJ. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94: 2881-4.
- 64- Nguyen AMH, El-Zaatari FAK, Gram DY. *Helicobacter pylori* in the oral cavity. A critical review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995; 76: 705-9.

O	M	I		4	9	1	B	Dispatch: 20.11.08	Journal: OMI	CE: Blackwell
	Journal Name			Manuscript No.					Author Received:	No. of pages: 5	PE: Padmapriya

Oral Microbiology Immunology 2009; 24: 1–5
Printed in Singapore. All rights reserved

© 2009 The Authors.
Journal compilation © 2009 Blackwell Munksgaard

ORAL MICROBIOLOGY
AND IMMUNOLOGY

Oral cavity is not a reservoir for *Helicobacter pylori* in infected patients with functional dyspepsia

V. P. Silva Rossi-Aguiar¹, T. Navarro-Rodriguez¹, R. Mattar¹, M. P. Siqueira de Melo Peres², R. Correa Barbuti¹,
¹F. M. Silva¹, F. J. Carrilho¹, J. N. Eisig¹
¹Clinical Gastroenterology Division, Department of Gastroenterology, ²Department of Dentistry, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

Silva Rossi-Aguiar VP, Navarro-Rodriguez T, Mattar R, Siqueira de Melo Peres MP, Correa Barbuti R, Silva FM, Carrilho FJ, Eisig JN. Oral cavity is not a reservoir for *Helicobacter pylori* in infected patients with functional dyspepsia. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 1–5. © 2009 The Authors. Journal compilation © 2009 Blackwell Munksgaard.

Introduction: *Helicobacter pylori* infection is very prevalent in Brazil, infecting almost 65% of the population. The aim of this study was to evaluate the presence of this bacterium in the oral cavity of patients with functional dyspepsia (epigastric pain syndrome), establish the main sites of infection in the mouth, and assess the frequency of *cagA* and *vacA* genotypes of oral *H. pylori*.

Methods: All 43 outpatients with epigastric pain syndrome, who entered the study, were submitted to upper gastrointestinal endoscopy to rule out organic diseases. *Helicobacter pylori* infection in the stomach was confirmed by a rapid urease test and urea breath tests. Samples of saliva, the tongue dorsum and supragingival dental plaque were collected from the oral cavity of each subject and subgingival dental plaque samples were collected from the patients with periodontitis; *H. pylori* infection was verified by polymerase chain reaction using primers that amplify the DNA sequence of a species-specific antigen present in all *H. pylori* strains; primers that amplify a region of urease gene, and primers for *cagA* and *vacA* (m1, m2, s1a, s1b, s2) genotyping. **Results:** Thirty patients harbored *H. pylori* in the stomach, but it was not possible to detect *H. pylori* in any oral samples using P1/P2 and Urease A/B. The genotype *cagA* was also negative in all samples and *vacA* genotype could not be characterized (s-m). **Conclusion:** The oral cavity may not be a reservoir for *H. pylori* in patients with epigastric pain syndrome, the bacterium being detected exclusively in the stomach.

Key words: Xxxxx; Xxxxx; Xxxxx

Vanessa de Paula e Silva Rossi Aguiar, Rua Prof. João Marinho, 95. Paraíso, São Paulo, SP, Brazil 04007-010
Tel.: +55 11 3885 1906;

fax: Xxxxx;
e-mail: fopvan@yahoo.com
Accepted for publication October 13, 2008

Introduction

Helicobacter pylori infection in the stomach of human beings is very common. Approximately 50% of the world's population is infected with *H. pylori* (28, 31, 36). This bacterium is considered the pathogen responsible for gastritis and peptic ulcers, and is a risk factor of gastric cancer (31).

In Brazil, the seroprevalence of *H. pylori* infection has been estimated at 65% (45). Its prevalence is associated with close contact (12), crowded places, poor hygiene (45), and housing conditions that also favor intrafamilial clustering and reinfection after bacterial eradication (14).

Transmission of the bacterium seems to occur from person to person by oral–oral (3), gastric–oral (30), and fecal–oral routes

(4, 19) and the oral cavity may play a role in this process, or in the reinfection of the bacterium in the stomach (11). Nonetheless, the transmission process is not established, hindering the successful implementation of preventive measures (12).

It has been suggested that gastric juice may play an important role in the natural route of transmission, such as in gastritis,

especially the acute stage, which is often accompanied by increased episodes of intermittent reflux which may facilitate the passage of viable organisms into the mouth, from where they may be transmitted to other individuals (3). It is possible that oral colonization by *H. pylori* may precede gastric infection (21).

Helicobacter pylori has been isolated from saliva (9, 15, 18, 23, 39–41, 44), supragingival dental plaque (3, 19, 35, 40, 44), subgingival dental plaque (9, 16, 41, 44), tongue dorsum (12, 44), and the surface of oral cancer (32); nevertheless, results are controversial and detection of oral *H. pylori* has ranged from 0% (24, 34) to 100% (11, 39).

These discrepant results contribute to the question of whether the oral cavity is a permanent or transient reservoir for *H. pylori*. Methods for *H. pylori* diagnosis in the stomach are well established, such as urease test, histological examination, culture, urea breath test (27), and molecular biology, conversely, to assess *H. pylori* in the oral cavity, polymerase chain reaction (PCR) assays have a much greater sensitivity (39).

To distinguish *H. pylori* strains from each other in the mouth would be of epidemiological importance in the identification of the transmission route and the possible causes of reinfection after eradication therapy (40). The genotypes *cagA* and *vacA* correspond to virulent strains of *H. pylori*. Patients with antibodies against the CagA protein showed higher rates of both peptic ulcers and adenocarcinoma (4). Although studies have been conducted to type *H. pylori* strains in the stomach (14, 25), few data are available concerning the typing of *H. pylori* in the mouth (22, 40).

The aim of the present study was to assess the presence of this bacterium by PCR in the oral cavity of patients with epigastric pain syndrome, and check whether the oral *H. pylori* harbors *cagA* and *vacA* genes.

Materials and methods

Subjects

This study was approved by the local Ethics Committee. Patients gave written informed consent to participate in the study. Forty-three patients (17 men, 26 women; mean age 46.9 years) from the Outpatient Gastroenterology service of the Hospital das Clínicas of the University of São Paulo, School of Medicine were selected for this study. Patients with dyspeptic symptoms were submitted to an upper gastrointestinal endoscopy. Those with a normal examination were consid-

ered functional dyspeptic patients, subtype epigastric pain syndrome (42). Subjects with peptic ulcer or diabetes mellitus, those who were human immunodeficiency virus-positive, and patients who had taken antisecretory or antimicrobial agents within the previous 2 months were excluded from the study. Previous gastrointestinal surgery, pregnancy, or lactation and severe comorbidity were other exclusion criteria. Patients with a positive rapid urease test (from antral and corpus biopsies) and ¹⁴C-urea breath test were considered *H. pylori*-positive for the stomach.

Oral sample collection

Saliva samples were taken using sterile cotton swabs which were gently rubbed against the oral mucosa (43 samples) (38). Sterile cotton swabs were also used to collect samples of microbiota from the tongue (43 samples) by scraping the posterior third of the dorsum (17). Supragingival plaque (43 samples) was obtained from two different teeth using sterile Grace curettes. Of all the subjects, 15 presented with periodontitis and had subgingival dental plaque collected after removal of supragingival plaque by inserting a sterile paper point into the periodontal pocket (probing depth >5 mm) for 20 s (17). The samples collected from the oral cavity were immediately placed into homemade urease test tubes for the rapid urease test (26). Oral samples positive for the rapid urease test were used for DNA extraction and PCR amplification.

Upper gastrointestinal sampling

All patients, fasted for 8 h then underwent endoscopy after narcosis (7). The channels

of the endoscope (Olympus GIF 100–130 V, Tokyo, Japan) were cleaned and sterilized with 2% glutaraldehyde for 30 min after each use. Biopsies of the gastric antrum and corpus were taken for the urease test (14).

DNA extraction

DNA was extracted from the oral samples by a salting-out procedure according to a previously described technique (26).

PCR amplification

The PCR primers are listed in Table 1. Two sets of primers were used to detect *H. pylori* by PCR: P1/P2, which amplifies a 26-kDa antigen gene, present in all strains of *H. pylori* (18) and A/B for urease gene amplification (20): initial denaturation at 94°C for 5 min followed by 40 cycles of denaturation at 93°C for 1 min, annealing at 57°C for 2 min, extension at 70°C for 2 min, and a final extension at 70°C for 10 min. Amplification conditions for *vacA* and *cagA2* were: initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 27 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 53°C for 30 s, extension at 72°C for 30 s and a final extension for 7 min at 72°C (6). Two segments of the *cagA* gene were studied, *cagA1*, which is close to the promoter region and present in almost all of the *H. pylori* isolates (25), and *cagA2* in the middle of the *cagA* gene, described previously by Covacci et al. (8) The amplification conditions for *cagA1* were performed using 40 cycles with an annealing temperature of 52°C. PCR products were analysed by electrophoresis on 2% agarose gels, stained with ethidium bromide.

Table 1. Polymerase chain reaction primers used to amplify regions of *Helicobacter pylori* genes

Gene	Name	Primer sequence	Size	Location/accession
Ag	P1	5'-TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC-3'	298 bp	
	P2	5'-CTTGCTGGGCATCTTACCATG-3'		500–522
Urease	A	5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3'	295 bp	1291–1317/M60398
	B	5'-AAGCTTACTTCTAACACTAACGC-3'		1563–1586
m1	VA3-F	5'-GGTCAAAATGCGGTCATGG-3'	290 bp	2741–2759/U05676
	VA3-R	5'-CCATTGGTACCTGTAGAAAC-3'		3011–3030/U5676
m2	VA4-F	5'-GGAGCCCCAGGAAACATTG-3'	352 bp	976–994/U05677
	VA4-R	5'-CATAACTAGCGCCTTGCAC-3'		1309–1327/U05677
s1a	SS1-F	5'-GTCAGCATCACACCGCAAC-3'	190 bp	866–884/U05676
	VA1-R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'		1037–1055/U05676
s1b	SS3-F	5'-AGCGCCATACCGCAAGAG-3'	187 bp	1
	VA1-R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'		1037–1055/U05676
s2	SS2-F	5'-GCTAACACGCCAAATGATCC-3'	199 bp	433–452/U29401
	VA1-R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'		1037–1055/U05676
cagA2	CAG-1	5'-AGACAACCTTGAGCGAGAAAG-3'	320 bp	1764–1783/X70039
	CAG-2	5'-TATTGGGATTCTTGAGGCG-3'		2064–2083
cagA1	CagA-F2	5'-GATAACAGGCAAGCTTTGA-3'	349 bp	157–176/AF001357
	CagA-R2	5'-CTGCAAAAGATTGTTGGCAGA-3'		505–484

¹According to Atherton et al. (5) there are no published coordinates for strains of this type.

DNA from gastric biopsies of positive urease tests, which had the genetic profile of *H. pylori* isolates determined in previous publications (25, 26), was used as the positive control for PCRs of each gene. Negative controls consisted of the reagents of PCR without DNA.

Results

H. pylori were found in the stomach of 30 patients (69.7%). A total of 144 samples were collected from the oral cavity, 80 (55.5%) of them were positive for rapid urease test; however, *H. pylori* DNA was not detected in any oral sample by PCR.

The PCRs performed with P1/P2 were not amplified (Fig. 1), even though genomic DNA was extracted from the oral samples (Fig. 2). These negative results were confirmed by a second independent PCR that assesses the urease gene. In spite of this, PCRs with primers for *cagA* and *vacA* genotyping were performed and were all negative.

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products of 26-kDa species-specific antigen gene for *Helicobacter pylori* (primers P1/P2) from five oral samples and positive controls from gastric biopsies. Lane M, 100-base-pair DNA ladder, Invitrogen (São Paulo, Brazil); lane C, positive controls from gastric biopsies; and lanes 1 to 5, oral samples.

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the genomic DNA extracted from oral samples. Lane M, 1-kilobase DNA ladder, Invitrogen (São Paulo, Brazil); lanes 1 to 10, genomic DNA extracted from oral samples.

Discussion

Helicobacter pylori can survive in the stomach partly because of the large amounts of urease produced by this bacterium compared with the amount produced by other microbes (29). The prevalence of the bacterium detected in the stomach (69.7%) was similar to the range found in a study conducted in São Paulo city, which detected a seroprevalence of 65% of *H. pylori* in blood donors (45). The fact that all patients presented dyspeptic symptoms but not all of them were infected agreed with the literature (5). Many asymptomatic patients have the infection in the stomach; on the other hand, subjects with epigastric pain are not always *H. pylori* hosts (5).

The oral environment is very different from the stomach, the primary residence of *H. pylori* (11). The growth of *H. pylori* in the oral cavity may be influenced by various factors, such as temperature, pH, oxidation-reduction potential, the availability of nutrients, salivary flow, and antimicrobial substances (39).

There are different points of view regarding the contention that the oral cavity is a reservoir of *H. pylori*. Studies that detected low percentages of *H. pylori* in the oral cavity consider that it is not a significant reservoir for this bacterium, which might have only a transient presence in the mouth (17). On the other hand, authors who found high amounts of *H. pylori* in their studied population consider it part of the normal microbiota of the oral cavity (17).

Our findings are in agreement with previous studies that reported an absence of *H. pylori* in the oral cavity (1, 24, 34). Other authors, in comparison, detected this microorganism in several sites in the mouth (3, 9, 19, 22).

Song et al. found from 55% to 82% prevalence of *H. pylori* in dental plaque, using nested PCR with other sets of primers (39). This disagreement with the ranges found in the present study can be attributed to different sample collection procedures and methodology, and the election of different primers. (34, 39).

Helicobacter pylori was not isolated on the dorsum of the tongue. This result differs from the prevalence found in the same site by Adler et al.; however, they had only selected patients with tongue pathologies, such as cancer, hyperplasia, and other diseases (1). Therefore, the different patient groups studied might be related to the dissimilar prevalence of *H. pylori* in the oral cavity (34, 39).

Some studies detected *H. pylori* in the oral microbiota of subjects with periodontitis, suggesting that periodontal pocketing and inflammation may favor colonization by this bacterium (16, 17, 41, 44). Fifteen patients presented periodontitis with periodontal pockets with a probing depth of between 4 and 6 mm. The conditions of gingival pockets with this probing depth may favor the growth of *H. pylori*, as reported by Umeda et al. (44), because of the lower oxygen concentration in these sites.

The environment of a gingival pocket seemed to be more appropriate for *H. pylori*, which is microaerophilic, than other sites of the oral cavity, as seen by Gebara et al., who detected higher amounts of *H. pylori* in the dental plaque of periodontal patients (17); nonetheless, *H. pylori* was not detected in the subgingival dental plaque from the 15 patients enrolled in the present study. The work by Asikainen et al. corroborates our findings. They assessed 1000 subgingival dental plaque samples from 336 subjects by PCR and did not detect *H. pylori* in any of them (5).

Okuda et al. found that strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* strongly coaggregated with *H. pylori* strains. However, the coaggregation between *H. pylori* and these periodontal disease-associated bacteria can be inhibited by salivary components (33).

Other studies reported that species of oral bacteria could inhibit the growth of *H. pylori* by producing bacteriocin-like inhibitory proteins, which may affect the viability of *H. pylori* in the oral cavity (2, 32). Aiba et al. found that *Lactobacillus salivarius* produced a high amount of lactic acid, which inhibits the growth of *H. pylori* in a mixed culture (2). Okuda et al. obtained similar results in an *in vitro* experiment. The authors found that the growth of *H. pylori* strains isolated from gastric samples and cultivated with supernatants of *Streptococcus mutans* and *Prevotella intermedia* was significantly lower than that of a culture of *H. pylori* without oral bacterium inoculation (32). They also observed that the morphological characteristics of *H. pylori* strains cultivated with this oral bacterium had changed. The viable cell number (colony-forming units) of *H. pylori* was significantly lower than the control, and the coccal cell number was higher (32).

Some investigators proposed that *H. pylori* may exist in a dormant, spore-like state that can be viable but non-culturable. They suggested that under

stress and nutrient deprivation, *H. pylori* undergoes a morphological transformation from actively dividing and swimming spiral bacilli to inactive cocci (4). Some authors also suggested that this morphological change could result in failure to isolate *H. pylori* from the oral cavity (32, 37).

The use of PCR to detect *H. pylori* in the stomach and in the oral cavity has been widely accepted and has a greater sensitivity when compared with culture methods, which may underestimate the prevalence of *H. pylori* in clinical samples (39).

Some authors assessed oral *H. pylori* by *in vitro* urease test, inoculating oral samples into tubes containing *Campylobacter*-like organism test. The inoculated solutions that changed from yellow to red in 1 h were reported as being positive for *H. pylori* (35).

The present study showed divergent results: 80 samples were positive after 1 h of inoculation into the urease test tubes, but none of them were positive by the PCRs, demonstrating the possibility of false identification.

The oral cavity harbors a large spectrum of microorganisms, including oral urease-producing bacteria, such as *Streptococcus vestibularis* and *Actinomyces viscosus* (35); this is different from the stomach, in which only *H. pylori*, a urease producer can survive (43).

- 5 It is quite precipitated to attest that 1 h positive urease tests contain *H. pylori*, PCR methodology has more sensitivity and specificity (43).

The choice of a set of primers that target the 26-kDa species-specific antigen gene was based on earlier publications that had had positive results in detection of *H. pylori* in gastric biopsy samples (18, 25, 26) and oral samples (18). When used as a probe against numerous *H. pylori* strains and other gram-negative enteric organisms these primers only hybridized with *H. pylori* strains (18), making evident their specificities.

The study design allowed the use of other primers and the amplification of different target sequences along the bacterial genome. The second set of primers used targeted the urease C gene (*ureC*) (20), which was not amplified in any oral sample.

Similar results were obtained using other primers that genotype the cytotoxin gene *vacA* and pathogenicity genes *cagA2* and *cagA1*. Previous studies detected a frequency of the *cagA2* genotype in gastric samples from peptic ulcers patients of 75.3%, and of 26.2% in dyspeptic patients.

cagA1 is the segment close to the promoter, reported by other studies to be present in almost all of the *H. pylori* isolates (25). However, it was not possible to detect these pathogenic genotypes in any oral samples in the present study. These results emphasize the absence of this bacterium in the oral environment of the population studied.

Moreover, results showed no apparent correlation between the prevalence of *H. pylori* in the oral cavity and infection in the stomach, as reported previously (10, 40). Furthermore, the *H. pylori* load in the oral cavity, when swallowed, could be too small to infect the stomach (10).

From the results obtained in the study, it is likely that *H. pylori* is a transient member of the oral microflora (24) of patients with epigastric pain syndrome. Several sites of the human oral cavity, such as the tongue dorsum, saliva, and supragingival and subgingival dental plaque, may not be relevant reservoirs of *H. pylori*.

Acknowledgments

We wish to thank Anibal Ferreira dos Santos and Maria do Socorro Monteiro for their excellent technical help with this project.

References

- Adler I, Denninghoff VC, Alvarez MI, Avagnina A, Yoshida R, Elsner B. *Helicobacter pylori* associated with glossitis and halitosis. *Helicobacter* 2005; 10: 312–317.
- Aiba K, Suzuki N, Kabir AMA, Takagi A, Hoga Y. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2097–2101.
- Allaker RP, Young KA, Hardie JM, Domizio P, Meadows NJ. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. *J Med Microbiol* 2002; 51: 312–317.
- Amieva MR, El-Omar EM. Host-Bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 2008; 134: 306–323.
- Asikainen S, Chen C, Slots J. Absence of *Helicobacter pylori* in subgingival samples determined by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9: 318–320.
- Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1995; 270: 7771–7777.
- Bonamico M, Strappini PM, Bonci E et al. Evaluation of stool antigen test, PCR on oral samples and serology for the non-invasive detection of *Helicobacter pylori* infection in children. *Helicobacter* 2004; 9: 69–76.
- Covacci A, Censini S, Bugnoli M et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 5791–5795.
- Czesnikiewicz-Guzik M, Bielanski W, Guzlik TJ, Loster B, Konturek SJ. *Helicobacter pylori* in the oral cavity and its implications in gastric infection, periodontal health, immunology and dyspepsia. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56: 77–89.
- Czesnikiewicz-Guzik M, Loster B, Bielanski W et al. Implications of oral *Helicobacter pylori* for the outcome of its gastric eradication therapy. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 145–151.
- Dowsett SA, Kowolik MJ. Oral *Helicobacter pylori*: can we stomach it? *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14: 226–233.
- Dowsett SA, Archila L, Segreto VA et al. *Helicobacter pylori* infection in indigenous families of Central America: serostatus and oral and fingernail carriage. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2456–2460.
- Drossman DA. Rome III: the new criteria. *Chin J Dig Dis* 2006; 7: 181–185.
- Eisig JN, Zattera S, Silva FM et al. *Helicobacter pylori* recurrence in patients with duodenal ulcer: clinical, endoscopic, histologic, and genotypic aspects. A 10-year Brazilian series. *Helicobacter* 2006; 11: 431–435.
- Ferguson DA, Li C, Patel NR, Mayberry WR, Chi DS, Thomas E. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2802–2804.
- Gebara ECE, Faria CM, Pannuti C, Chehter L, Mayer MPA, Lima LAPA. Persistence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity after systemic eradication therapy. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 329–333.
- Gebara ECE, Pannuti C, Faria CM, Chehter L, Mayer MPA, Lima LAPA. Prevalence of *Helicobacter pylori* detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 277–280.
- Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadstrom T, O'Toole PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 54–58.
- Kignel S, Pina FA, André EA, Mayer MPA, Birman EG. Occurrence of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva of dyspeptic patients. *Oral Dis* 2005; 11: 17–21.
- Labigne A, Cussac V, Courcoux P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol* 1991; 173: 1920–1931.
- Li C, Musich PR, Ferguson DA Jr, Patel NR, Chi DS, Thomas E. High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay. *J Clin Pathol* 1995; 48: 662–666.
- Loster BW, Majewski SW, Czesnikiewicz-Guzik M, Bielanski W, Pierzchalski P, Konturek SJ. The relationship between the presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric in the stomach. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 91–100.
- Mapstone NP, Lynch DAF, Lewis FA et al. Identification of *Helicobacter pylori* DNA

- in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *J Clin Pathol* 1993; 46: 540–543.
24. Martinez-Gomis J, Diouf A, Lakhssassi N, Sixou M. Absence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity of 10 non-dyspeptic subjects demonstrated by real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 407–410.
 25. Mattar R, Marques SB, Monteiro MS, Santos AF, Iriya K, Carrilho FJ. *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. *J Med Microbiol* 2007; 55: 9–14.
 26. Mattar R, Santos AF, Eisig JN et al. No correlation of *babA2* with *vacA* and *cagA* genotypes of *Helicobacter pylori* and grading of gastritis from peptic ulcer disease patients in Brazil. *Helicobacter* 2005; 10: 601–608.
 27. Mattar R, Silva FM, Alexandrino AM, Laudanna AA. Validation of ¹³C-Urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Rev Inst Med trop Sao Paulo* 1999; 41: 3–7.
 28. Mégraud F, Brassens-Rabbé MP, Denis F, Belbourni A, Hoa DQ. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1870–1873.
 29. Miyabayashi H, Furihata ?????, Shimizu T, Ueno I, Akamatsu T. Influence of oral *Helicobacter pylori* on the success of eradication therapy against gastric *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2000; 5: 30–37.
 30. Nguyen AMH, El-Zaatari FAK, Gram DY. *Helicobacter pylori* in the oral cavity. A critical review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 76: 705–709.
 31. Nguyen TN, Barkun AN, Fallone CA. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter* 1999; 4: 185–197.
 32. Okuda K, Ishihara K, Miura T, Katakura A, Noma H, Ebihara Y. *Helicobacter pylori* may have only a transient presence in the oral cavity and on the surface of oral cancer. *Microbiol Immunol* 2000; 44: 385–388.
 33. Okuda K, Kimizuka R, Katakura A, Nakagawa T, Ishihara K. Ecological and immunopathological implications of oral bacteria in *Helicobacter pylori*-infected disease. *J Periodontol* 2003; 74: 123–128.
 34. Olivier BJ, Bond RP, Zyl WB et al. Absence of *Helicobacter pylori* within the oral cavities of members of a healthy South African community. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 635–636.
 35. Ozdemir A, Mas R, Sahin S, Saglamkaya U, Ateskan U. Detection of *Helicobacter pylori* colonization in dental plaques and tongue scrapings of patients with chronic gastritis. *Quintessence Int* 2001; 32: 131–134.
 36. Shi R, Xu S, Zhang H et al. Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Chinese populations. *Helicobacter* 2008; 13: 157–165.
 37. Shimoyama T, Horie N, Kato T, Kaneko T, Komiyama K. *Helicobacter pylori* in oral ulcerations. *J Oral Sci* 2000; 42: 225–229.
 38. Siavoshi F, Salmanian AH, Khari FA, Malekzadeh R, Massarrat S. Detection of *Helicobacter pylori*-specific genes in the oral yeast. *Helicobacter* 2005; 10: 318–322.
 39. Song Q, Lange T, Spahr A, Adler G, Bode G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J Med Microbiol* 2000; 49: 349–353.
 40. Song Q, Spahr A, Schmid R, Adler G, Bode G. *Helicobacter pylori* in the oral cavity: high prevalence and great DNA diversity. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 2162–2167.
 41. Souto R, Colombo APV. Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. *J Periodontol* 2008; 79: 97–103.
 42. Tack J, Talley NJ, Camilleri M et al. Functional gastroduodenal disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1466–1479.
 43. Teoman I, Ozmeric N, Ozcan G et al. Comparison of different methods to detect *Helicobacter pylori* in the dental plaque of dyspeptic patients. *Clin Oral Invest* 2007; 11: 201–205.
 44. Umeda M, Kobayashi H, Takeuchi Y et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. *J Periodontol* 2003; 74: 129–134.
 45. Zaterka S, Eisig JN, Chinzon D, Rothstein W. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. *Helicobacter* 2007; 12: 82–88.