

Elaine Darini

**Colonização gástrica por *Helicobacter pylori* associada à
citotoxina do gene A (cagA) : relação com proliferação celular
e apoptose**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Fisiopatologia Experimental da
Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de concentração:

Fisiopatologia Experimental

Orientador:

Prof. Dr. Marcel Cerqueira César Machado

São Paulo

2004

*Ao desejo de crescimento, deve, aliar-se o
esforço contínuo e o devotamento às idéias
renovadoras.*

Joanna de Ângelis

Dedicatória

Ao meu marido Luiz Carlos, amigo e companheiro de todas as horas, incentivador constante de meu aperfeiçoamento profissional e acadêmico, com amor e carinho.

Às minhas amadas filhas Arianne e Taianne, verdadeira razão da minha vida, alegria e luta.

Aos meus queridos pais Eloy e Maria, cujos ensinamentos de honestidade, respeito, dedicação, amor à família, e ao próximo, trago no meu coração como exemplo de vida.

Aos meus queridos irmãos Andréa e Daniel, pelo incentivo e ajuda nos meus momentos mais difíceis.

Em memória dos meus amados avós Pedro e Maria, que tanto fizeram por mim.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcel Cerqueira César Machado, exemplo para o meu aprimoramento profissional.

Aos amigos Dr. Luiz Heraldo A. Câmara-Lopes e Dra. Katia Ramos Leite pelo incentivo, amizade e apoio contínuo oferecidos durante todos esses anos.

Ao Dr. José Alexandre M. Barbuto e as Dras. Cristina Mitteldorf e Gilka Gattás, pelo carinho e ajuda em minhas dúvidas.

As queridas amigas Márcia Kubrusly e Claudia Muraro de Carvalho, pelo incentivo, companherismo e amizade, sempre demonstrado por elas.

A todos meus amigos do Laboratório de Patologia Cirúrgica e Molecular, que sempre compartilharam comigo sua amizade.

A minha querida tia Ivone Herzig, por sua preocupação comigo.

Aos meus sogros Djacir Batista dos Santos e Maria Teixeira dos Santos, pelo apoio sempre dispensado a mim.

Ao meu querido “quase filho” Felipe Alves Gorni, pela amizade, consideração e ajuda nos momentos que precisei.

E a todos aqueles que não citei aqui, mas que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	i
SUMMARY	ii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Helicobacter pylori</i> (aspectos gerais)	1
1.2 Epidemiologia	2
1.3 Aspectos bioquímicos e imunológicos do <i>Helicobacter pylori</i>	4
1.4 Fatores de patogenicidade	6
1.5 Aspectos clínicos	9
1.5.1 Relação do HP com as gastrites e as úlceras	9
1.5.2 Relação do HP com linfoma de baixo grau, associado à mucosa gástrica (linfoma tipo MALT)	10
1.5.3 Relação do HP com o adenocarcinoma gástrico	10
1.6 Testes diagnósticos para detecção do HP (métodos invasivos e não invasivos)	11
1.6.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	11
1.6.2 Proliferação celular / apoptose	12
2 OBJETIVOS	14
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	15
3.1 CASUÍSTICA	15
3.1.2 ASPECTOS GERAIS	15
3.2 MÉTODOS	16
3.2.1 Exame Histopatológico.	16

3.2.2. Extração de DNA	18
3.2.3 Otimização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)	19
3.2.4 Avaliação da Proliferação celular	22
3.2.5 Detecção da Apoptose	23
3.2.6 Relação Proliferação celular (IP) / Apoptose (IA)	25
3.2.7 Análise Estatística	25
4 RESULTADOS	26
I- Identificação do <i>Helicobacter pylori</i> (HP) através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)	26
II- Genotipagem do marcador de patogenicidade (<i>cagA</i>) do <i>Helicobacter pylori</i>	28
III- Proliferação celular (anticorpo anti-Ki-67)	33
IV- Apoptose (TUNEL)	37
V- Relação da proliferação celular (IP) e apoptose (IA)	41
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	51
7 ANEXOS	52
8 REFERÊNCIAS	62

Resumo

Darini E. **Colonização gástrica por *Helicobacter pylori* associado à citoxina do gene A (cagA) : relação com proliferação celular e apoptose.** São Paulo, 2004. Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Helicobacter pylori (HP) é uma bactéria gram-negativa que coloniza o estômago e esta envolvida na patogênese do tecido gastroduodenal. Em 1994 a Agência Internacional de Controle do Câncer , classificou o HP como um carcinogênico classe I.

Os mecanismos envolvidos na carcinogênese durante a colonização gástrica pelo HP não são ainda bem entendidos, mas evidências apontam como um importante fator de virulência a presença da Ilha de patogenicidade (PAI), representada pelo gene A (cagA). PAI parece estar envolvida no aumento da proliferação celular, diminuindo a apoptose.

Neste trabalho, estudamos 300 doentes, submetidos a endoscopia gástrica.

A detecção do HP e da Ilha de Patogenicidade (cagA) foi realizada com “primers” específicos. Os casos positivos foram correlacionados com os resultados histopatológicos, proliferação celular (Ki-67) e apoptose (TUNEL). Verificamos a presença do HP em 37,0% (111/300), sendo que 40,5% (45/111) destes eram cagA+.

O índice proliferativo avaliado pela relação da proliferação celular e apoptose correlacionou-se com a presença do HP/CagA. Análise de regressão logística revelou risco de 8,8 vezes maior no desenvolvimento de doença gástrica grave nos HP/cagA+.

Summary

Darini, E. *Helicobacter pylori* **gastric colonization and cytotoxin associated gene A (cagA): relationship with cell proliferation and apoptosis.** São Paulo, 204. Dissertação (mestrado) – Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo.

Helicobacter pylori (HP) is a gram-negative bacterium that colonizes the stomach and is involved in pathogenesis of gastroduodenal tissues. In 1994, the World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, classified HP as type I carcinogen.

The mechanisms involved in carcinogenesis during HP gastric colonization are not fully understood, but evidences point to the pathogenicity island (PAI) as an important virulent factor, which is represented by gene A (cagA).

PAI strains enhance epithelial cell proliferation increase cell cycle, attenuate apoptosis.

In this work, we study 300 patients, who were submitted to gastric endoscopy.

HP detection and PAI + strain typing were performed by PCR using primers to 16-rRNA and cagA (molecular marker to PAI). Amplification results were blindly correlated to the histological findings, cell proliferation using Ki-67 (immunohistochemistry), and apoptosis (TUNEL). We verified the HP presence in 37,0% (11/300) of the patients, considering 40,5% (45/111) of them as being cagA+. The proliferation rate evaluated by the cell proliferation and apoptosis is correlated to the presence of HP/cagA.

The logistic regression analysis shows a 8,8 greater risk of developing serious gastric diseases considering HP/cagA+.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Helicobacter pylori* (aspectos gerais)

O *Helicobacter pylori* (HP), denominado a princípio de *Campilobacter pylori* é um microorganismo gram negativo, espiralado, altamente móvel que habita o estômago humano (Lewin et al., 1989).

Warren e Marshall (1983) conseguiram isolar esse microorganismo, e através da ingestão de bactérias desenvolvidas em cultura, demonstraram sua relação com o desenvolvimento de gastrites. Eles também observaram que diferentes cepas apresentavam virulências variáveis provavelmente causadas pela produção de citotoxinas distintas. Essa associação tem sido considerada uma das mais importantes descobertas no estudo de doenças que acometem o estômago (Lewin et al., 1989).

Hoje, sabe-se que a forma helicoidal do HP favorece a movimentação impulsionada por flagelos permitindo o cruzamento da camada de muco que recobre o estômago (Montecucco et al., 2001). Esse rompimento na proteção da mucosa em associação à liberação de citocinas e ao processo inflamatório crônico, pode levar a formação de gastrites, úlceras, carcinomas e linfomas gástrico de baixo grau tipo MALT (tecido linfóide associado à mucosa) (Sholte et al., 1997).

Algumas dessas cepas possuem uma ilha de patogenicidade (PAI) conhecida como a citotoxina associada ao gene A (cag A), com tamanho aproximado de 40 Kb, que

em associação com a citotoxina vacuolizadora (vac A) lhe confere uma maior virulência (Montecucco et al., 2001).

Pacientes nos quais são detectados anticorpos para HP apresentam até seis vezes mais possibilidades de desenvolver câncer gástrico do que pacientes sem anticorpos para a bactéria (Grymley et al., 1998).

Essa relação entre o HP e as doenças que acometem o estômago levaram a Agência Internacional para Pesquisa contra Câncer em 1994, a considerá-lo como carcinógeno Classe I, por sua colonização poder ser capaz de induzir carcinogênese sem a administração de co-carcinógenos (Ilver et al., 1998, Kontruck et al., 2001, IARC, 2003).

Tais características fazem do HP um importante microorganismo e seu estudo vêm despertando grande interesse na comunidade científica internacional, conforme observado pelo grande número de trabalhos que tratam deste assunto nestes últimos anos.

1.2 Epidemiologia

HP é um dos patógenos gastrointestinais mais comuns em humanos, estimando-se que mais de 50% da população humana esteja infectada, sendo que um mesmo indivíduo pode estar infectado por diferentes cepas de HP (Fenoglio-Preise et al., 1988, Dudon et al., 2001). Esse índice ainda é maior quando consideramos indivíduos de uma mesma família devido ao modo de contágio que inclui contato íntimo, uso em comum de talheres, copos, etc. (Marshall et al., 1984). Não são raras as reinfecções após tratamento

principalmente porque o HP pode ser encontrado também na placa dental (Fenoglio-Preiser et al., 1988).

Felizmente, apenas uma minoria dos indivíduos infectados desenvolve úlceras pépticas (Mattar et al., 2000), ou tumores, mostrando que essas doenças são multifatoriais e que há certamente uma pré-disposição genética do hospedeiro, além do ambiental, envolvido na gênese das mesmas (Fox et al., 1997).

A identificação do HP em biópsias gástricas é de fundamental importância devido a sua associação a tumores gástricos. Estimativas de Incidência e Mortalidade por Câncer (INCA, 2003), mostram que 20.420 novos casos (taxa bruta de 23,52 por 100.000 habitantes) de câncer de estômago estavam previstos para o ano de 2002, no Brasil. Sessenta e oito por cento dos casos foram encontrados nos homens e 65% dos pacientes tinham mais de 50 anos com pico de incidência aos 70 anos. Em relação a mortalidade por câncer no Brasil, o tumor de estômago ocupa o quarto lugar no número de óbitos entre os homens e o quinto entre as mulheres, sendo o segundo lugar em óbitos no mundo (INCA, 2003).

Estudo brasileiro realizado por Queiroz et al. (1998), demonstrou uma incidência de 67,5% de HP cagA+ em grupo de pacientes controle e 92% em pacientes com câncer.

No resto do mundo, dados estatísticos revelam um declínio da incidência do câncer gástrico especificamente nos Estados Unidos, Inglaterra e em outros países desenvolvidos.

Uma alta mortalidade é registrada atualmente na América Latina, principalmente nos países como Costa Rica, Chile e Colômbia. Porém, o maior número de casos de

câncer de estômago ocorre no Japão, onde são encontrados 780 casos por 100.000 habitantes (INCA, 2003).

1.3 Aspectos Bioquímicos e Imunológicos do HP

A camada de muco que protege as células epiteliais e recobre a mucosa do estômago é produzida por células que secretam grânulos contendo grande quantidade de proteínas glicosiladas. Estas proteínas são secretadas junto com uma camada adicional de fosfolipídeos de superfície ativa localizada fora do lúmen do estômago, formando uma contínua camada protetora (Montecucco et al., 2001).

De fato o muco atua como barreira semipermeável que permite a passagem dos prótons de H^+ das células da mucosa gástrica que secretam ácido hidrocloreídrico para o lúmen do estômago, resultando em um gradiente de pH fortemente ácido. (Montecucco et al., 2001).

Os suprimentos de nutrientes necessários para o crescimento bacteriano, incluem essencialmente íons de Fe^{3+} e Ni^{2+} , sendo limitados pela baixa permeabilidade da camada de muco e da tensão da monocamada epitelial polarizada. Para compensar isso a bactéria produz hidrólise enzimática, a qual pode alterar a integridade da mucosa, fazendo com que ocorra maior permeabilidade aos nutrientes necessários para o seu crescimento (Montecucco et al., 2001).

O HP é recoberto por estruturas fibrilares circulares as quais facilitam sua adesão às células epiteliais gástricas e dificulta a sua eliminação pelos movimentos peristálticos. Esta aderência da bactéria é mantida por diversas proteínas e glicoproteínas, como por

exemplo, BabA, uma proteína de membrana da bactéria que se adere ao antígeno Lewis da célula epitelial (Boren et al., 1993, Smoot et al., 1993, Peek et al., 1996), secretando fatores que atraem e estimulam células inflamatórias (Montecucco et al., 2001).

Através da produção de proteases e lipases a bactéria interfere na estrutura, integridade, síntese e secreção de muco gástrico e lesam a membrana lipoproteica das células epiteliais de revestimento. A urease converte a uréia endógena captada pelo HP em amônia e gás carbônico que tampona o pH e cria uma camada neutra protetora em torno da superfície da bactéria (Marshall e Langton, 1986). A urease e a amônia promovem a desestabilização da camada de muco que conseqüentemente pode levar a formação de lesões sobre as células de revestimento (Moblely et al., 1998, Hu e Mobley, 1990, Megrau et al., 1992). A urease pode também estar envolvida na ativação de neutrófilos, monócitos e do sistema imune produzindo lesão inflamatória local (Nielsen e Andersen, 1992, Graig et al., 1992, Mai et al., 1992).

Ainda envolvida nesse mecanismo temos uma proteína de 150 Kda denominada proteína ativadora dos neutrófilos pelo HP (HP-NAP), considerada responsável pela adesão dos neutrófilos nas células epiteliais (Evans et al., 1994).

Ainda quanto à resposta do sistema imunológico do hospedeiro contra a infecção pelo HP através de componentes bacterianos observa-se a indução da liberação de citocinas as quais ativam as células inflamatórias. Estas respostas imunológicas do hospedeiro que participam do processo inflamatório incluem a liberação de interleucina 8 (IL-8), citocina produzida pelas células epiteliais infectadas e que participa da migração de neutrófilos (Baggiolini et al., 1989, Crowe et al., 1993, Crabtree et al., 1994).

Há evidências de que células imunoinflamatórias, linfócitos T e os linfócitos B produtores de IgG (imunoglobulina G) estão aumentadas na mucosa gástrica infectada pelo HP (Fan et al., 1994, Sepulveda et al., 2002).

1.4 Fatores de Patogenicidade

HP são classificados em cag+ e cag-, dependendo da presença de uma seqüência de aproximadamente 40 Kb, contendo cerca de 30 genes conhecida como ilha de patogenicidade (PAI). PAI é um fragmento genômico de 40 Kb que contém 21 genes, flanqueados por elementos transponíveis geralmente adquiridos por transferência horizontal, que codificam uma maquinaria de exportação do tipo IV, especializada no transporte de uma variedade de outras células (Covacci et al., 1999). Além da secreção de IL-8, as proteínas codificadas pelo cag PAI são responsáveis pelo remodelamento da superfície da célula epitelial e formação do pedestal (Segal et al., 1995, Glocker et al., 1998).

A presença da PAI aumenta a patogenicidade da bactéria, (Montecucco et al., 2001), estando diretamente relacionada com o aumento da virulência, medida pela resposta inflamatória do estômago, (Yamaoka et al., 1999). Muito estudo tem demonstrado uma grande correlação entre a infecção pelo HP associado ao cag A+ e a gravidade da doença gastrointestinal. Esse tipo tem sido visto com maior prevalência nas gastrites atróficas, úlceras pépticas e nos cânceres gástricos, especialmente no linfoma tipo MALT (Krausse et al., 2001).

Os HPs pode ser divididos em 2 tipos:

O HP tipo I expressa *cagA*+ associada a citotoxina vacuolizadora *vacA*, já no tipo II não há expressão do *cagA* associada ao *vacA* (Yamaoka et al., 1998).

A citotoxina vacuolizadora (*vacA*), foi demonstrada no sobrenadante de metade dos HPs isolados, induzindo à formação de grandes vacúolos citoplasmáticos em células eucariotas de cultura. Esses vacúolos aparecem dentro da área perinuclear e podem aumentar de tamanho até preencher todo o citosol, direcionando eventualmente para a morte celular por necrose. Esta proteína responsável pela vacuolização celular foi mais tarde purificada encontrando-se um produto de 95 KDA (Dundon et al., 2001).

Apesar do *vacA* estar presente em todos HPs, observou-se que a proteína só é exportada para o meio de cultura em bactérias contendo alelos específicos do gene *vacA*.

O polimorfismo alélico do gene em questão está presente em duas regiões, uma primeira que contém a sequência sinal (*s*), envolvida no transporte da toxina, podendo ocorrer os alelos *s1* e *s2* (subdivididos em *s1a*, *s2b* e *s1c*) e uma segunda região de aproximadamente 600pb da região mediana do gene (*m*), ocorrendo os alelos *m1* e *m2*, podendo também ser subdivididos em *m1a*, *m1** e *m2**, *m2a* e *m2b* (Dargeruta et al., 2000, Chin-Wenl et al., 2000).

A virulência da bactéria pode variar de acordo com as diferentes combinações destes alelos (Artherton et al., 1997):

Tipo *s1/m1*= ocorrência de transporte da toxina vacuolizante em um alto nível

Tipo *s1/m2*= ocorrência de transporte da toxina vacuolizadora, porém em baixo/moderado nível

Tipo *s2/m2*= ausência de atividade da toxina em sobrenadante de cultura

Tipo s2/m1= não foi detectada a presença deste alelo, até o momento

Dentro do alelo s1a parece estar associado a maior indução de infiltrado de neutrófilos e linfócitos na mucosa gástrica infectada do que s1b (Door et al., 1998).

Kodama et al. (1999) mostraram que pacientes com câncer gástrico, úlcera duodenal e gastrites no Japão apresentam infecção por HP classificados como s1a.

Xiang et al. (1995) verificaram que as bactérias do tipo I expressavam a citotoxina vacuolizante codificado pelo gene *vacA* e a proteína denominada citotoxina associada codificada pelo gene *cagA*, enquanto as do tipo II só expressavam *vacA*, indicando que o *cagA* está diretamente relacionado a patogenicidade das bactérias (Telford et al., 1994).

Recentemente Uemura et al. (2001), demonstraram a ocorrência do câncer gástrico em 3% dos pacientes infectados, mas em nenhum indivíduo não infectado pelo HP. O mecanismo da carcinogênese na infecção pelo HP não são completamente esclarecidos, mas existem evidências que PAI presente em cepas HP *cagA*+ estejam relacionadas com os efeitos virulentos da bactéria principalmente devido ao aumento da secreção de IL-8, podendo contribuir na produção de radicais livres que direta ou indiretamente podem promover o desenvolvimento e progressão tumoral (Peng et al., 1998).

Tanto o gene *cagA* (o qual pode ser considerado um marcador para a presença da região genômica que codifica o sistema IV), quanto os alelos s1 e m1 do gene *vacA*, independentemente, parecem estar envolvidos na maior virulência do HP. Em favor desta hipótese verificou-se que mutantes de HP *cagA*-, *picB* (outro gene da região genômica que codifica o sistema de secreção tipo IV) e *vacA*-, testados separadamente diminuem a apoptose e aumentam a viabilidade das células gástricas (Peek et al., 1999).

Além disso, cada um dos genes citados parece interferir nas fases específicas do ciclo celular, podendo ser este um dos fatores responsáveis pela predisposição dos pacientes infectados ao desenvolvimento de câncer e outros distúrbios do ciclo celulares.

1.5 Aspectos Clínicos

1.5.1 Relação do HP com as Gastrites e as Úlceras Gástricas

A infecção pelo HP tem íntima relação com as gastrites e as úlceras, podendo induzir infiltração da mucosa por células inflamatórias. Nas gastrites crônicas induzidas pela bactéria, nota-se um aumento dos danos na superfície epitelial, erosão e atrofia da mucosa gástrica, bem como o aumento de proliferação epitelial, sendo esta não contrabalançada pela morte celular, sugerindo que a apoptose possa explicar a aparente perda celular nas gastrites crônicas (Rudi et al., 1998).

O HP pode estar presente preferencialmente na região cárdica, mas pode ser encontradas em ambas as regiões (cárdica e antral) (Fenoglio-Preise et al., 1998).

O HP está intimamente ligado a essas patologias, sendo que o tratamento e erradicação do microorganismo estão associados à redução da inflamação. A mais importante implicação do HP talvez não esteja relacionada com a gastrite, mas sim com a patogenia e o prognóstico da úlcera gástrica (Lewin et al., 1989).

1.5.2 Relação do HP com Linfoma de Baixo Grau, Associado à Mucosa Gástrica (Linfoma Tipo MALT)

Os linfomas associados à mucosa gástrica originam-se no tecido linfóide da lâmina própria e da submucosa. Aqui, as células proliferam e infiltram a mucosa, produzindo massas nodulares ou polipóides, solitárias ou múltiplas, geralmente ulceradas, que se projetam para a luz (Carvalho et al., 1981).

Os linfomas tipo MALT podem ser estimulados pelo HP. Esse efeito tipo-específico é dependente das células T, que são estimuladas ao reconhecerem o HP, liberando citocinas que estimulam uma maior proliferação celular podendo levar à formação de tumor.

Alguns estudos sugerem que o HP está mais associado a precursor inicial na fase da gênese do linfoma gástrico MALT, pois a densidade da bactéria parece diminuir com a progressão do tumor (Nakamura et al., 1998).

Entretanto quando o HP é totalmente erradicado nota-se regressão do tecido tumoral, demonstrando a relação do HP com esse tipo de linfoma (Fenoglio-Preisei et al., 1998).

1.5.3 Relação do HP com o Adenocarcinoma Gástrico

Os adenocarcinomas gástricos originam-se nas células epiteliais do epitélio gástrico e assumem formas, tamanhos e características invasivas muito diversas. Tanto a

macroscopia, como a histologia fornecem elementos úteis para uma classificação que melhor se correlacione com o prognóstico (Carvalho et al., 1981).

O câncer gástrico é visto numa maior frequência em pacientes com gastrite atrófica, aumentando a incidência após os 50 anos, principalmente naqueles indivíduos, onde houve diagnóstico de gastrite atrófica há mais de 10 anos (cerca de 7 a 20%).

A infecção por HP parece servir de cofator na carcinogênese gástrica. Na China, a incidência de soroprevalência positiva para HP se sobrepõe a do câncer gástrico. Entretanto, nem todo indivíduo com HP desenvolve a doença, mostrando que existem outros fatores envolvidos no desenvolvimento da doença (Cotran et al., 1994).

1.6 Testes Diagnósticos para Detecção do HP (métodos invasivo e não invasivo)

Existem várias metodologias para identificação do HP como por exemplo a sorologia e o teste respiratório, estes considerados não invasivos. Já como testes invasivos temos o teste URT, a cultura, histologia, e mais recentemente a reação em cadeia da polimerase (PCR), usada neste trabalho para a identificação da bactéria e sua genotipagem.

1.6.1 Relação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica da PCR é rápida, altamente sensível e específica por utilizar uma sequência conhecida do gene do HP, bastando para isso poucas cópias para a

amplificação do gene da bactéria, podendo inclusive se classificar os HPs em cagA+ ou cagA-.

Outra vantagem que devemos ressaltar é de se poder utilizar essa técnica em diversos tipos de materiais biológicos, inclusive material parafinado, o qual nos permite realizar grandes estudos retrospectivos.

O método baseia-se na amplificação enzimática de um fragmento de DNA pela extensão de dois oligonucleotídeos (“primers”), que hibridizam com as fitas complementares de uma seqüência molde (“template” ou alvo). As extremidades 3’ dos “primers” são orientadas apontando uma em direção á outra. O procedimento envolve repetidos ciclos com variações de temperatura, que permitem desnaturação do DNA molde, hibridização dos “primers” ás suas seqüências complementares e extensão dos “primers” hibridizados pela DNA polimerase. O resultado, ao final de múltiplos ciclos, é o acúmulo exponencial de um fragmento específico cujas extremidades são definidas pelas extremidade 5’ dos “primers” (Barnard et al., 1994).

1.6.2 Proliferação Celular / Apoptose

A integridade do tecido é mantida pelo equilíbrio da morte celular pela apoptose e a produção de novas células pela proliferação celular. Quando ocorre a hiperproliferação não balanceada pela morte celular, há uma maior chance de transformação maligna, podendo ser esse desequilíbrio um importante mecanismo da carcinogênese (Peek et al., 1997, Siefried et al., 1997).

O HP parece estar diretamente associado a alteração desse mecanismo, sendo que estudos mostram que após sua erradicação os níveis de proliferação e apoptose voltam ao normal (Moss et al., 2001).

Esse desequilíbrio da apoptose parece estar associado à atividade das citotoxinas, podendo alterar ou bloquear a morte celular, dependendo do contexto celular e o envolvimento do tecido (Houghton et al., 1999).

É possível que em indivíduos com pré-disposição genética a resposta imunológica em relação à bactéria esteja alterada. Provavelmente outros mecanismos estejam ligados a transformação maligna, incluindo aumento no “turn over” celular, danos na mucosa gástrica por radicais livres, redução da concentração de ácido ascórbico no suco gástrico (Peek et al., 1997)

2 OBJETIVO

- Avaliar a correlação entre proliferação celular e apoptose (morte celular programada), em relação a presença ou não do HP e da ilha de patogenicidade (PAI/cagA).

3 Casuística e Métodos

3.1 Casuística

3.1.2 Aspectos Gerais

O desenho desse estudo é retrospectivo transversal com consentimento permitido partindo de trezentos pacientes com indicação clínica para serem submetidos a endoscopia e biópsia gástrica. Os procedimentos foram realizados pela equipe do Serviço de Endoscopia do Hospital Sírio Libanês de São Paulo (HSL), no período de 10 de janeiro de 1998 a 07 de janeiro de 2002 . Cento e quarenta (46,7%) pacientes eram do sexo masculino e 160 (53,3%) do sexo feminino com idade média de 58 anos (9 – 92).

A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética do HSL, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, e pela 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.

3.2 Métodos

3.2.1 Exame Histopatológico

As biópsias foram fixadas em formalina 10% por um período de 4 a 16 horas, sendo totalmente submetidos a estudo histopatológico. Processado automaticamente em banhos de formol, etanol e xilol, seguido por inclusão em parafina.

As mesmas amostras foram utilizadas para todas as metodologias empregadas nesse estudo. De cada bloco de parafina foram realizados cortes de 4 a 6 μm de espessura, colocados em lâmina de vidro, corados pela técnica de Hematoxila e Eosina, e analisados em microscópico óptico, pelos patologistas do Laboratório de Patologia Cirúrgica e Molecular do HSL, sendo as amostras subdivididas de acordo com o diagnóstico histopatológico (tabela 1).

Tabela 1: Número de pacientes em relação ao diagnóstico histopatológico

Diagnóstico Histológico	Nº de Pacientes (%)
Adenocarcinoma	17 (5,6)
Linfoma Tipo MALT	8 (2,6)
Gastrite Leve	79 (26,3)
Gastrite Moderada	35 (11,6)
Gastrite Grave	15 (5,0)
Gastrite Atrófica	26 (8,6)
Úlcera Gástrica	58 (19,3)
Mucosa Normal	3 (1,0)
Pólipo Hiperplásico	56 (18,6)
Pólipo Adenomatoso	3 (1,0)
Total	300 (100,0)

3.2.2 Extração do DNA

O DNA das biópsias preservadas em parafina foi extraído com proteinase K e purificação com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico de acordo com Volkenandt et al. (1993), com algumas modificações.

De 3 a 4 cortes com cerca de 7 μ m das biópsias gástricas previamente emblocadas em parafina foram feitos de cada paciente. Este material foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, estéreis (Axigen Scientific, Califórnia, EUA).

A desparafinização das biópsias foi realizada com três lavagens de xilol, sendo que este foi previamente aquecido a 80°C. A cada microtubo foi adicionado 1,0 ml de xilol quente e a amostra foi incubada por 30 minutos a 37°C. Em seguida, os microtubos foram submetidos a centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos a 25°C em centrífuga refrigerada (JOUAN, modelo MR 1822, França). Este procedimento foi repetido duas vezes.

A seguir, duas lavagens com 0,5 ml de etanol absoluto foram realizadas à temperatura ambiente (TA). As centrifugações foram a 13.000 rpm por 5 minutos a 4°C, sempre desprezando-se o sobrenadante. Após a última centrifugação as amostras foram incubadas a 37°C por 16 horas com tampão contendo Tris-HCL 1,0 M, pH 8,0 (Tris Ultra Pure TM, Gibco BRL, Gaithesburg, MD, USA), EDTA 0,5 M, pH 8,0 (USB, Cleveland, Ohio) e Tween 20 a 0,25 M (polyxiethylene sorbitan mono-laurate, Sigma

Chemical Co, St. Louis, MO, USA), adicionando-se 0,6 mg/ml (pelo menos 12U/mg) de proteinase K (USB).

Após período de incubação, as amostras foram submetidas a aquecimento, a 95°C durante 10 minutos, para inativação da proteinase K. A seguir, 0,5 ml de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1 – v/v – UBS) foi adicionado a cada tubo, agitando-se vigorosamente por aproximadamente 1 minuto. O material foi centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi transferido para microtubo estéril e novamente submetido à purificação com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Após agitação e centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo esterilizado e o DNA precipitado com 40µl de acetato de sódio 3,0 M (pH 5,2) (Merck, Alemanha) e 2,5 volumes de etanol absoluto previamente refrigerado a 4°C. Os tubos foram mantidos por 30 minutos a –20°C e as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado contendo o DNA foi seco à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensionado em H₂O autoclavada (50 µl) e armazenado a –20°C até o momento do uso.

3.2.3 Otimização da técnica de Reação da Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi primeiramente feita em todas as amostras contidas nesse estudo para identificação do HP, utilizando-se “primers” específicos para a região 16S-rRNA, segundo Scholte et al. (1997), (tabela 2).

Para os casos HP positivos, uma nova PCR foi realizada para a identificação da presença do gene *cagA*, também utilizando-se “primers” específicos para a região do gene *cagA*, segundo Peng et al. (1998), com algumas modificações (tabela 2).

A reação foi realizada com volume final de 50µl, tanto para a identificação do HP como do *cagA*, contendo tampão para PCR – 1X (KCl 5,0 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris-HCl 1,0 mM, pH 9,0), 200µM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; (Amersham Pharmacia Biotech), com concentração final dos oligonucleotídeos de 0,5 µM para HP e 0,2 µM para *cagA* (Life Technologies e Invitrogen), cloreto de magnésio 1,5 mM para o HP e 3,0 mM para o *cagA*, 1,25 U de enzima *Taq* DNA polimerase para o HP e de 5U para o *cagA* (Amersham Pharmacia Biotech), e água deionizada estéril. Sendo utilizado para a PCR do HP 45,0 µl da mistura acima descrita e 5,0µl do DNA previamente extraído. Já para a PCR do *cagA* foi utilizado 40,0 µl da mistura acima descrita e 10 µl do DNA das amostras previamente extraídas onde a PCR para o HP foi positiva.

O ciclo para cada reação da PCR encontra-se na tabela 3.

Tabela 2 : Seqüência dos Oligos Nucleotídeos para *Helicobacter pylori* e *cagA*

Oligonucleotídeo	Seqüência
HP11	CTG GAG ARA CTA AGY CCT CC
HPX2	GAG GAA TAC TCA TTG CGA AGG CGA
CagA1	TCA GAA ATT TGG GGG AMT CAG
CagA2	TCA TCA ARG GAR TAG GGG TTG

Sendo ambos os primers degenerados, ou seja quando não se tem certeza da base a ser inserida em um determinado local, pode ser feita a combinação de uma até quatro bases no local para a síntese, neste caso foram inseridas duas bases no local determinado, conforme descrito abaixo:

R= A+G, Y= T+C e M= A+C

Tabela 3: Condições da reação da PCR para *Helicobacter pylori* e cagA

PCR	Desnaturação	Hibridação	Extensão
<i>Helicobacter pylori</i> (35 ciclos)	95°C / 1'	65°C / 1'	72°C / 1'
CagA (40 ciclos)	94°C / 30''	58°C / 30''	72°C / 45''

Os dois ciclos foram seguidos de uma extensão final a 72°C, sendo para a PCR do HP por 10 minutos e de 5 minutos para a PCR do cagA, com resfriamento a 4°C para interrupção do ciclo.

Os produtos das PCRs foram corridos em gel de agarose a 2% (Amersham Pharmacia Biotech AB, Suíça), corados com brometo de etídeo (Amersham Pharmacia Biotech AB, Suécia) por 10 minutos e visualizados em sistema computadorizado (Gel Doc 1000, Bio-Rad).

O produto esperado para o HP é de 145 bp (Scholte, G.H. et al; 1997) e do cagA 133 bp (Peng, H. et al; 1998).

3.2.4 Avaliação da Proliferação Celular

A técnica utilizada foi a descrita por Taylor e Cote (1994) com algumas modificações, onde em 164 amostras (111 pacientes HP positivos e/ou cagA positivos e 53 pacientes negativos), cortes de 4 a 6 μm de cada bloco de parafina contendo as biópsias gástricas, foram feitos em lâminas silanizadas, foram desparafinadas em estufa a 60°C por 30 minutos e em banho com xilol aquecido. Após hidratação com álcoois graduados (99°, 95° e 80°), foram lavados em águas corrente e destilada (H_2O) e submetidas a desmascaramento antigênico pelo calor. As lâminas foram submersas em tampão citrato 1mM, pH 6,0 em microondas doméstico, na potência máxima, por 5 minutos. Após resfriamento e lavagem em H_2O , foram submetidas a bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 a 3% (10 vol.) em 2 banhos de 5 minutos. Após lavagens em água corrente e tampão Tris-HCL 0,05 M, pH 7,6, foram incubadas com anticorpo primário baixo descrito diluído em albumina de soro bovino e tampão fosfato salino (PBS).

O anticorpo de camundongo anti-Ki-67, reage com Ki-67, proteína de função desconhecida, presente em todas as fases do ciclo célula, exceto G0, fiel refletora da proliferação celular (Gerdes et al, 1984, Cattoretti et al, 1992). O clone usado foi MIB-1 (Immunotecch Marselha, França) na diluição 1:100.

O anticorpo foi incubado por 30 minutos a temperatura ambiente (TA) Após lavagens em Tris-HCL para remoção do anticorpo ligado de maneira não específica, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário, complexo estreptavidina biotina, 1:400, e complexo de amplificação avidina-biotina-peroxidase (StreptABC kit, Dako, Glostrup, Dinamarca).

Diaminobenzidina (DAB) foi utilizada como substância cromogênica, 1mg/ml em tampão PBS, acrescido de peróxido de hidrogênio 0,02% por 15 minutos. As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris, 3 minutos, seguidas por banhos de hidróxido de amônia a 10%, água corrente e destilada.

Segue desidratação em álcool com diferentes graduações (50%, 80%, 95% e 99%), clareamento em 3 banhos de xilol, seguida da montagem com lamínula.

A reação foi realizada em equipamento automatizado (Cadenza – Shandon, Pittsburgh, EUA).

As lâminas foram observadas em microscópio óptico, onde foram analisadas pelo menos 500 células em área de maior positividade e porcentagem de núcleos positivos, denominado atividade proliferativa para Ki-67.

3.2.5 Detecção da Apoptose

A técnica utilizada foi a do TUNEL com o kit TDT-Frag-EL (Oncogene Cambridge, EUA) cujo princípio baseia-se no fato do processo de apoptose resultar em quebra do DNA nas regiões internucleossomais, expondo os radicais 3'-OH. As biópias foram hibridizadas com transferase dextrinucleotil terminal (TdT) e conjugadas com complexo, estreptavidina *horseradish* peroxidase. Diaminobenzidina (DAB) reage com o tecido gerando substrato corado insolúvel que caracterizam as células em processo de apoptose (Gavrieli et al, 1992).

Das mesmas 164 amostras utilizados para a imunohistoquímica, foram feitos cortes de 5µm em lâminas silanizadas, desparafinadas em xilol, duas vezes, 5 minutos a TA. Estas foram seguidas por lavagens com álcool com diferentes graduações (99%, 90%, 80% e 70%) duas vezes, cada por 3 minutos a TA, passadas em 1X em Tris- Borato Salino (TBS) e incubadas por 20 minutos a TA com solução de permeabilização (Proteinase K 2mg/ml, 10mM Tris pH 8,0).

Após a lavagem com TBS foram submetidas à inativação da peroxidase endógena, incubando-se por 5 minutos a TA com H₂O₂ 30% diluída 1:10 em metanol (Merck, Alemanha). A reação foi equilibrada com incubação das lâminas por 20 minutos a TA com tampão de equilíbrio 5X TdT (1 M cacodilato de sódio, 0.15 M Tris, 1,5 mg/ml BSA, 3,75 mM CoCl₂, pH 6,6) diluído em H₂O 1:5.

A marcação se deu com a incubação das lâminas em câmara úmida, em estufa a 37°C por 1 hora e 30 minutos com mistura para marcação TdT contendo desoxinucleotídeos marcados e não marcados e enzima PDT. A reação foi interrompida

com incubação por 5 minutos a TA com solução de parada (0,5 M EDTA pH 8,0), sendo a detecção foi obtida com incubação das biópsias com BSA 4% em PBS por 10 minutos a TA, seguido por incubação com conjugado estreptavidina peroxidase diluído em solução de parada 1:50 em câmara úmida por 30 minutos.

A coloração foi obtida com o uso de DAB (10 minutos, TA), e contracoradas com verde de metila, desidratadas com banhos graduados de álcool, xilol e montadas com lamínula.

Foram visualizadas em microscópio óptico, onde foram contados os núcleos positivos na área de maior positividade, corados em marrom em pelo menos 200 células examinadas. A porcentagem de células positivas em relação às contadas foi denominada índice de apoptose.

3.2.6 Relação Proliferação (IP) / Apoptose (IA)

Nas 164 amostras independentes do diagnóstico histopatológico ou de serem HP e/ou cagA positivo ou negativo, onde foram avaliadas a atividade de proliferação celular (Ki-67) e índice de apoptose (TUNEL), procuramos determinar a relação do índice da proliferação global, usando a equação abaixo:

ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO (IP) = ATIVIDADE PROLIFERATIVA (Ki-67)

ÍNDICE DE APOPTOSE (TUNEL)

3.2.7 Análise Estatística

O teste Mann-Whitney foi usado para avaliação das variáveis quantitativas, proliferação e apoptose. Usamos regressão logística multivariada para determinarmos o risco relativo do desenvolvimento de doença gástrica grave. Em todas as análises o valor crítico utilizado foi de 0,05 . Os teste foram realizados em programa de computador SPSS versão 10 (SPSS inc. Chigago, IL).

4 Resultados

I- Identificação do *Helicobacter pylori* (HP) através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Das 300 amostras estudadas 111 (37%), foram positivas para a presença do HP, através da técnica da PCR, utilizando os “Primers” específicos HP1.1 e HPX2 (tabela 42), para a região 16S-rRNA (figura 1).

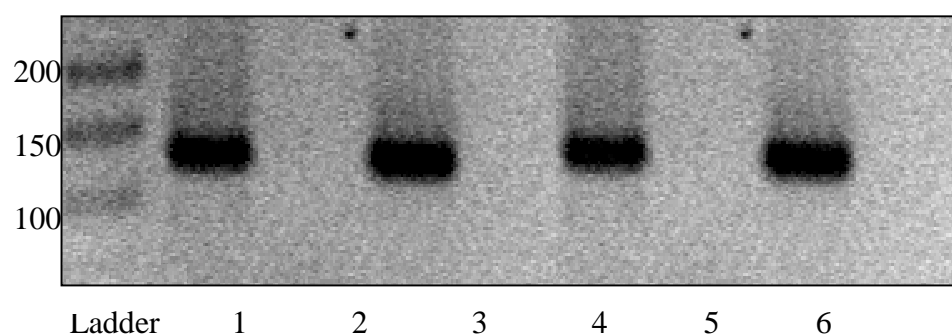


Figura 1: Gel de agarose 2% para visualização do produto amplificado do HP. Utilização dos “primers” HP1.1 e HPX2, com amplificação do fragmento de 145 pb (pares de bases). “Ladder”: padrão de peso molecular de 50 pb, colunas de 1 a 5 pacientes, (+) controle positivo e (-) controle negativo

Nossos resultados estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4: Distribuição do nº de pacientes em relação ao diagnóstico histopatológico com PCR para HP.

DIAGNÓSTICO	N (%) ^A	HP+ (%) ^B
Adenocarcinoma	17 (5,6)	4 (23,5)
Linfoma Tipo MALT	8 (2,6)	5 (62,5)*
Gastrite Leve	79 (26,3)	15 (19,0)
Gastrite Moderada	35 (11,6)	27 (77,1)*
Gastrite Grave	15 (5,0)	13 (86,6)*
Gastrite Atrófica	26 (8,6)	4 (15,4)
Úlcera Gástrica	58 (19,3)	32 (5,2)*
Mucosa Normal	3 (1,0)	0 (0,0)

Pólipo Hiperplásico	56 (18,6)	10 (17,8)
Pólipo Adenomatoso	3 (1,0)	1 (33,3)
Total	300 (100,0)	111 (37,0)

($p < 0,0001$)

A: % em relação ao nº inicial de pacientes (300)

B: % de pacientes com o diagnóstico HP+ em relação ao diagnóstico histopatológico

Observamos maior frequência de HP positivos (*), nas gastrites moderada (77,7%), grave (86,6%), nas úlceras gástricas (55,2%) e nos linfomas tipo MALT (62,5%), quando comparamos com indivíduos HP negativos em relação ao diagnóstico histopatológico.

II- Genotipagem do Marcador de Patogenicidade (cagA) do *Helicobacter pylori*

A partir dos 111 amostras positivos para HP, identificamos 45 (40,5%) amostras positivas para citotoxina associada ao gene A (cagA), através de uma nova PCR, utilizando os “primers” específicos cagA1 e cagA2 (tabela 2).

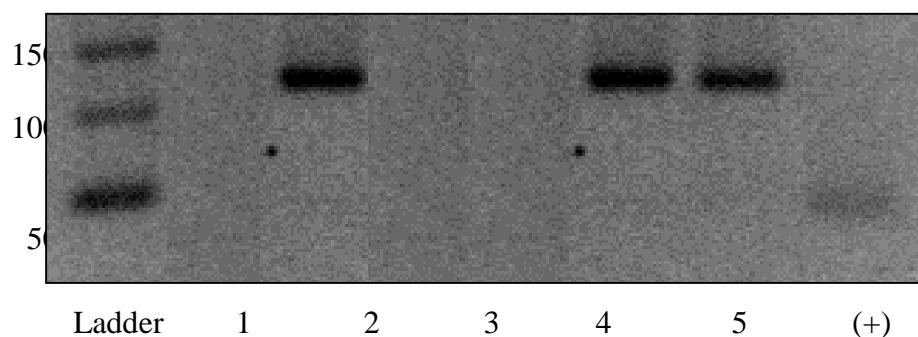


Figura 3: Gel de agarose 2% para visualização do produto do fragmento amplificado do *cagA*. Utilização dos “primers” *cagA1* e *cagA2*, com amplificação do fragmento de 133 pb (pares de bases). “Ladder”: padrão de peso molecular de 50 pb, colunas de 1 a 5 pacientes, (+) controle positivo e (-) controle negativo.

Nossos resultados estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5: Distribuição do nº de pacientes HP+ e *cagA*+ em relação ao diagnóstico histopatológico.

DIAGNÓSTICO	HP+ (%)^A	<i>cagA</i>+ (%)^B
Adenocarcinoma	4 (23,5)	4 (100,0)*
Linfoma tipo MALT	5 (62,5)	3 (60,0)*
Gastrite Leve	15 (19,0)	1 (6,6)

Gastrite Moderada	27 (77,1)	6 (22,2)
Gastrite Grave	13 (86,6)	3 (23,0)
Gastrite Atrófica	4 (15,4)	2 (50,0)
Úlcera Gástrica	32 (55,2)	23 (71,9)*
Mucosa Normal	0 (0,0)	0 (0,0)
Pólipo Hiperplásico	10 (17,8)	3 (27,3)
Pólipo Adenomatoso	1 (33,3)	0 (0,0)
Total	111 (100,0)	45 (40,5)

($p < 0,0001$)

A: % de indivíduos com diagnóstico positivo para HP, em relação ao n° inicial de pacientes (300)

B: % de indivíduos com diagnóstico positivo para cagA, em relação ao HP+ e ao diagnóstico ao histológico

Observamos maior frequência de cagA positivos (*), nos adeno-carcinomas (100,0%), linfomas tipo MALT (60,0%) e nas úlceras gástricas (71,9%), quando comparados aos indivíduos cagA negativos.

Quanto a idade subdividimos o grupo em intervalos de 20 anos para melhor relacionarmos com a presença de HP e/ou cagA positivo (tabela 6).

Tabela 6: Distribuição do n° de pacientes HP+ e cagA+ em relação a faixa etária.

Idade	n (%)	HP+ (%)	cagA+ (%)
0 a 20	9 (3,0)	2 (22,2)	1 (50,0)
21 a 40	52 (17,3)	15 (28,8)	6 (40,0)
41 a 60	103 (34,3)	43 (41,7)	18 (41,8)
61 a 80	111 (36,6)	43 (41,4)	17 (39,5)
81 a 92	25 (8,3)	8 (32,0)	3 (37,5)
Total	300 (100,0)	111 (37,0)	45 (40,5)

Observamos maior prevalência da infecção pelo HP na faixa etária entre 41 e 80 anos (não levando em conta sexo), não ocorrendo o mesmo para a distribuição do cagA, onde não notamos diferença na distribuição em relação ao idade.

Para tentarmos caracterizar melhor a presença da infecção, subdividimos o grupo, quanto a idade, sexo, HP e/ou cagA positivos (tabela 7 e 8).

Tabela 7: Distribuição do n° de pacientes HP+ e cagA+ do sexo feminino em relação a faixa etária.

Idade	N (%)	HP+ (%)	CagA+ (%)
--------------	--------------	----------------	------------------

0 a 20	7 (4,3)	1 (14,3)	0 (0,0)
21 a 40	28 (17,5)	9 (32,1)	2 (22,2)
41 a 60	56 (35,0)	21 (37,5)**	8 (38,0)
61 a 80	56 (35,0)	18 (32,1)	8 (44,4)*
81 a 92	13 (8,1)	6 (46,1)**	2 (33,3)
Total	160 (100,0)	55 (34,4)	20 (36,6)

Tabela 8: Distribuição do n° de pacientes HP+ e cagA+ do sexo masculino em relação a faixa etária.

Idade	n (%)	HP+ (%)	cagA+ (%)
0 a 20	2 (1,4)	1 (50,0)	1 (100,0)*
21 a 40	24 (17,1)	6 (25,0)	4 (66,6)*
41 a 60	47 (33,6)	22 (46,8)**	10 (45,4)
61 a 80	55 (39,3)	25 (45,4)**	9 (36,6)
81 a 92	12 (8,6)	2 (16,6)	1 (50,0)
Total	140 (100,0)	56 (40,0)	25 (44,6)

Considerando apenas o sexo (masculino/feminino), encontramos a presença da infecção pelo HP igualmente para ambos. Já com relação a presença do cagA, parece haver uma maior prevalência no sexo masculino. Quando relacionamos sexo e idade, observamos que nas faixas etárias entre 41 e 60 anos e 61 e 80 anos, uma maior incidência de HP+ (**) (46,8% e 45,4%), quando comparada com a mesma faixa etária no sexo feminino HP+ (**) 37,5% e 32,1%), respectivamente.

Apesar do número pequeno de pacientes HP+ nas faixas etárias entre 0 e 20 anos (1/1-100,0%) e 21 e 40 anos (4/6-66,6%), observamos no sexo masculino uma alta incidência de cagA+ nesse grupo, nos sugerindo que esta infecção pode ser precoce e tornar-se crônica, acarretando sérios danos a mucosa gástrica.

Surpreendentemente ao contrário do esperado e descrito na literatura por alguns autores, encontramos um número grande de pacientes do sexo feminino, levando-se em conta o número de pacientes na faixa etária entre 81 e 92 anos, infectadas por HP (**) (6/13-46,1%).

III- Proliferação Celular (anticorpo anti-Ki-67)

A amostra foi composta de 164 pacientes, independentes do diagnóstico histopatológico, levando-se apenas em conta o diagnóstico de HP+ e/ou cagA+ (111/300) e HP- (53/300), onde queremos mostrar o índice de proliferação celular, por imunoquímica com o uso de anticorpo anti- Ki-67, nesses pacientes (figura 6).

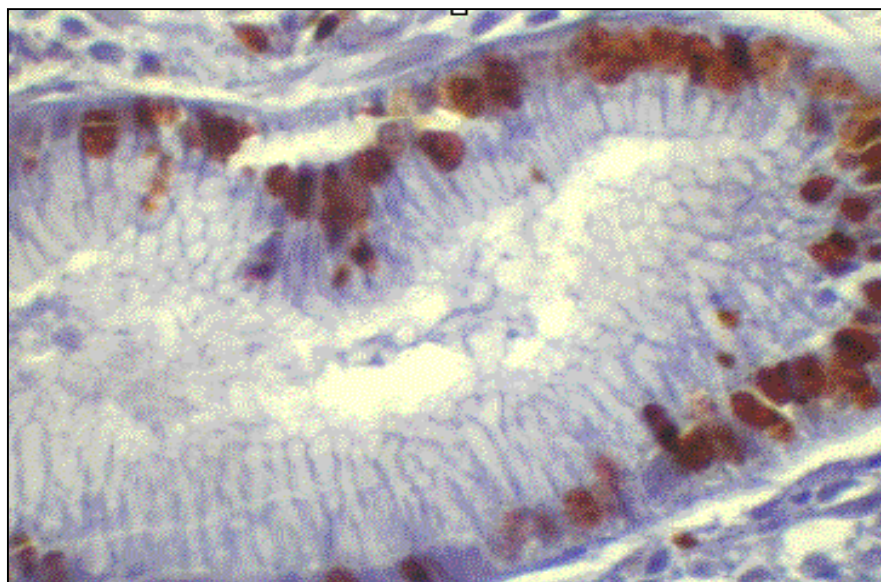
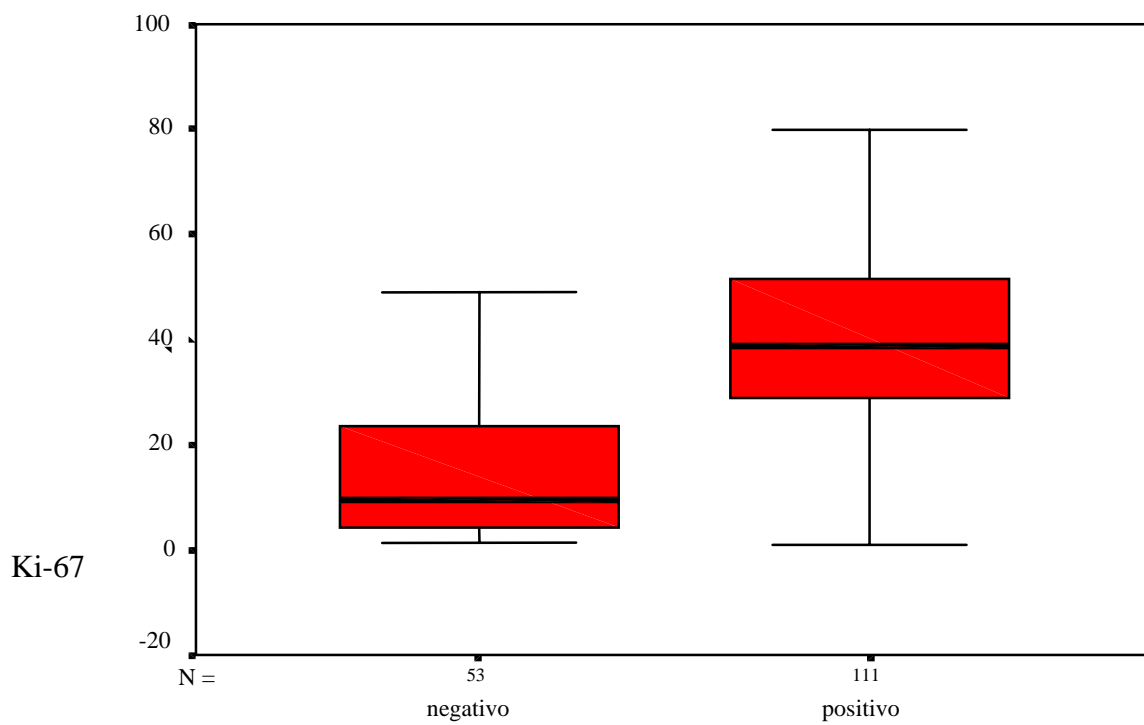


Figura 6: Microfotografia demonstrando proliferação avaliada pelo anticorpo anti-Ki-67.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HP positivos e negativos em relação a atividade proliferativa. A média e mediana foi de 15,3%, 9,4% (1,4-49%) para os casos HP negativos e de 37,5%, 38,6% (1,0-80%) dos espécimens HP positivos ($p < 0,0001$) (gráfico 1). A mesma significancia foi obtida em relação ao resultado do cagA. A média e mediana da proliferação foi de 33,7%, 33,5% (1,0-68%) para os casos cagA negativos, e de 43,0%, 41,8% (5,0-80%), nos casos cagA positivos ($p=0,015$) (gráfico 2).

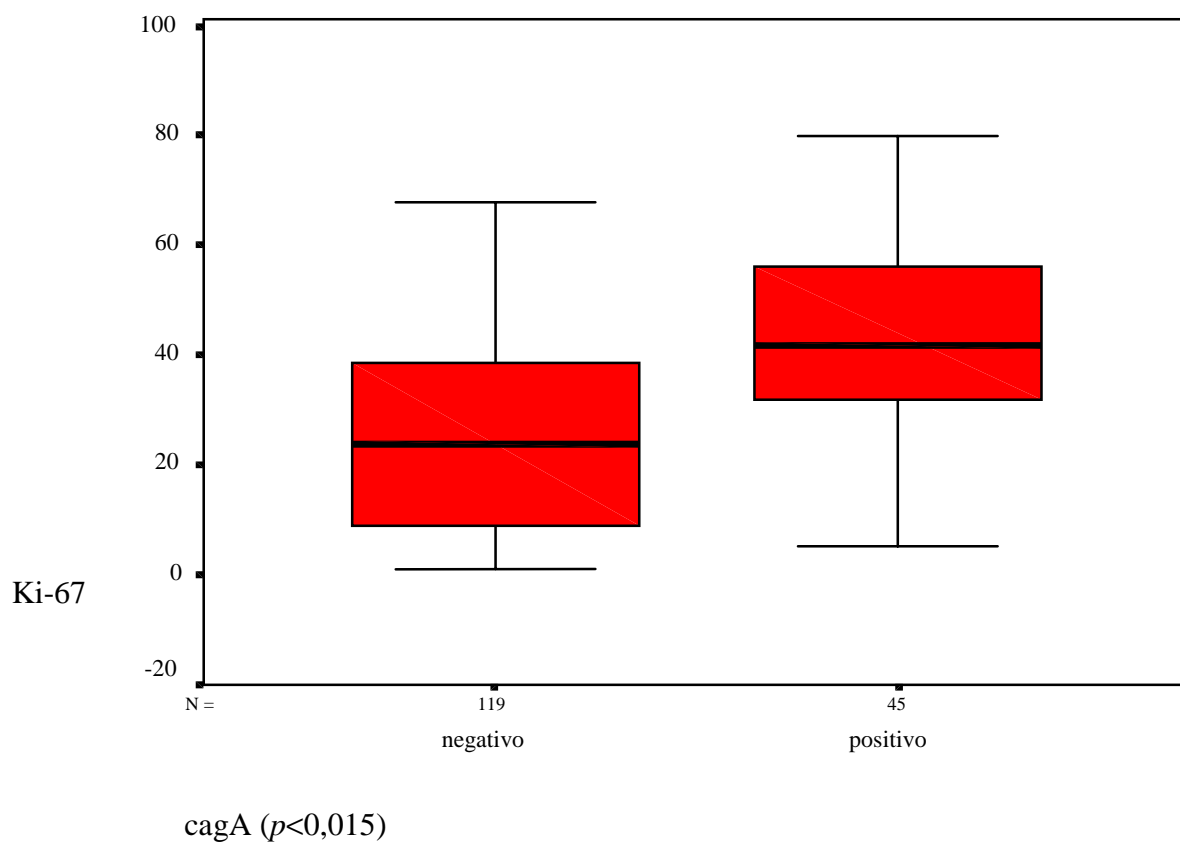
Identificamos ainda uma alteração na distribuição das células em proliferação, que não mais se restringiram ao colo de glândula, mas estenderam-se ao istmo e porções superficiais do epitélio

Gráfico 1: Gráfico de caixas mostrando a diferença da atividade proliferativa entre os HP positivos e HP negativos.



H.pylori ($p < 0,001$)

Gráfico2: Gráfico de caixas mostrando a diferença da atividade proliferativa entre os cagA positivos e cagA negativos.



IV- Apoptose (TUNEL)

As mesmas amostras usadas para na identificação da proliferação celular foram utilizada para a técnica de TUNEL , da mesma maneira independentes do diagnóstico

histopatológico, levando-se apenas em conta o diagnóstico de HP+ e/ou cagA+ (111/300) e HP- (53/300), onde queremos mostrar o índice de apoptose, nesses pacientes (figura 7).

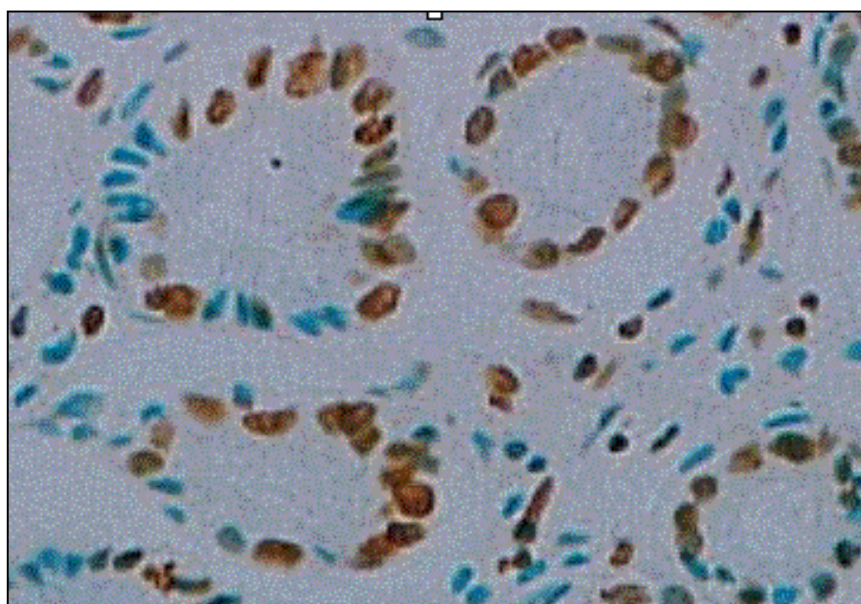
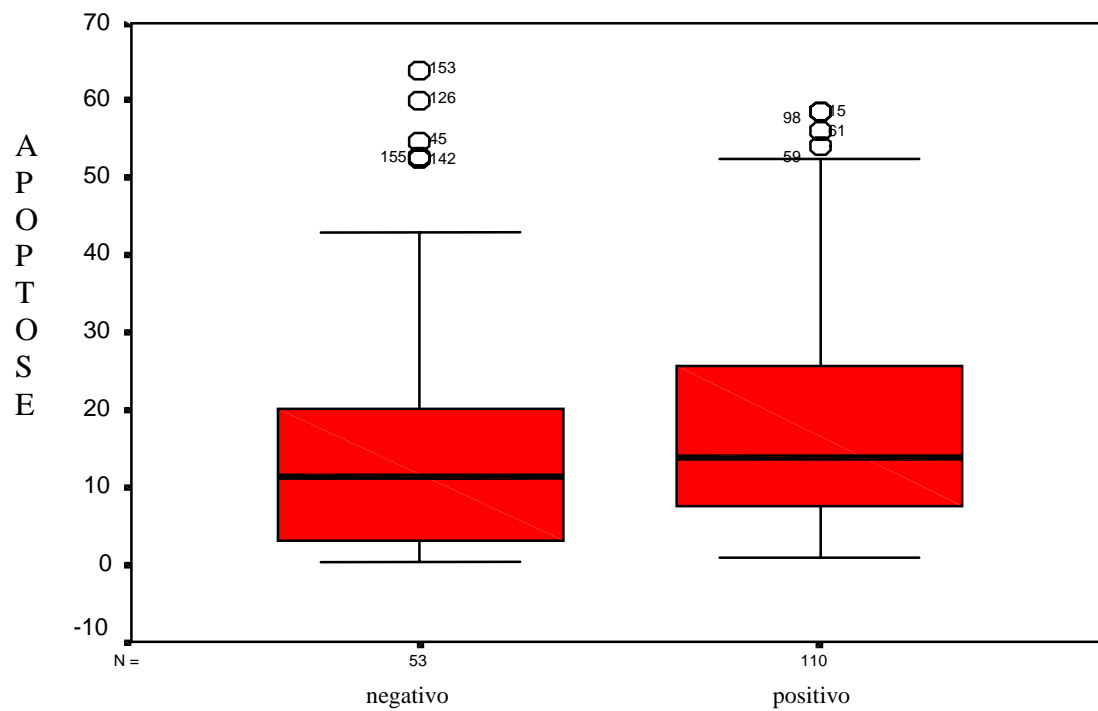


Figura 7: Microfotografia demonstrando apoptose detectada pela técnica de TUNEL. Os núcleos corados em dourado são células em apoptose, onde a degradação do DNA expôs as terminações OH.

Não houve diferença estatística no índice de apoptose considerando-se a infecção pelo HP. A média e mediana de apoptose foi 18,7%, 13,8% (1,0-58,6%) para os casos HP positivos e de 16,4%, 11,3% (0,2-64,0%) para HP negativos ($p=0,068$) (gráfico 3).

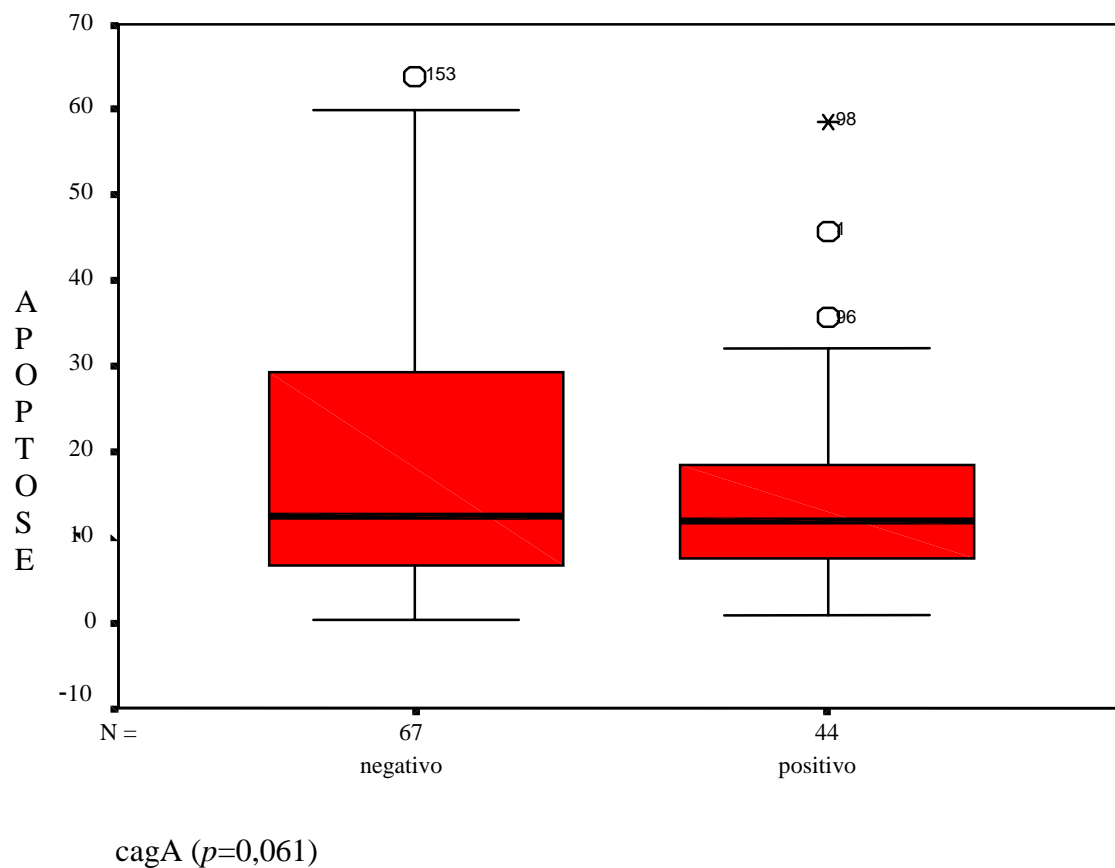
O mesmo ocorreu em relação ao cagA, sendo a média e mediana para os casos positivos e negativos respectivamente, 14,7%, 11,9% (1,0-58,6%) e 21,3%, 16,3% (2,5-58,5%) ($p=0,061$) (gráfico 4).

Gráfico 3: Gráfico de caixas mostrando a diferença da apoptose entre os HP positivos e HP negativos.



H.pylori (p=0,068)

Gráfico 4: Gráfico de caixas mostrando a diferença da apoptose entre os cagA positivos e cagA negativos.



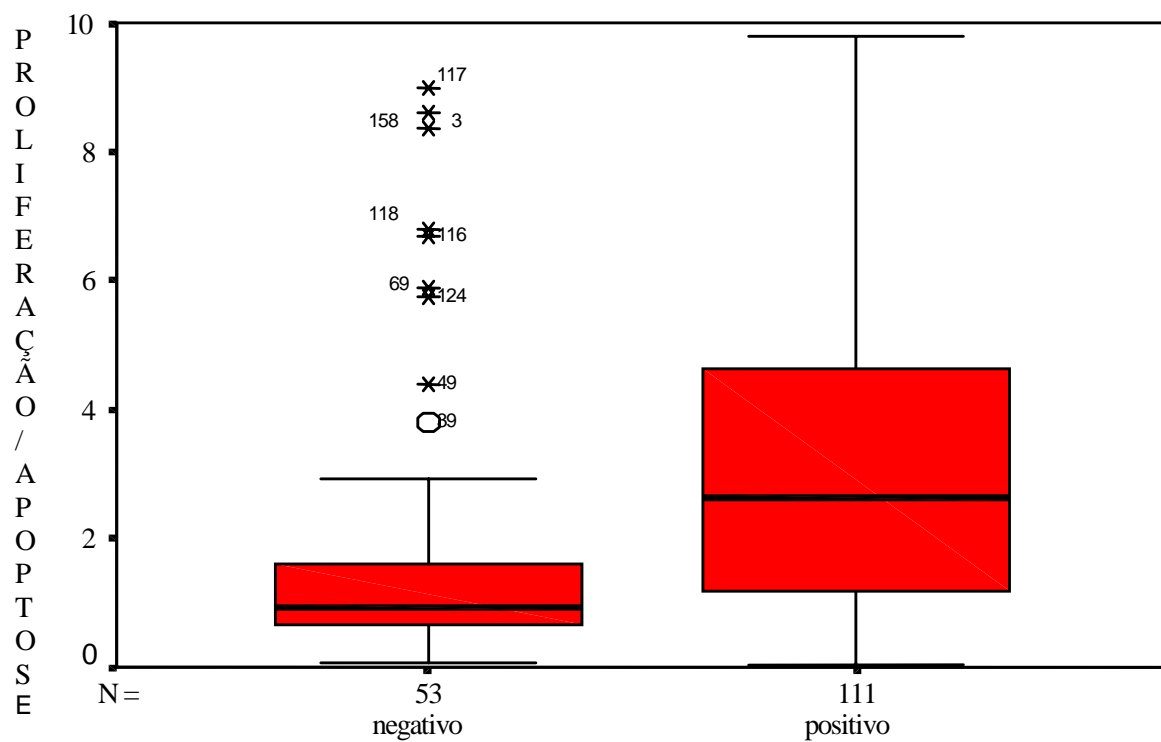
V- Relação da Proliferação celular (IP) e Apoptose (IA)

O verdadeiro índice de proliferação é representado pela proliferação dividida pelo número de células em morte celular programada ou apoptose (P/A). Esta relação foi significativamente maior para os espécimens HP positivos, média 3,63, mediana 2,62 (0,02-

22,84) comparando com os casos HP negativos cuja média foi 2,1, mediana 1,93 (0,05-11,67) ($p < 0,0001$) (gráfico 5).

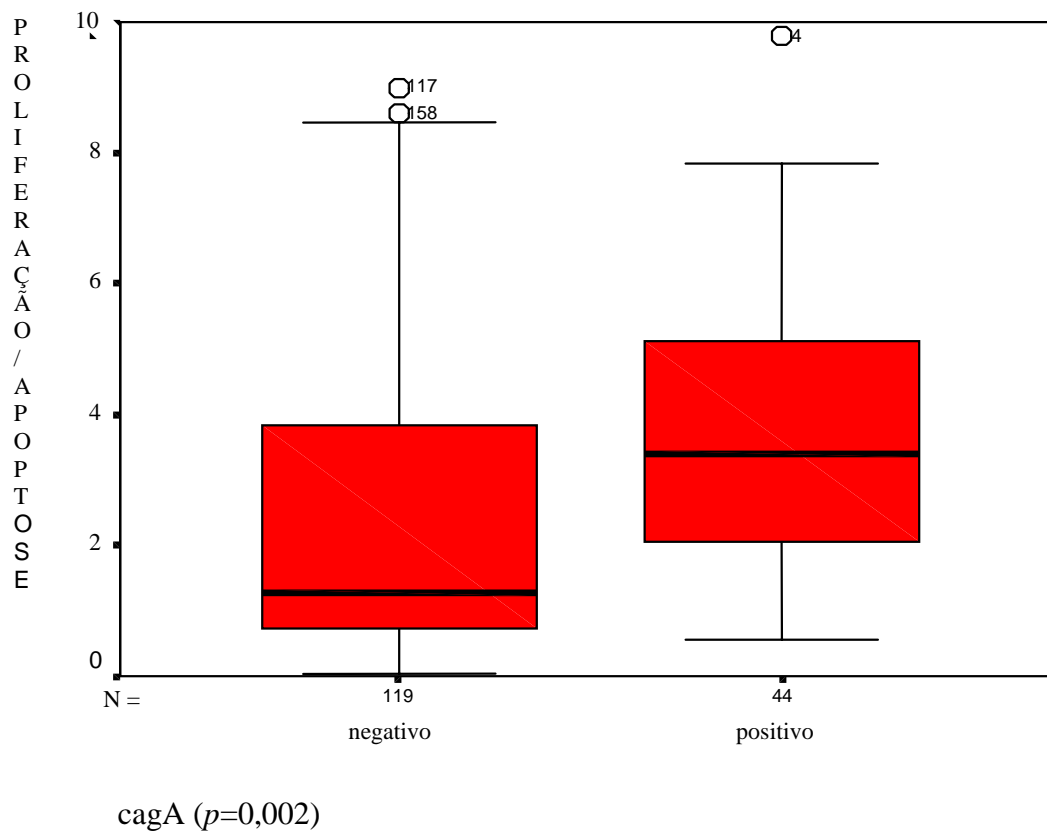
Da mesma maneira os nossos resultados em relação ao cagA+ e cagA- foram respectivamente 4,09, 3,4 (0,57-13,02) e 2,33, 1,64 (0,02-22,84) ($p = 0,002$) (gráfico 6).

Gráfico 5: Gráfico de caixas mostrando a relação da proliferação celular e apoptose entre os HP positivos e HP negativos.



H.pylori ($p < 0,0001$)

Gráfico 6: Gráfico de caixas mostrando a relação da proliferação celular e apoptose entre os *cagA* positivos e *cagA* negativos.



Decidimos então realizar análise de regressão logística para determinamos a existência de maior risco para pacientes infectados por HP cagA+, onde obtivemos o resultado de 8,8 vezes maior para o desenvolvimento de doença gástrica grave, nessas amostras ($p<0,0001$).

5 Discussão

A técnica empregada para detecção do *Helicobacter pylori* (HP), na mucosa gástrica foi da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a qual vem sendo descrita como

uma técnica de alta sensibilidade para detecção de fragmentos de DNA específicos da bactéria (Hammar et al., 1992; Clayton et al., 1992).

Utilizamos fragmentos de biópsias gástricas de pacientes, os quais foram encaminhados previamente para exame endoscópico pelo médico responsável e que apresentavam suspeita clínica de patologia gástrica.

Usando PCR, detectamos colonização em 37% dos nossos pacientes sendo a maior incidência em homens (46,8%) na faixa etária entre 41 e 60 anos.

Números bastante diferentes foram encontrados por Rocha et al. (1992), que diagnosticaram a infecção em 62,0% a 66,0% em um grupo de 320 pacientes brasileiros entre 18 e 64 anos. No Chile, Hopkins et al. (1993), encontraram índices semelhantes aos de Rocha e col., de infecção entre a população de baixa e alta renda, com 62,0% a 69,0% de incidência de HP entre os 20 e 34 anos.

Em outros países da América Latina são descritos de 41% a 75% de detecção da bactéria em diferentes grupos etários (Dwyer et al., 1988; Sierra et al., 1992).

Apesar do número pequeno de pacientes entre 0 e 20 anos (9), observamos (2/9) HP+, sendo (1/2) cagA+, nos sugerindo que a primo infecção pode ocorrer precocemente como demonstrou o estudo conduzido por Oliveira que encontrou uma incidência ainda maior da colonização por HP em uma população pediátrica brasileira. Pesquisando a presença de anticorpos séricos anti-HP em 241 crianças entre 1 mês e 18 anos de vida, encontraram positividade em 34,0%, sendo 16,0% até 2 anos e de 64,0% entre 15 e 18 anos (Oliveira et al., 1994).

Notamos um pico da prevalência do HP entre 41 e 80 anos de idade, variável entre 41,7 % a 41,4%, o que sugere que não existem mecanismos naturais de eliminação da infecção, e que a contaminação permanece.

Notamos uma forte correlação entre a infecção pelo HP e o desenvolvimento da doença gástrica histológica. A bactéria foi detectada por PCR em apenas 19% dos casos de onde havia gastrite leve, mas 77,1% das gastrites moderada e 86,6% das gastrites grave. A literatura é controversa quanto ao alívio dos sintomas após tratamento específico do HP. Enquanto alguns não demonstraram melhora dos sintomas após tratamento com antibióticos (Talley e al., 1999), outros demonstraram desaparecimento dos mesmos em número significativo de doentes, além de diminuída recidiva em pacientes tratados como omeprazol e antibióticos (McKoll et al., 1998).

Realizamos coloração específica por Giemsa Modificado e PCR, em um pequeno grupo de 49 pacientes (trabalho ainda não publicado), para compararmos a sensibilidade e especificidade das duas técnicas (Gold Standart). Nossos resultados mostraram positividade em 23/49 (46,9%), pela técnica de PCR, contra 18/49 (36,7%), pela técnica de Giemsa Modificado, mostrando a maior sensibilidade e especificidade da técnica utilizada neste trabalho.

Kisa et al. (2002) em estudo na Turquia avaliaram os métodos de detecção do HP em biópsias gástricas de 104 pacientes adultos sintomáticos, tendo sido empregadas as técnicas de cultura, histologia, PCR e “nested” PCR. De acordo com os seus resultados a positividade da infecção através das diferentes técnicas foi de 24,0% (25/104) com a utilização da coloração de Giemsa, 34,0% (36/104) com histopatologia, 36,0% (38/104) através da técnica da PCR e 41,0% (43/104) através da técnica de “nested” PCR. Com a

cultura da biópsia gástrica os autores conseguiram isolar a bactéria em somente 33,0% das amostras (35/104). Concluíram que tanto a especificidade quanto à positividade do diagnóstico do HP através de técnicas moleculares foram de 100,0%.

O HP representa atualmente um importante fator para o desenvolvimento de doença gástrica. Entretanto, ainda não está totalmente elucidada a razão pela qual a minoria dos pacientes HP+ desenvolvem doença gástrica, porém tem sido sugerido que cepas HP que contenham a ilha de patogenicidade cag (cagPAI) e a presença do gene cagA sejam mais virulentas e associadas com complicações gástricas tais como gastrite crônica e úlcera péptica (Censini et al., 1996).

Quanto à distribuição do genótipo cagA PAI notamos uma prevalência entre 37,7% e 50,0%, sem grandes alterações quanto à distribuição etária. Números mais baixos quando comparados com aqueles descritos por Queiroz et al. (1998). que encontrou 92,0% de cag+ em pacientes com câncer e em 67,5% em um grupo controle (Queiroz et al., 1998). Esta diferença entre os nossos resultados tanto para HP+, como para a presença da PAI cagA+, com relação a outros trabalhos descritos, pode-se dever a população estudada, que no caso de Queiroz e col. foi de baixa renda, atendida em hospital do sistema público de saúde, diferente da nossa população de mais alta renda, atendida em hospital privado. Interessante foi à determinação do risco de 8.8 vezes para desenvolvimento de doença gástrica grave como úlcera, o adenocarcinoma e linfoma MALT, nos portadores de infecção pela cepa cagA+. Este dado é concordante com a literatura, revista por Spechler e col. que mostrou um risco de até 12.6 vezes de desenvolvimento de úlcera duodenal, 9.8 vezes para úlcera gástrica e 6 vezes para o desenvolvimento do carcinoma (Spechler et al., 2000). O desenvolvimento da doença

gástrica ocorre em apenas 20,0% daqueles indivíduos infectados pelo HP e o carcinoma em 3,0% daqueles cronicamente colonizados. A extensão da lesão depende de uma série de fatores relacionados à bactéria e ao hospedeiro (Montecucco et al. 1999).

CagA, diferentemente do vacA, está presente em apenas uma proporção dos HP, fazendo parte de uma seqüência de 31 genes, com 40 kb que é diferente do restante do genoma bacteriano, que se supõe, tenha sido incorporado tardiamente na evolução da bactéria, provavelmente através de bacteriófagos. A proteína cagA é injetada pra o citosol das células epiteliais do hospedeiro através do sistema de secreção codificado pela PAI, onde se torna fosforilada, induzindo a secreção de IL-8, um fator intensamente pró-inflamatório. Este efeito parece ocorrer através da ativação da transcrição de fatores de transcrição nuclear como NF- κ B e AP1 entre outras quinases de resposta ao estresse (Maumann et al., 1999). O processo inflamatório crônico provocado pela colonização do estômago pelo HP tem sido considerado como um grande promotor de neoplasias.

Vários estudos demonstraram que a associação entre a presença do gene cagA e úlcera péptica (Queiroz et al., 1991; Covacci et al., 1993; Cover et al., 1995; Censini et al., 1997; Covacci et al., 1997) e que a correlação de cepas HP cagA+ estão fortemente relacionadas com a gravidade da doença gástrica.

Uma das informações importantes para identificação de fatores potencialmente carcinogênicos é o descontrole do processo de proliferação celular. Em nosso estudo observamos uma atividade proliferativa significativamente maior na mucosa gástrica de indivíduos infectados pelo HP em relação aos não infectados e também maior atividade

proliferativa nos indivíduos *cagA+* em relação aos *cagA-*. Identificamos ainda uma alteração na distribuição das células em proliferação, que não mais se restringiram ao colo de glândula, mas estenderam-se ao istmo e porções superficiais do epitélio. Este fato corrobora com os achados de Testini e col. de retardo da diferenciação das células mucosas, que seriam substituídas por elementos imaturos, possibilitando o aparecimento de clones metaplásicos e displásicos (Testini et al., 2000). Quanto a apoptose, apesar de não significativo, notamos um aumento da morte celular em pacientes infectados pelo HP, e uma diminuição da taxa de apoptose naqueles colonizados pela cepa *cagA+*. Dados semelhantes foram descritos em outro trabalho, que sugeriram um mecanismo de carcinogênese envolvendo indução da atrofia gástrica e acloridria por aumento da apoptose em pacientes infectados pelo HP (Xia et al., 2001).

Porém, o crescimento tissular é um produto resultante do número de células em divisão e aquelas em apoptose (P/A). Nosso estudo mostrou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes infectados ou não pelo HP e aqueles portadores ou não do gene *cagA*. A mediana do produto P/A foi de 2,62 para os casos HP positivos e de 1,93 para os negativos. Nos portadores de HP *cagA+* este número foi de 3,4 em comparação com 2,33 encontrados nos pacientes infectados por cepas *cagA-*.

Estes dados sugerem que nos doentes colonizados pelo HP/*cagA+*, exista um desequilíbrio entre proliferação e morte celular, alteração esta importante na carcinogênese. Resultados comparáveis foram descritos por Moss e col. que avaliando um número menor de doentes, demonstraram aumento de proliferação celular em paciente pelo HP e menor apoptose naqueles *cagA+* (Moss et al., 2001).

Neste trabalho, observamos uma prevalência de infecção por HP de 37,0% com forte correlação com a presença da doença gástrica grave, úlcera, carcinoma e linfoma do tipo MALT. Dos pacientes infectados 40,5% estavam infectados pela cepa cagA+, que conferiu um risco de 8,8 vezes maior para o desenvolvimento de doença gástrica grave (úlceras, adenocarcinoma e linfoma MALT). Observamos ainda aumento acentuado da atividade proliferativa das células epiteliais em pacientes HP+ e cagA+, e embora não tenha diferença estatística nos índices de apoptose, observamos maior relação P/A para os dois grupos de doentes, caracterizando um desequilíbrio no crescimento celular, que pode justificar a maior probabilidade de desenvolvimento de neoplasias nos pacientes cronicamente infectados pelo HP.

Estes resultados nos indicam a grande importância na identificação da bactéria e de sua genotipagem na profilaxia e no tratamento das doenças gástricas.

6 CONCLUSÕES

Nas condições do presente trabalho concluímos que:

- 1- Existe aumento de atividade proliferativa celular gástrica nos casos colonizados por HP/cagA+, quando comparamos aos casos negativos.

- 2- A colonização gástrica pelo HP/cagA+, aumenta desfavoravelmente o risco de desenvolvimento de doença gástrica grave.

7 ANEXOS

Dados referentes à idade, sexo, diagnósticos anátomo-patológico, diagnóstico molecular, imunohistoquímica e apoptose.

Mol	Nome	Id	Sx	Data	SL	HP	Diag	cag	Ki-67	Apop
2909	AH	61	m	16/01/01	82103	neg	pólipo	neg	*****	*****
2978	AW	75	m	16/02/01	82821	pos	úlceras	pos	51,60%	45,80%
1011	AGL	81	f	12/03/98	59754	pos	discreta	neg	6,70%	11,40%
3160	AGO	39	f	02/05/01	84900	neg	pólipo	neg	*****	*****
3265	AMJ	44	m	05/07/01	86306	neg	discreta	neg	*****	*****
3293	AAN	77	f	19/07/01	86562	neg	normal	neg	23%	2,80%
2926	AMC	40	m	23/01/01	82275	neg	discreta	neg	*****	*****
2938	ABF	31	f	29/01/01	82349	neg	discreta	neg	*****	*****
3074	ABE	54	f	26/03/01	83897	pos	erosiva	pos	9,78%	1%
3206	ASRS	73	f	21/05/01	85409	neg	atrófica	neg	*****	*****
3141	ABC	16	f	20/04/01	84602	neg	úlceras	neg	35%	3%
2888	AG	51	m	08/01/01	81858	neg	pólipo	neg	4,20%	10%
2995	ACA	68	f	23/02/01	83081	pos	pólipo	pos	28,05%	12,50%
2992	ATS	81	f	22/02/01	83068	pos	discreta	neg	49,30%	3,50%
2942	AMAP	85	f	31/01/01	82408A/B	pos	úlceras	pos	34,60%	6,80%
2713	AMDM	48	f	05/10/00	79472	pos	Malt	neg	53,20%	31,20%
	AMRMR	54	f	01/11/00	80172	pos	Malt	pos	41,78%	3,90%
3242	ACC	67	f	13/06/01	85885	neg	úlceras	neg	*****	*****
3307	AIPV	84	f	21/07/01	86750	neg	atrófica	neg	*****	*****
	AMOD	53	f	29/01/98	59048	pos	discreta	neg	1,30%	2,70%
3219	APC	72	f	30/05/01	85629	pos	úlceras	pos	50,75%	19,50%
3062	AAPT	51	m	22/03/01	83801	neg	normal	neg	3,90%	5%
3289	ACBD	26	m	18/07/01	86528	neg	discreta	neg	*****	*****
2986	ACSE	52	m	20/02/01	82983	neg	discreta	neg	*****	*****
1004	ACD	59	m	09/03/98	59676	pos	erosiva	neg	31,90%	58,5%
2966	AD	36	m	12/02/01	82713	pos	pólipo	pos	40,00%	9,4%
3012	AF	73	m	01/03/01	83200	pos	erosiva	pos	31,60%	7,30%
2971	AFAR	41	m	12/02/01	82721	pos	erosiva	pos	31,60%	8,90%
3229	AG	88	m	06/06/01	85745	neg	úlceras	neg	*****	*****
Mol	Nome	Id	Sx	Data	SL	HP	Diag	cag	Ki-67	Apop
3084	AIJ	68	m	30/03/01	84020	pos	erosiva	neg	38,58%	7,40%
3177	AMMB	60	m	09/05/01	85101	pos	úlceras	pos	56,84%	ruim

3199	AMHC	55	m	17/05/01	85338	pos	úlceras	pos	28%	7,10%
2973	ATG	61	m	13/02/01	82777	pos	alcalina	neg	68%	49,30%
3154	AVMS	69	m	30/04/01	84812	neg	discreta	neg	*****	*****
3309	AM	61	m	31/07/01	86748	neg	pólipo	neg	*****	*****
2960	AA	54	m	06/02/01	82588	pos	úlceras	pos	59%	20%
2930	AFS	75	m	24/01/01	82292	pos	pólipo	neg	39,30%	14%
892	AK	65	m	19/01/98	58847	pos	discreta	neg	37,80%	52,10%
898	ATJ	63	m	19/01/98	58842	neg	discreta	neg	23,40%	31,30%
3167	AAG	80	f	03/05/01	84928	neg	pólipo	neg	*****	*****
3201	AF	78	m	17/05/01	85334	neg	adenoca	neg	*****	*****
3027	BV	84	m	08/03/01	83370	neg	atrófica	neg	*****	*****
926	CC	20	f	05/02/98	59178	neg	úlceras	neg	2,30%	13,80%
3305	CSK	39	f	30/07/01	86721	neg	discreta	neg	*****	*****
3102	CEMN	37	m	05/04/01	84221	neg	pólipo	neg	*****	*****
3213	CG	66	m	28/05/01	85542	neg	discreta	neg	*****	*****
917	CC	73	f	27/01/98	58990	neg	pólipo	neg	17,70%	17,50%
3081	CA	74	f	28/03/01	83940A/B	neg	discreta	neg	*****	*****
3076	CPJC	62	f	26/03/01	83899	pos	erosiva	pos	5%	4%
2980	CSV	60	m	15/02/01	82850	pos	atrófica	neg	43,30%	7%
2894	CVD	57	m	11/01/01	81956	neg	pólipo	neg	*****	*****
3155	CMKAL	42	f	02/05/01	84842	neg	atrófica	neg	*****	*****
3159	CV	37	m	02/05/01	84898	pos	úlceras	pos	66,02%	12%
975	CFMB	69	f	25/02/98	59493	pos	erosiva	neg	1%	4,20%
3185	CAT	64	m	11/05/01	85167A	neg	adenoca	neg	*****	*****
3086	DBC	73	f	30/03/01	84033	neg	adenoca	neg	*****	*****
1022	DMR	9	m	16/03/98	59813	neg	discreta	neg	9,40%	11,30%
3068	DOVA	55	m	23/03/01	83844	neg	pólipo	neg	*****	*****
977	DDCB	50	f	26/01/98	59501	pos	erosiva	neg	23,90%	25,60%
3157	DFL	75	f	30/04/01	84855	neg	pólipo	neg	*****	*****
2880	DMY	39	m	04/01/01	81770	neg	discreta	neg	8,30%	10%
3002	DA	79	m	26/02/01	83129	pos	erosiva	neg	60,64%	15,50%
3156	ESH	84	f	02/05/01	84857	neg	discreta	neg	*****	*****
985	EPC	73	f	02/03/98	59543	neg	discreta	neg	22,30%	34,40%
906	ERT	22	m	22/01/98	58906	neg	discreta	neg	13,30%	20%
3035	EFF	27	f	12/03/01	83476	neg	erosiva	neg	38%	10%
3237	EBS	41	m	08/06/01	85796	pos	discreta	pos	59,70%	14,30%
Mol	Nome	Id	Sx	Data	SL	HP	Diag	cag	Ki-67	Apop
2975	EPC	24	m	14/02/01	82804	pos	discreta	pos	25,80%	13,80%
3121	EFAC	32	f	12/04/01	84458	neg	discreta	neg	*****	*****

3130	EFC	49	f	17/04/01	84517	neg	pólipo	neg	*****	*****
942	ESH	39	f	12/02/98	59319	pos	erosiva	neg	2%	42,20%
1012	EB	82	f	12/03/98	59753	pos	erosiva	neg	6%	32,30%
2906	ESO	70	f	13/01/01	82066	neg	pólipo	neg	*****	*****
2968	EAP	30	m	12/02/01	82720B/C	pos	erosiva	neg	32,10%	16,40%
907	EB	64	m	22/01/98	58910	neg	alcalina	neg	43,70%	54,70%
3126	EEM	71	m	16/04/01	84488	pos	erosiva	neg	30,32%	6,50%
3259	EAMZ	73	f	29/06/01	86199	neg	pólipo	neg	*****	*****
2904	EG	86	m	12/01/01	82038	neg	atrófica	neg	36,10%	12,30%
3009	EAP	61	f	28/02/01	83187	neg	adenoca	neg	*****	*****
3022	EK	75	f	07/02/01	83339	pos	úlceras	neg	56,60%	8,20%
2885	EDSB	89	f	08/01/01	81815	neg	pólipo	neg	4,40%	1,00%
920	EC	57	f	29/01/98	59051	pos	erosiva	neg	44,90%	38,30%
3109	FM	71	m	09/04/01	84293	neg	pólipo	neg	*****	*****
3110	FCFM	39	f	09/04/01	84299	pos	úlceras	pos	61,82%	11,40%
2990	FLF	51	f	22/02/01	83060	pos	úlceras	neg	18,00%	23%
2903	FM	79	f	12/01/01	82036	pos	úlceras	neg	49,60%	4,10%
905	FOA	79	f	22/01/98	58907	neg	erosiva	neg	31%	23,50%
908	FGM	68	m	22/01/98	58911	neg	erosiva	neg	27,90%	34,80%
927	FJSE	70	f	05/02/98	59190	neg	discreta	neg	18,30%	19,70%
3240	FCR	48	m	11/06/01	85825	neg	úlceras	neg	*****	*****
2937	FFB	61	m	29/01/01	82348	neg	adenoca	neg	4%	2,80%
3187	FBO	11	f	14/05/01	85178	neg	discreta	neg	*****	*****
3015	GSB	60	f	05/03/01	83256	neg	discreta	neg	*****	*****
2902	GAS	72	m	11/01/01	82029	neg	úlceras	neg	4,20%	3%
3252	GMH	66	m	22/06/01	86054	pos	discreta	neg	45,55%	54%
2897	GML	76	f	11/01/01	81992	neg	pólipo	neg	*****	*****
3261	GG	39	m	03/07/01	86258	neg	discreta	neg	*****	*****
2943	GL	51	m	31/01/01	82427	neg	pólipo	neg	*****	*****
2963	GLC	47	m	08/02/01	82639	neg	pólipo	neg	*****	*****
3303	GM	81	m	27/07/01	86695	pos	erosiva	neg	63,93%	37%
3165	GSG	48	f	03/05/01	84916	pos	erosiva	neg	32,30%	56%
3024	GMC	40	m	07/03/01	83330	neg	erosiva	neg	*****	*****
3059	GMRP	32	m	22/03/01	83798	neg	pólipo	neg	*****	*****
3200	HFSH	60	m	17/05/01	85344	neg	discreta	neg	*****	*****
2956	HAL	46	f	05/02/01	82532A/B	neg	atrófica	neg	*****	*****
Mol	Nome	Id	Sx	Data	SL	HP	Diag	cag	Ki-67	Apop
3125	HCPN	50	f	16/04/01	84490	neg	atrófica	neg	*****	*****
3172	HCPN	92	m	07/05/01	85002B	neg	pólipo	neg	*****	*****

3225	RMSR	51	f	06/06/01	85723	neg	pólipo	neg	*****	*****
2979	HC	76	m	16/02/01	82839	pos	atrófica	pos	57%	11,60%
2890	HRC	41	m	10/01/01	81907	pos	discreta	neg	40,70%	27,50%
939	IGB	71	f	10/02/98	59280	neg	úlceras	neg	2%	11,80%
3153	ISV	67	f	27/04/01	84804	neg	pólipo	neg	*****	*****
2998	IFR	58	m	23/02/01	83101	pos	erosiva	neg	51,30%	11,50%
3071	ICG	75	f	23/03/01	83848	neg	úlceras	neg	*****	*****
3308	IL	64	m	31/07/01	86754	neg	discreta	neg	*****	*****
3098	IAMN	41	f	04/04/01	84185	neg	úlceras	neg	*****	*****
2920	IT	51	m	22/01/01	82216	neg	atrófica	neg	*****	*****
2916	IFM	48	f	19/01/01	82180	neg	discreta	neg	*****	*****
3144	IGVC	54	f	24/04/01	84706	neg	discreta	neg	*****	*****
3122	IPPB	37	f	12/04/01	84436	pos	atrófica	neg	17,23%	4%
3139	JMSC	45	f	18/04/01	84563	neg	pólipo	neg	*****	*****
3251	JPS	49	m	22/06/01	86058	pos	adenoca	pos	56,00%	32,20%
3085	JCO	77	f	29/03/01	84023	neg	pólipo	neg	*****	*****
2925	JJ	74	f	23/01/01	82271	pos	discreta	neg	64,80%	12,20%
2914	JRN	84	m	19/01/01	82151	neg	atrófica	neg	11,80%	2%
2949	JS	71	m	02/02/01	82492	neg	discreta	neg	*****	*****
3198	JH	63	m	17/05/01	85332	pos	úlceras	pos	31,43%	7,50%
2954	JPC	29	m	05/02/01	82534	neg	úlceras	neg	*****	*****
3083	JBP	61	m	29/03/01	83980	neg	pólipo	neg	*****	*****
2970	JCBG	58	m	12/02/01	82718	pos	pólipo	neg	30,60%	6,60%
2884	JAC	64	m	08/01/01	81856	pos	adenoca	pos	40,90%	24,30%
3260	JCCP	37	m	03/07/01	86226	neg	discreta	neg	*****	*****
996	JDB	50	m	05/03/98	59608	pos	úlceras	neg	9,50%	7,40%
3106	JGN	65	m	06/04/01	84272	pos	úlceras	pos	57,62%	13%
3082	JIS	72	m	28/03/01	83944	pos	úlceras	pos	6%	11%
3101	JJOR	49	m	05/04/01	84211	pos	úlceras	pos	46%	9,50%
3224	JJ	65	m	04/06/01	85708	pos	úlceras	neg	13,90%	9,80%
3188	JJN	57	m	11/05/01	85176	neg	discreta	neg	*****	*****
995	JMD	73	m	05/03/98	59606	neg	discreta	neg	3,80%	11,30%
	JPTF	59	m	31/07/01	86662	pos	úlceras	neg	38,83%	31%
3233	JRDG	58	m	08/06/01	85774	neg	atrófica	neg	*****	*****
2993	JÁ	71	f	22/02/01	83056	pos	discreta	neg	40,10%	23,70%
3037	JCA	82	f	13/03/01	83505	pos	erosiva	neg	56,70%	10%
Mol	Nome	Id	Sx	Data	SL	HP	Diag	cag	Ki-67	Apop
3026	JOS	74	f	09/03/01	83371	neg	atrófica	neg	*****	*****
2891	JR	24	f	10/01/01	81948	neg	discreta	neg	9,20%	6,60%

933	JCB	70	f	06/02/98	59213	neg	úlceras	neg	1,60%	2%
3013	KMV	17	f	01/03/01	83203	neg	atrófica	neg	*****	*****
3462	KHL	39	m	16/11/01	89016	pos	adenoca	pos	42,45%	14,70%
3179	KM	85	m	10/05/01	85134	neg	úlceras	neg	*****	*****
3143	LNW	63	f	19/04/01	84595	pos	Malt	pos	52%	18,30%
2982	LPG	75	m	19/02/01	82928	neg	alcalina	neg	*****	*****
1008	LCPN	61	f	11/03/98	59725	pos	pólipo	neg	46,60%	29,30%
2883	LAC	80	m	04/01/01	81782	neg	discreta	neg	7,40%	11,60%
3010	LNQB	80	f	01/03/01	83196	neg	pólipo	neg	8,20%	10,40%
3281	LAL	45	f	17/07/01	86470	pos	úlceras	pos	60,00%	22,70%
3149	LFZ	45	f	25/04/01	84738	neg	pólipo	neg	*****	*****
2896	LP	26	f	11/01/01	81990	pos	pólipo	neg	33%	29,50%
2988	LHA	80	f	21/02/01	83012	neg	discreta	neg	*****	*****
3266	LFA	35	m	05/07/01	86310	neg	discreta	neg	*****	*****
3014	LEAS	71	f	05/03/01	83242	pos	alcalina	neg	56%	2,50%
3168	MFS	74	m	03/05/01	84924	neg	adenoca	neg	*****	*****
1013	MJSB	70	m	12/03/98	59755	pos	discreta	neg	36,70%	43,40%
2976	MPS	50	m	14/02/01	82803	pos	pólipo	neg	26,90%	2,50%
3054	MR	15	f	20/03/01	83698	pos	discreta	neg	13,30%	8,50%
	MRS	33	m	04/01/02	79512	neg	Malt	neg	*****	*****
	MRS	33	m	24/07/01	81563	neg	Malt	neg	*****	*****
976	MG	29	m	26/02/98	59500	neg	pólipo	neg	8,80%	32,60%
3178	MAFP	46	m	10/05/01	85148	pos	úlceras	pos	32,08%	35,70%
3136	MJMS	65	f	18/04/01	84566	pos	úlceras	pos	46%	13,80%
3209	MACR	56	f	23/05/01	85445	pos	úlceras	pos	80%	58,60%
2924	MABG	33	f	23/01/01	82270	pos	discreta	neg	54,80%	16,20%
2997	MAP	61	f	23/02/01	83106	pos	úlceras	pos	43,60%	8,50%
3217	MAR	49	f	28/05/01	85581	pos	alcalina	neg	44,12%	11,40%
2882	MBR	47	f	04/01/01	81772	pos	úlceras	pos	52,50%	6,70%
2931	MCMD	81	f	24/01/01	82301	pos	atrófica	pos	35,60%	16,70%
3087	MCC	36	f	02/04/01	84056	neg	normal	neg	3,60%	2,80%
1005	MLCF	70	f	09/03/98	59679	pos	erosiva	neg	17%	27,80%
1026	MLCF	53	f	17/03/98	59834	pos	erosiva	neg	13,30%	22,80%
	MPL	71	f	30/03/01	83686	neg	adenoca	neg	*****	*****
3003	MESQ	56	f	26/02/01	83132	neg	úlceras	neg	*****	*****
979	MHCC	44	f	26/02/98	59503	pos	discreta	neg	13%	46,20%
Mol	Nome	Id	Sx	Data	SL	HP	Diag	cag	Ki-67	Apop
3000	MHSBC	41	f	26/02/01	83127	neg	pólipo	neg	*****	*****
3255	MIPG	88	f	27/06/01	86114	neg	adenoca	neg	*****	*****

2917	MLGO	48	f	19/01/01	82184B	pos	erosiva	neg	57,30%	14,20%
3103	MLBMC	75	f	05/04/01	84219	neg	úlceras	neg	*****	*****
3250	MLCL	44	f	21/06/01	86027	neg	atrófica	neg	*****	*****
1015	MMRP	65	f	13/03/98	59780	neg	erosiva	neg	9,30%	12,30%
3112	MMRP	52	f	10/04/01	84337	neg	discreta	neg	*****	*****
2981	MNS	61	f	16/02/01	82890	neg	atrófica	neg	*****	*****
932	MRCB	36	f	06/02/98	59211	pos	erosiva	neg	2,70%	19,70%
2900	MSM	34	f	11/01/01	81996	neg	úlceras	neg	*****	*****
1032	MSBSC	55	f	18/03/98	59858	neg	discreta	neg	8,90%	10,30%
3104	MSAVC	39	f	05/04/01	84225B	neg	discreta	neg	*****	*****
3269	MSH	55	f	12/07/01	86376	neg	discreta	neg	*****	*****
	MTAC	36	f	29/10/01	88662	pos	Malt	neg	29,66%	6,9%
3004	MTM	59	f	26/02/01	83131	neg	discreta	neg	*****	*****
3128	MTR	57	f	16/04/01	84514	pos	discreta	neg	24,70%	7,50%
3099	MTS	85	f	04/04/01	84182	neg	pólipo	neg	*****	*****
2955	MYF	52	f	05/02/01	82535	pos	discreta	pos	30,70%	15,40%
3174	MCT	18	f	07/05/01	85033	neg	úlceras	neg	*****	*****
2958	MFB	47	f	06/02/01	82573	neg	discreta	neg	*****	*****
3124	MMT	62	f	12/04/01	84454	neg	discreta	neg	*****	*****
2964	MBR	71	m	09/02/01	82640	neg	úlceras	neg	*****	*****
3053	MGJ	43	f	19/03/01	83695	neg	pólipo	neg	*****	*****
3001	MSM	40	f	26/02/01	83130A	neg	atrófica	neg	*****	*****
943	MAS	63	f	12/02/98	59321	pos	úlceras	neg	29,80%	33,40%
2967	MLBC	44	f	12/02/01	82715	neg	erosiva	neg	7%	1%
2910	MKA	40	m	16/01/01	82109B	neg	úlceras	neg	1,80%	0,20%
3254	MC	89	m	24/06/01	86077	neg	adenoca	neg	*****	*****
2944	MLT	38	f	31/01/01	82425	neg	atrófica	neg	13,60%	2,00%
3236	MLF	47	f	08/06/01	85798	neg	erosiva	neg	*****	*****
2991	MLCL	67	f	22/02/01	83062	neg	pólipo	neg	*****	*****
3226	MT	71	f	06/06/01	85725B	pos	erosiva	pos	32,54%	2,50%
2941	MN	65	m	30/01/01	82386	pos	úlceras	neg	33%	10%
3017	NNY	14	f	05/03/01	83274	neg	discreta	neg	*****	*****
3063	NSM	69	f	22/03/01	83789	pos	adenoca	pos	46,00%	19,80%
3249	NMS	39	f	21/06/01	86034	neg	discreta	neg	*****	*****
3231	NC	80	m	06/06/01	85751	neg	atrófica	neg	*****	*****
2983	NAOC	49	f	16/02/01	82892	neg	discreta	neg	*****	*****
Mol	Nome	Id	Sx	Data	SL	HP	Diag	cag	Ki-67	Apop
3115	NGC	62	f	12/04/01	84351	pos	discreta	neg	42,32%	5%
3045	NPM	57	f	15/03/01	83580	pos	pólipo	pos	32%	9,80%

2969	NCNC	71	f	12/02/01	82719	neg	alcalina	neg	2%	0,40%
3046	NF	58	m	15/03/01	83579	pos	alcalina	pos	30,57%	18,60%
3132	NP	57	m	17/04/01	84521	neg	úlceras	neg	32%	60%
2921	ND	40	m	23/01/01	82262	neg	úlceras	neg	14%	10%
3041	NF	64	m	14/03/01	83545	pos	erosiva	neg	40,80%	10%
2892	OORC	66	f	11/01/01	81951	neg	pólipo	neg	32,20%	13,80%
3238	COM	85	f	11/06/01	85818	neg	pólipo	neg	*****	*****
3140	OOSB	78	m	18/04/01	84560	pos	úlceras	neg	33%	17%
3166	OLM	71	m	03/05/01	84917	neg	atrófica	neg	*****	*****
2905	OCG	66	m	12/01/01	82044	neg	alcalina	neg	11,30%	15,30%
3011	OO	67	m	01/03/01	83197	pos	úlceras	pos	67,50%	13,10%
2977	OM	19	m	14/02/01	82812	pos	úlceras	pos	40,66%	11,70%
1003	PPZ	64	f	09/03/98	59667	neg	discreta	neg	5,60%	9,70%
3186	PFSB	32	f	14/05/01	85188	pos	úlceras	pos	37%	6,30%
3150	PMG	36	f	25/04/01	84737	neg	pólipo	neg	*****	*****
2952	PCKJ	26	f	02/02/01	82490	pos	erosiva	neg	13,58%	18,00%
3093	PCAS	61	m	03/04/01	84129	neg	discreta	neg	*****	*****
3005	PCJS	44	m	26/02/01	83128	neg	discreta	neg	*****	*****
2907	PAC	82	m	13/01/01	82065	neg	pólipo	neg	*****	*****
3147	PSF	51	m	25/04/01	84735	neg	pólipo	neg	*****	*****
2740	PGP	48	m	07/01/02	89894	neg	adenoca	neg	*****	*****
3142	RNS	33	m	23/04/01	84636	neg	erosiva	neg	*****	*****
2881	RP	76	m	04/01/01	81771	pos	erosiva	neg	33,80%	16,70%
3129	RLCG	27	f	16/04/01	84516	neg	discreta	neg	*****	*****
1016	RBL	51	m	13/03/98	59781	pos	discreta	neg	12,50%	14,90%
2895	RDO	53	m	11/01/01	81988	pos	pólipo	neg	57%	2,50%
3287	RSMP	38	f	18/07/01	86530	neg	discreta	neg	*****	*****
3310	RS	75	m	31/07/01	86760A/B	neg	úlceras	neg	*****	*****
3275	RB	56	f	13/07/01	86444	neg	discreta	neg	*****	*****
3089	RAR	28	m	02/04/01	84086	neg	discreta	neg	*****	*****
978	REZ	56	m	25/02/98	59502	neg	úlceras	neg	17,30%	13,80%
3055	RBA	25	f	20/03/01	83967	neg	pólipo	neg	*****	*****
3069	RCPT	29	f	23/03/01	83845	neg	pólipo	neg	*****	*****
3192	RCL	75	m	15/05/01	85234	neg	discreta	neg	*****	*****
3127	RMC	55	m	16/04/01	84485	neg	atrófica	neg	*****	*****
3286	RN	82	m	18/07/01	86524	neg	discreta	neg	*****	*****
Mol	Nome	Id	Sx	Data	SL	HP	Diag	cag	Ki-67	Apop
3196	RT	54	m	16/05/01	85284	neg	úlceras	neg	*****	*****
3243	RAH	91	f	13/06/01	85887	neg	pólipo	neg	*****	*****

3273	RRCA	47	f	13/07/01	86440	neg	pólipo	neg	*****	*****
874	RG	61	m	10/0198	58711	neg	úlceras	neg	5%	4,30%
938	RVFF	51	m	09/02/98	59254	neg	alcalina	neg	10,40%	52,40%
992	RCS	74	m	04/03/98	59589	pos	discreta	neg	41,50%	23,30%
	SD	69	m	24/07/01	85649	neg	Malt	neg	*****	*****
2878	SC	77	m	03/01/01	81762	pos	erosiva	neg	32,30%	41,20%
884	SSAL	50	f	15/01/98	58801	pos	erosiva	neg	1%	50,40%
3279	SSY	60	m	13/07/01	86448	neg	úlceras	neg	*****	*****
2913	SS	61	f	18/01/01	82147	neg	discreta	neg	4,40%	3,00%
2893	SDSF	42	f	11/01/01	81952	neg	pólipo	neg	*****	*****
965	SVN	34	f	19/02/98	59442	neg	úlceras	neg	34%	38.2%
3151	SAFS	48	f	26/04/01	84774	neg	pólipo	neg	*****	*****
3033	SNFO	54	f	12/03/01	83452	pos	pólipo	neg	46,30%	12,70%
3258	SMJ	42	m	29/06/01	86169	neg	discreta	neg	*****	*****
3277	SS	88	m	13/07/01	86451	neg	adenoca	neg	*****	*****
3075	SMM	50	f	26/03/01	83895	neg	discreta	neg	*****	*****
1034	SLT	51	f	18/03/98	59866	neg	pólipo	neg	38,50%	25,40%
3301	SMG	58	f	27/07/01	86686	neg	discreta	neg	*****	*****
934	STH	56	m	09/02/98	59248	pos	erosiva	neg	15%	23,80%
2959	SYEJ	75	f	06/02/01	82584	neg	discreta	neg	*****	*****
3116	SDG	56	f	12/04/01	84349	neg	discreta	neg	*****	*****
3404	TK	68	m	08/10/01	88200	pos	Malt	pos	33,40%	7,40%
3023	TGL	65	f	07/02/01	83335	neg	pólipo	neg	*****	*****
2932	TCB	73	f	24/01/01	82294	neg	adenoca	neg	20,60%	12,30%
1007	TOHR	69	f	11/03/98	59728	neg	discreta	neg	3,50%	64%
987	UFSL	53	m	20/01/98	58864	neg	discreta	neg	49%	43%
988	VSR	43	m	03/03/98	59561	neg	pólipo	neg	29,60%	52,70%
1021	VT	72	m	16/03/98	59810	neg	alcalina	neg	7,80%	4,90%
3202	VV	69	m	17/05/01	85366C	neg	adenoca	neg	*****	*****
3291	VMG	59	f	19/07/01	86557	neg	discreta	neg	*****	*****
3095	VAMG	46	f	04/04/01	84149	neg	pólipo	neg	*****	*****
2934	VLMC	33	f	26/01/01	82318	neg	erosiva	neg	1,40%	2,30%
2950	WLA	71	f	02/02/01	82488	neg	atrófica	neg	25,80%	3,00%
3146	WBP	86	m	24/04/01	84704	pos	úlceras	pos	70,22%	11,10%
1039	WS	75	m	19/03/98	59883	pos	discreta	neg	21,50%	52,40%
3171	WSC	44	m	04/05/01	84953A/B	pos	erosiva	pos	51,60%	26,80%
Mol	Nome	Id	Sx	Data	SL	HP	Diag	cag	Ki-67	Apop
3039	WLP	46	m	12/03/01	83451	pos	pólipo	neg	67%	11,50%
1017	WPJ	32	m	13/03/98	59782	pos	discreta	neg	36,70%	29,40%

2899	YMGG	58	f	11/01/01	81995B	neg	pólipo	neg	*****	*****
2961	YIP	55	f	07/02/01	82605	pos	úlceras	pos	60%	5,20%
3111	YAS	55	f	12/04/01	84297	neg	atrófica	neg	*****	*****

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Consentimento para participar deste estudo

Ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, reconheço que li e compreendi a informação precedente descrevendo este estudo. Autorizo a divulgação do meu prontuário médico (ou prontuário médico do meu filho) para o patrocinador, o FDA e o IRB. Minhas dúvidas foram satisfatoriamente esclarecidas e estou assinando este termo de consentimento livre e esclarecido indicando meu desejo de participar ou permitir que meu filho participe. Compreendo que receberei uma cópia assinada deste termo.

Ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, não abdiquei de nenhum de meus direitos legais aos quais eu ou meu filho pudéssemos fazer juz como participantes de um estudo de pesquisa.

_____	_____
Nome do voluntário em letra de forma ou maquina	Data
_____	_____
Assinatura do voluntário	Data
_____	_____
Assinatura da pessoa obtendo o consentimento	Data

8 REFERÊNCIAS

Bernard EA., Bloomer AC, Davies KE, Hunt SP, Keynes KJ, Robertts TH, Rubery PH., Tuite MF, Watts C, Weartherrall SDJ, White KA H. In Kendrew SJ. *The Enc Mol Biol*. New York: Raven; 1994; p. 864 .

Blaser MJ. Linking *Helicobacter pylori* to gastric cancer. *Nature Med* 2000;6:376-7.

Cathoretti G, Surmeey A. An antigen unmasking of formalin-fixed paraffin-embedded tissues using microwaves. *Adv Anat Pathol*. 1995;2:2-9.

Cesini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovski M, Pappuoli R, Covacci A. CagA pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encode type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sc*. 1996;93:14648-53.

Clayton C, Kleanthous K, Coater PJ, Morgan DD, Tabagchali S. Sensitive detections of *Helicobacter pylori* using *Polymerase Chain Reaction*. *J Clin Microbiol*. 1992;30:192-200.

Contran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. *Pathologic basis of disease*, 5th ed. Philadelphia: W.B Saunders Company .1994. p. 767-83.

Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Buroni D, Macchia G, Massoni A, Papini E, Xiang Z, Figura N. Molecular characterization of the 128kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sc.i* 1993;90:5791-5.

Covacci A , Teldorf JL, Giudice GD, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*. 1999;284:1328-33.

Cover TL, Glupczynski Y, Lage AP, Burerre A, Tummuru MK, Perez-Peres GI, Blaser MI. Serologic detection of infection with cagA+ *Helicobacter pylori* strain. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1496-500.

Dixon, M.F, Genta, R.M, Yardley, J.H, Correa, P. Classification and Grading of Gastritis. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161-81.

Dundon, W.G, Bernard, M, Montecucco, C. Virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol*. 2000;647:55.

Dwyer B, Kaldor J, Tee W, Marakowski E, Raios K. Antibody response to *Campylobacter pylori* in diverse ethnic groups. *Sand J infect Dis*. 1988;222-6.

Fenoglio-Preise, C.M, Noffsinger, G.N, Lantz. P.E, Listrom, M.B, Rilke, F. O. *Gastrointestinal pathology an atlas and text*. 2 nd ed.. New York: Raven; 1998. p.171-86 .

Gavrieli, Y., Stermany, Y., Bem-Sansson, A. S., Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol*. 1992;119: 491-501.

Gerdes, J., Lemke. H., Baisch, H., Wacker, H., Schwab, U., Stein, H. Cell Cycle Analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the mouse monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133: 171-5.

Glocker, E., Lange, C., Bereswill, S., Kist, M., Pahl, A . L. Proteins encoded by the cag pathoogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF-KB activation. *Infect Immun* .1998;66: 2346-8.

Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadstom T, O'toole PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polimease chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30:54-8.

Hopkins RJ, Vial PA, Ferreccio C, Ovalle J, Prado P, Sotomayor V, Russel RG, Wasseman SS, Morris JGJ. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. *J Infect Dis*. 1993;168:222-6.

Houghton, J, Korah, R.M, Condor, M.R, Kim, K.H. Apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastric and duodenal ulcer disease is mediated via the fas antigen pathway. *Dig Dis Sci*. 1999;465:478-84.

Ilver, D, Arnqvist, A, Ögren, J, Frinck, I.M, Kersulyte, D, Incecik, E.T, Berg, D.E, Covacci, A. Engstrand, L, Borén, T. *Helicobacter pylori* Adhesion Binding Fucosylated Histo-Blood Group Antigens Revealed by Retagging. *Science*. 1998;373:377-9.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2003. [citado em: 11 maio 2204] Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativas>

Kendrew JS. *The encyclopedia of molecular biology*. New York: Blackwell Science 1999. p. 864.

Karpeh MS, Kilsen DP, Tepper JE, Molecular biology of cancer:The cell cycle. In: De Vita Jr, V.T., Hellman, S., Rosenberg,S.A. *Cancer: Priciples e pratietice of oncology*, 5th ed.. New York: Raven, 1997. p. 121-9.

Kisa O, Albay A, Refik Mas M, Celasun B, Doganci L. The evaluation of specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;43:251-5.

Konturek, P.C, Konturek, S.J, Plerzchalski, P, Bielański, W, Duda, A, Marclicz, K, Starzyńska, T, Hanh, E.G. Cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infectes stomach – role of growth factors, apoptosis and cyclooxygenase. *Med. Sci Monit* .2001;1092:107.

Koss, LG. Modified may-grunwold-giemsma (MGG) stain (Zajicek). In Koss, L.,G. *Diagnostic cytology and its histopathologic bases*. 4 nd ed. New York: J.B. Lippincott : 1992. v.2; p.1503-1504.

Krausse R, Garten L, Harder T, Ullmann U, Birkner T, Doniec M, Grimm,H. Clinical relevance of cagA-spezif Antibodies related to cagA Status of *Helicobacter pylori* isolates using imunofluorescence test and PCR. *Infection*. 2001;29: 154-8.

Lewin KJ, Riddell RH, Weinstein WM. *Gastrointestinal pathology and its clinical implications*. New York: Igaku-Shoin. 1989;151-574.

Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilion on gastric epittelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983;1: 1273.

Mattar, R, Laudanna, A. A *Helicobacter pylori* genotyping frompPositive clotest in patients with duodenal ulcer. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo*. 2000; 55:155:160.

McKoll K, Murray L, El-Omar E, Dickson A, El-Nujumi A, Kelman A, Penny C, Kill-Jones R, Hilditch T. Symptomatic benefit from eradicating *Helicobacter pylori* infection in patients with nonulcer dyspepsia. *N Engl J Med* .1998;339:1869-75.

Montecucuo C, Rappuoli R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Rev*. 2001;2: 457-66.

Moss, S.F, Sordillo, E.M, Abdalla, A.M, Makarov, V, Hanzely, Z, Perez-Perez, G.I, Blaser, M, Holt, P.R. Increased gastric epithelial cell apoptosis with colonization with cagA+ *Helicobacter pylori*. *Cancer Res*. 2001;61:1406-11.

Naumann M, Wessler S, Bartsh C, Wieland B, Covacci A, Hoss R. Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the cag pathogenecity island. *J Biol Chem*. 1999;274:31655-62.

Oliveira AMR, Queiroz DMM, Rocha GA, Mendes EN. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. *Am J Gastroentero*.1994;89:2201-04.

Owen, D.A. Stomach,. In Sternbery S S. *Histology for pathologists*. 2 nd ed. New York: Raven; 1997. p.481:3.

Peek RM Jr, Moss SF, Tham KT, Wang S, Milller GG, Atherton JC, Holt PR, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J Nal Inst*. 1997;863-68-89.

Peng H, Ranaldi R, Diss TC, Isaacson PG, Berarzi I, Pan L. High frequency of cagA+ *Helicobacter pylori* infection in high-grade gastric malt B-cell lymphomas. *J Pathol*. 1998;185: 409-12.

Queiroz DM, Rocha GA, Mendes EN, Carvalho AS, Barbosa AI, Oliveira CA, Lima GF Jr. Differences in distribution and severity of *Helicobacter pylori* gastritis in children and adults with duodenal ulcer disease. *J Pediatr Gastroenterol.* 1991;12:178-81.

Queiroz DMM, Mendes EN, Rocha GA, Oliveira AMR, Oliveira CA, Magalhães PP, Moura SB, Cabral MMDA, Nogueira AMMF. CagA-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int J Cancer.* 1998;78:135-9.

Rocha GA, Queiroz DM, Mendes EM, Oliveira AM, Moura SB, Silva RJ. Source of *Helicobacter pylori* infection: studies in abattoir workers and pigs. *Am J Gastroenterol.* 1992;87:1525.

Rudi J, Kuck D, Strand S, von Herbay A, Mariano SM, Krammer PH, Galle PR, Stremmel W. Involvement of the CD95 (APO1/FAZ) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial apoptosis. *J Clin Invest.* 1998;10:1506-14.

Scholte, G.H.A, van Doorn, L.J, Quint, W.G.V, Lindeman, J. Genotyping of *Helicobacter pylori* Strains in Formalin-Fixed or Formaldehyde-Sublimate-Fixed Paraffin-Embedded Gastric Biopsy Specimens. *Diagn Mol Pathol.* 2001;10:166-77.

Scholte GHA, van Doorn LJ, Quint WGV, Lindeman J. Polymerase chain reaction for the detection *Helicobacter pylori* in formaldehyde-sublimate fixed, paraffin-embedded gastric biopsies. *Diagn Mol Pathol.* 1997; 6:238-43.

Segal, E.D, Lange, C, Covacci, A, Tompkins, L.S, Falkow, S. Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94: 7595-9.

Sierra R, Muñoz N, Peña AS, Biemond I, Van Duijin W, Lamers CBHW, Teuchamann S, Hernandez S, Correa P. Antibodies to *Helicobacter pylori* and pepsinogen levels in children from Costa Rica: comparison of two areas with different risks for stomach cancer. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev.* 1992;1:449-54.

Spechler SJ, Fischbach L, Feldman M. Clinical aspects of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *JAMA* 2000;283:1264-6.

Suerbaum, S., Michetti, D. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002; (347): 1175-86.

Talley NJ, Vakil N, Ballard D, Fennerty MB. Absence of benefit of eradicating *Helicobacter pylori* in patients with nonulcer dyspepsia. *N Engl J Med*. 1999;341:1106-11.

Taylor, C.R., Cote, R.J. Immunocytomicroscopy: a diagnostic tool for surgical pathologist. In : *Major problems in Pathology* . 2 nd ed. New York : Raven; 1994. v.19, p. 421-3.

Testino G, Valentini M, Comaggia M. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:2133-5.

Tuite MF, Watts C, Weartherall SDJ, White KAH. Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori* evidence for a major role of apoptosis: regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: evidence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology*. 1997;113:1836-42.

Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *helicobacter pylori* infection: Implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterology*.. 2001;96:16-26.

Yamaoka Y, El-Zimaity HMT, Guitierrez O, Figura N, Kim JK, Kashima K, Graham DY. Relationship between the *cagA* 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology*. 1999;117:342-9.

Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Granam DY, Sepuveda AR. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H.pylori*-associated diseases. *J Clin Microbiol*. 1998;36:2258-63.