

LUCIANA DINIZ SILVA

**Pesquisa de *Helicobacter* spp. no fígado de pacientes submetidos
à biópsia hepática para esclarecimento diagnóstico**

FACULDADE DE MEDICINA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE - MINAS GERAIS

2006

Luciana Diniz Silva

**Pesquisa de *Helicobacter* spp. no fígado de pacientes submetidos
à biópsia hepática para esclarecimento diagnóstico**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à
obtenção de título de Doutor em Medicina.
Área de concentração: Gastroenterologia

Orientadora: Prof^a Dulciene Maria de Magalhães Queiroz

Co-orientadora: Prof^a Andreia Maria Camargos Rocha

Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte - Minas Gerais

2006

Silva, Luciana Diniz
S586p Pesquisa de *Helicobacter* spp. no fígado de pacientes submetidos
à biópsia hepática para esclarecimento diagnóstico/Luciana Diniz
Silva. Belo Horizonte, 2006.
131f., il.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Medicina.
Área de concentração: Gastroenterologia
Orientador: Dulciene Maria de Magalhães Queiroz
Co-orientadora: Andréia Maria Camargos Rocha
1. Infecções por *helicobacter*/diagnóstico 2. *Helicobacter pylori*/
isolamento & purificação 3. DNA/uso diagnóstico 4. Hepatopatias/
complicações 5. Vírus da hepatite b/patogenicidade 6. Pancreatopatias/
complicações 7. Gastropatias/complicações I. Título

NLM: WC 200
CDD: 616.08.022.7

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITORA

Prof^a Dr^a. Ana Lúcia de Almeida Gazola

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramirez

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco José Penna

COORDENADOR DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GASTROENTEROLOGIA

Prof. Dr. Marco Túlio Costa Diniz

DEDICATÓRIA

A meus professores, Dulciene, Renato Dani e Andreia, pela incansável ajuda
durante a elaboração da tese, com carinho.

“É preciso não esquecer nada”

É preciso não esquecer nada:

nem a torneira aberta nem o fogo aceso,

nem o sorriso para os infelizes

nem a oração de cada instante.

É preciso não esquecer de ver a nova borboleta

nem o céu de sempre.

O que é preciso é esquecer o nosso rosto,

o nosso nome, o som da nossa voz, o ritmo do nosso pulso.

O que é preciso esquecer é o dia carregado de atos,

a idéia de recompensa e de glória.

O que é preciso é ser como se já não fôssemos,

vigiados pelos próprios olhos

severos conosco, pois o resto não nos pertence.

Cecília Meireles

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, me ajudaram na realização deste trabalho. Em particular, agradeço:

- À Prof^ª. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz
- À Prof^ª. Andreia Maria Camargos Rocha
- Ao Prof. Renato Dani
- Ao Prof. Gifone Aguiar Rocha
- À Juliana Becattini Guerra
- À Prof^ª. Lúcia Porto Fonseca de Castro
- À Márcia Maria Negreiros Pinto Rocha
- À Débora
- Ao Luis Felipe
- Ao Paulo César
- Ao Prof. Aloísio Sales da Cunha
- Ao Prof. Celso Afonso
- À Prof^ª. Virgínia Hora Rios Leite
- À Prof^ª. Maria do Carmo Friche Passos
- Ao Prof. Luiz Guilherme Costa Lyra
- À Prof^ª. Celeste Carvalho Siqueira Elia
- À Prof^ª. Teresa Cristina de Abreu Ferrari
- À Prof^ª. Cláudia Alves Couto

- Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Medicina, área de concentração em Gastroenterologia, da Faculdade de Medicina/UFMG
- Às Secretárias do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina/UFMG
- Aos funcionários, bolsistas de Iniciação Científica e colegas de Pós-Graduação do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia
- Aos funcionários do Setor de Sorologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas/UFMG
- Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Gastroenterologia
- Aos médicos do Serviço de Gastroenterologia do HGIP IPSEMG
- Ao Guilherme Santiago Mendes
- Ao José Dayrell de Lima Andrade
- Ao Bruno Squacio Fernandes Sanchez
- Ao Gustavo Miranda Martins
- Aos funcionários do Setor de Arquivos e do Setor de Anatomia Patológica do HGIP IPSEMG
- Aos médicos do Serviço de Clínica Médica e do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Júlia Kubitscheck (FHEMIG)
- À Maria de Lourdes Barroso Gomes
- À Erica
- A meus pais
- À Juliana
- À Iracema
- Ao Jonas
- Ao CNPq, FAPEMIG, PRPq/UFMG, FINEP e CAPES

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Figuras	xvi
Resumo	xviii
Abstract	xx
1.0. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Helicobacter</i> spp. no fígado e nas vias biliares de animais	4
1.2. Associação entre infecção pelo <i>H. pylori</i> e doenças hepatobiliares em seres humanos, avaliada por métodos sorológicos	5
1.3. Presença de <i>Helicobacter</i> spp. nas vias biliares de seres humanos..	9
1.3.1. Doenças da vesícula biliar	9
1.3.2. Doenças colestáticas crônica	10
1.3.3. Tumores malignos das vias biliares	11
1.4. Presença de <i>Helicobacter</i> spp. no fígado de seres humanos.....	12
1.4.1. Hepatocarcinoma	13
1.4.2. Tumores do fígado e hepatopatia crônica associados ao VHB	15
1.4.3. Tumores do fígado e hepatopatia crônica associados ao VHC	17
2.0. OBJETIVOS	20
3.0. PACIENTES E MÉTODOS	22

3.1.	Pacientes	22
3.2.	Métodos	24
3.2.1.	Cultura	24
3.2.2.	Análise ultra-estrutural por coloração negativa	25
3.2.3.	Biologia molecular	26
3.2.3.1.	Extração de DNA	26
3.2.3.2.	Reação em cadeia da polimerase para identificação de <i>Helicobacter</i> ssp. diretamente dos fragmentos hepáticos	27
3.2.3.3.	Detecção de genes de virulência do <i>H. pylori</i>	30
3.2.3.4.	Sequenciamento do gene que codifica o RNAr 16S	33
3.3.	Exame histopatológico	34
3.3.1.	Imunohistoquímica para identificação de <i>H. pylori</i>	35
3.4.	Diagnóstico da infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>	37
3.4.1.	Teste respiratório com uréia marcada com ¹³ C	37
3.4.2.	Pesquisa de anticorpos anti- <i>H. pylori</i>	37
3.5.	Pesquisa de VHB no soro	39
3.5.1.	Pesquisa de HBsAg	39
3.5.2.	Pesquisa de anticorpos anti-HBc	40
3.5.3.	Pesquisa de anticorpos anti-HBs	41
3.6.	Pesquisa de infecção pelo VHC	42
3.7.	Perfil sorológico hepático	42
3.8.	Crterios diagnsticos das doenas hepáticas	43
3.8.1.	Doena hepática metastática	43

3.8.2.	Hepatocarcinoma	43
3.8.3.	Colangite esclerosante primária	44
3.8.4.	Hemocromatose	44
3.8.5.	Doença de Wilson	45
3.8.6.	Esteatohepatite não-alcóolica	45
3.8.7.	Hepatite auto-imune	46
3.8.8.	Síndrome de sobreposição	46
3.8.9.	Hepatopatia alcoólica	46
3.9.	Análise estatística	47
4.0.	RESULTADOS	50
4.1.	Características demográficas e detalhes clínicos dos pacientes estudados	50
4.2.	Detecção de <i>Helicobacter</i> spp. no fígado	53
4.2.1.	Isolamento em cultura de amostras de <i>Helicobacter</i> spp. do fígado dos pacientes estudados	53
4.2.2.	Amplificação dos genes <i>ureA</i> , <i>cagA</i> e <i>vacA</i> das amostras isoladas	55
4.2.3.	Detecção de DNA de <i>Helicobacter</i> spp. no fígado dos pacientes estudados	56
4.2.4.	Sequenciamento de <i>amplicons</i> do gene que codifica o RNAr 16S	58
4.2.5.	Imunohistoquímica para identificação de <i>H. pylori</i>	58
4.3.	Frequência dos marcadores sorológicos para a infecção pelo VHB ..	60
4.4.	Doença hepática primária ou metastática e presença de <i>H. pylori</i> no fígado	60

4.5.	Alterações histopatológicas no fígado dos pacientes dos quais isolou-se <i>H. pylori</i>	63
4.6.	Alterações histopatológicas no fígado dos pacientes dos quais detectou-se DNA de <i>H. pylori</i>	65
4.7.	Alterações histopatológicas no fígado dos pacientes com infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i> ..	69
5.0.	DISCUSSÃO	83
5.1.	Isolamento em cultura de amostras de <i>Helicobacter</i> spp. do fígado dos pacientes estudados	83
5.2.	Detecção de DNA de <i>Helicobacter</i> spp. no fígado dos pacientes estudados	87
5.3.	Doença hepática primária ou metastática e presença de <i>H. pylori</i> no fígado	91
5.3.1.	Complicações da doença hepática primária e presença de <i>H. pylori</i> no fígado	91
5.3.2.	Causas da doença hepática primária e presença de <i>H. pylori</i> no fígado	94
5.3.3.	Doença hepática metastática e presença de <i>H. pylori</i> no fígado: doença do pâncreas	96
5.4.	Alterações histopatológicas no fígado dos pacientes dos quais detectou-se <i>H. pylori</i>	98
5.5.	Alterações histopatológicas no fígado de pacientes com infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>	99
6.0.	CONCLUSÕES	103
7.0.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
8.0.	ANEXO	122

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP	- alfa-fetoproteína
Ag	-antígeno
ALT	- alanino aminotransferase
AST	- aspartato aminotransferase
C	- cirrose
¹³ C	- carbono 13
CA 19-9	- marcador tumoral
CA 125	- marcador tumoral
<i>cagA</i>	- <i>cyotoxin associated gene a</i>
CEA	- antígeno carcino-embriônico
CBP	- cirrose biliar primária
CEP	- colangite esclerosante primária
CHC	- carcinoma hepatocelular
DNA	- <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNA-VHB	- <i>deoxyribonucleic acid</i> do vírus da hepatite B
DOB	- <i>delta-over-baseline</i>
DP	- desvio padrão
ELISA	- <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>glmM</i>	- gene que codifica a fosfoglucoamina
gama GT	- gama-glutamil transferase
HA	- hepatite aguda
HAI	- hepatite auto-imune
HBc	- fração antigênica da parte central do vírus B
HBs	- fração antigênica da camada externa (envelope) do vírus B
HC	- hepatite crônica
HCA	- hepatite crônica em atividade
HIV	- vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida

IC	- intervalo de confiança
ICAM-1	- molécula de adesão
IFI	- imunofluorescência
IgG	- imunoglobulina G
IL-1	- interleucina 1
IL-6	- interleucina 6
IL-8	- interleucina 8
kda	- quilodalton
M	- multifatorial
MALT	- tecido linfóide associado à mucosa
MMP	- metaloprotease
pANCA	- anticorpo anti-citoplasma neutrofílico de padrão perinuclear
pb	- pares de base
PCR	- <i>polymerase chain reaction</i>
PCR-nested	- PCR aninhada
PSA	- antígeno prostático
RNA	- <i>ribonucleic acid</i>
RNAr 16S	- gene que codifica o RNA ribossômico 16S
<i>rps4</i>	- gene que codifica a proteína ribossomal S4
TGO	- transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	- transaminase glutâmico-pirúvica
TNF- α	- fator de necrose tumoral
TX30	- amostra de <i>H. pylori</i>
<i>ureA</i>	- <i>urease associated gene a</i>
<i>ureB</i>	- <i>urease associated gene b</i>
<i>vacA</i>	- <i>vacuolating cytoxin A</i>
VHB	- vírus da hepatite B
VHC	- vírus da hepatite C
VHC-RNA	- <i>ribonucleic acid</i> do VHC

LISTA DE TABELAS

1.	Prevalência da infecção pelo <i>H. pylori</i> em pacientes com doenças hepatobiliares crônicas, avaliada por método sorológico	8
2.	Iniciadores e condições das reações de PCR	32
3.	Seqüência dos iniciadores utilizados no sequenciamento do gene que codifica o RNAr 16S	34
4.	Características demográficas dos pacientes, doenças hepáticas, presença de <i>H. pylori</i> no fígado, infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i> e marcador sorológico para a infecção pelo VHB (n=125)	51
5.	Avaliação do grau de atividade e estadiamento das lesões hepáticas	52
6.	Dados demográficos dos três pacientes dos quais isolou-se <i>H. pylori</i> do fígado e características do microrganismo	55
7.	Covariáveis associadas à presença de <i>H. pylori</i> no fígado dos pacientes submetidos à biópsia hepática (n=125)	61
8.	Covariáveis associadas à presença de <i>H. pylori</i> no fígado dos pacientes submetidos à biópsia hepática (n=125)	62
9.	Presença de necrose e fibrose nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	65
10.	Avaliação da presença e do tipo de infiltrado inflamatório nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	66
11.	Covariáveis associadas à presença global de linfócitos nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	67
12.	Covariáveis associadas à presença de linfócitos na região médio-zonal do lóbulo hepático nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	68

13.	Avaliação de necrose e fibrose nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	69
14.	Covariáveis associadas à presença global de necrose nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	70
15.	Covariáveis associadas à presença de necrose na região médio-zonal do lóbulo hepático nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	71
16.	Covariáveis associadas à presença de necrose na região periportal nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	72
17.	Covariáveis associadas à presença global de fibrose nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	73
18.	Avaliação da presença e do tipo de infiltrado inflamatório nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	75
19.	Covariáveis associadas à presença global de neutrófilos nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	76
20.	Covariáveis associadas à presença de neutrófilos na região médio-zonal do lóbulo hepático nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	77
21.	Covariáveis associadas à presença global de linfócitos nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	78
22.	Covariáveis associadas à presença de linfócitos na região médio-zonal do lóbulo hepático nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	79
23.	Covariáveis associadas à presença global de histiócitos nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	80
24.	Covariáveis associadas à presença de histiócitos na região médio-zonal do lóbulo hepático nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)	81

LISTA DE FIGURAS

1. Coloração negativa de amostra de *Helicobacter* spp. isolada do fígado de um dos pacientes. A. Bactéria ligeiramente espiralada com 3 a 4 flagelos (barra= 0,2 μ m). B. Magnificação do flagelo com um bulbo terminal (barra= 0,2 μ m) 54

2. A. Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o RNAr 16S: canaleta 1, padrão de peso molecular (100 pb, Promega); canaleta 2, controle positivo (TX30), canaletas 3, 4, 7 e 8, amostras positivas (banda de 1500 pb); canaletas 5, 6 e 9, amostras negativas; canaleta 10, controle negativo interno (água destilada). B. Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o RNAr 16S: canaleta 1, padrão de peso molecular (100 pb, Promega); canaleta 2, controle positivo (TX30), canaletas 4, 5, 6, 7 e 8, amostras positivas (banda de 1200 pb); canaletas 3 e 9, amostras negativas; canaleta 10, controle negativo interno (água destilada). C. Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o RNAr 16S: canaleta 1, padrão de peso molecular (100 pb, Promega); canaleta 2, controle positivo (TX30), canaletas 3, 4, 5 e 9 amostras positivas (banda de 400 pb); canaletas 6, 7 e 8 amostras negativas; canaleta 10, controle negativo interno (água destilada). D. Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o *ureA*: canaleta 1, padrão de peso molecular (100 pb, Promega); canaleta 2, controle positivo (TX30), canaletas 3, 6 e 8, amostras positivas (banda de 361 pb); canaletas 4, 5, 7 e 9, amostras negativas; canaleta 10, controle negativo interno (água destilada). 57

3. Imunohistoquímica para identificação de *H. pylori* em cortes histológicos de mucosa gástrica e fígado de um paciente do qual a bactéria foi isolada do fígado. Bactérias amarronzadas (setas) em fundo azul, espiraladas, aderidas ao muco superficial ou na luz faveolar da mucosa gástrica A e no parênquima hepático B 59
4. Cortes histológicos de fígado dos pacientes dos quais se isolou *H. pylori*.
A. Presença de necrose periportal com infiltrado de linfócitos moderado no espaço porta e formação de agregados linfóides (seta) em fragmento hepático da paciente com hepatite crônica em atividade pelo VHC. **A₁**, HE 100X; **A₂**, HE 400X. **B.** Subversão da arquitetura lobular pela presença de septos fibrosos, hepatócitos com degeneração hidrópica acentuada e núcleos anisomórficos (setas), necrose hepática submaciça, presença global de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, neoformação de ductos biliares e colestase intracelular e intracanalicular em fragmento de fígado da paciente com doença de Wilson e hepatite fulminante secundária a medicamentos. **B₁**, Tricromo de Gomori (TG) 100X; **B₂**, TG 400X. **C.** Hepatócitos com degeneração hidrópica moderada e necrose lobular discreta com presença de poucos linfócitos e neutrófilos (seta) em fragmento de fígado do paciente com hepatite aguda por álcool. **C₁**, HE 100X; **C₂**, HE 400X. 64
5. Possíveis vias de acesso ao fígado de amostras gástricas de *H. pylori*. 86

RESUMO

DNA de *Helicobacter* tem sido observado no fígado de pacientes com cirrose e hepatocarcinoma e uma possível participação como fator de risco tem sido aventada. Na maioria dos trabalhos foram avaliados pacientes com hepatite viral e não há estudos incluindo pacientes com hepatopatias de outras etiologias como álcool e hepatite auto-imune. No período entre março de 2000 e dezembro de 2004, foram estudados, prospectivamente, 125 pacientes (65 do sexo masculino; média de idade de $52,4 \pm 15,7$ anos; faixa etária de 18 a 93 anos) com doenças hepáticas primárias ou metastáticas submetidos à biópsia hepática para esclarecimento diagnóstico. Fragmentos hepáticos foram obtidos por via transparietal ou laparoscópica. A pesquisa de *Helicobacter* no fragmento hepático foi feita por cultura e PCR-aninhada, empregando iniciadores específicos para o gene que codifica o RNAr 16S e para o gene *ureA*. A investigação da infecção gástrica pelo *Helicobacter pylori* foi feita por teste respiratório com uréia marcada com ^{13}C e pela pesquisa de anticorpos anti-*H. pylori* pelo método de ELISA. Com base em estudos sorológicos, associando a infecção crônica pelo vírus da hepatite B com taxas mais elevadas de infecção gástrica pelo *H. pylori*, marcadores da infecção pelo VHB, também, foram investigados nas amostras de soro de todos os pacientes incluídos no estudo. Amostras de *Helicobacter* foram isoladas, pela primeira vez, do fígado humano em três pacientes e, foram identificadas em espécie por microscopia eletrônica, imunohistoquímica, testes bioquímicos e sequenciamento do gene que codifica o RNAr 16S. DNA de *Helicobacter* foi detectado em 51 (40,8%) fragmentos hepáticos. O sequenciamento de todos os *amplicons* mostrou homologia com *H. pylori* igual ou superior a 99%. Em análise multivariada, a presença da bactéria no fígado associou-se, de maneira inédita, positivamente à pancreatopatias (especialmente neoplasia), bem como à infecção passada ou atual pelo VHB, mas não com hepatopatia alcoólica. Ainda, a presença de DNA de *Helicobacter* no fígado associou-se à infecção gástrica pelo *H. pylori*, achado que fortalece a hipótese de colonização hepática por bactérias oriundas do estômago. Por outro lado, não foi verificada associação

entre presença do microrganismo no fígado e alterações histopatológicas hepáticas, mas foi demonstrada, pela primeira vez, associação entre lesão necroinflamatória do fígado e infecção gástrica pela bactéria. Em conjunto, esses achados sugerem que o fígado pode ser colonizado pelo *H. pylori*, confirmam resultados anteriores (retrospectivos) e demonstram associações com outras doenças. Entretanto, se a presença do microrganismo no fígado é primária ou secundária ou se contribui para um desfecho desfavorável das doenças hepáticas, são fatos que necessitam ainda ser esclarecidos.

ABSTRACT

Helicobacter DNA has been detected in the liver of patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. These findings indicate a possible causal role of these bacteria in the development of chronic liver diseases. However, in the majority of these studies, only patients infected with hepatitis B or C virus have been evaluated. We investigated prospectively the presence of *Helicobacter* species in the liver of patients with hepatic diseases of different etiologies as alcohol and auto-immune hepatitis. From March, 2000 to December, 2004, we enrolled 125 consecutive patients (65 males; mean age of 52.4 ± 15.7 years; range 18 to 93 years) with primary or secondary hepatic diseases. Liver tissue specimens were obtained by laparoscopic or percutaneous biopsy. *Helicobacter* was investigated in the liver tissue samples by culture and nested-PCR, using specific primers for *ureA* and gene that codes for the 16S rRNA. *H. pylori* status was determined by ^{13}C urea breath test and serology. On the basis of the serological studies associating chronic B virus hepatitis (HBV) and high prevalence of *H. pylori* gastric infection, HBV markers had also been investigated in the serum samples of all patients. For the first time, *Helicobacter* strains were isolated from the human liver of three patients and were identified in species by ultra microscopy, immunohistochemistry, biochemical tests and sequencing analysis of amplified PCR products of the gene that codes for the 16S rRNA. *Helicobacter* DNA was detected in 51 (40.8%) liver tissue specimens. All 16S rDNA amplicons were sequenced and the sequences were more than 99.0% similar to that of *H. pylori*. In multivariate analysis, the presence of the bacterium in the liver was associated with pancreatic diseases (especially pancreatic tumors) and with last or current HBV infection, but was not with alcoholic hepatopathy. The presence of *Helicobacter* DNA in the liver was associated with *H. pylori* gastric infection, which strongly suggests that the liver is colonized by bacteria arising from the stomach. The presence of the microorganism in the liver was not associated with the presence of hepatic lesions at histology. However, the gastric infection with the bacterium associated with hepatic necroinflammatory lesions. Therefore, these findings suggest that the

liver may be colonized by the *H. pylori*, confirm previous retrospective results and demonstrate associations with other diseases. However, if the presence of the microorganism in the liver is primary or secondary or contributes to the hepatic damage, it will deserve further studies.

1.0. INTRODUÇÃO

Há mais de cem anos, pelas descrições feitas por RAPPIN em 1881 e BIZZOZZERO em 1892, tem-se conhecimento da presença de bactérias com forma espiralada na mucosa gástrica de animais. A primeira menção da presença desses microrganismos em seres humanos foi feita no ano de 1906 por KRIENITZ, ao estudar o estômago de pacientes com câncer gástrico (KRIENITZ, 1906). Em 1915, ROSENOW & SANFORD relataram o mesmo tipo de achado em estômagos de pacientes com úlcera duodenal e gástrica (ROSENOW & SANFORD, 1915). Entretanto, os microrganismos eram considerados meros oportunistas oriundos da cavidade oral, não sendo responsabilizados pelas lesões observadas no estômago dos pacientes (BUCKLEY & O'MORAIN, 1998).

No final do século passado, mais precisamente em 1982, dois pesquisadores australianos ao empregarem técnicas de cultivo apropriadas para o isolamento de bactérias do gênero *Campylobacter*, conseguiram isolar um microrganismo espiralado da mucosa gástrica de pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica (WARREN, 1983; MARSHALL, 1983). A bactéria, inicialmente classificada como pertencente ao gênero *Campylobacter* foi incluída em 1989 no recém criado gênero *Helicobacter*, com base em características ultra-estruturais, bioquímicas e genotípicas, especialmente no

que se refere ao conteúdo do gene que codifica o RNA ribossômico 16S (RNAr 16S), tendo sido denominada *H. pylori* (GOODWIN *et al.*, 1989).

Nos últimos 20 anos, o gênero *Helicobacter* expandiu rapidamente e engloba atualmente 26 espécies descritas segundo as normas internacionais de nomenclatura além de outras espécies que aguardam validação formal (FOX *et al.*, 2002a). As bactérias do gênero são curvas, fusiformes ou espiraladas, medindo em torno de 0,5 a 8,0µm de comprimento e 0,2 a 0,5µm de largura, Gram-negativas, microaerófilas, não esporuladas e móveis devido à presença de um número variável de flagelos uni ou bipolares, em geral embainhados (TAYLOR, 1992).

O gênero *Helicobacter* é dividido em dois grandes grupos. Um formado por bactérias que colonizam o estômago e o outro por espécies que colonizam o intestino. Dentre as espécies que colonizam a mucosa gástrica, o *H.pylori* é reconhecido como o principal agente etiológico da gastrite em seres humanos e um fator essencial na patogênese da úlcera péptica desempenhando, também, papel fundamental na cadeia de eventos que culminam com o desenvolvimento do carcinoma gástrico e do linfoma gástrico do tipo MALT (tecido linfóide associado à mucosa) (GRAHAM *et al.*, 1989; WOTHERSPOON *et al.*, 1991; COVER & BLASER, 1995). Aproximadamente 50,0% da população mundial encontram-se infectados pelo *H. pylori*, o que torna o microrganismo um dos patógenos humanos mais comuns; entretanto, somente uma pequena proporção dos indivíduos infectados desenvolve as doenças mais graves citadas acima (TAYLOR & BLASER, 1992).

Apenas o homem e, provavelmente, alguns primatas são naturalmente

colonizados pelo *H. pylori* (DUBOIS *et al.*, 1991; MÉGRAUD *et al.*, 1993). No homem, o microrganismo é encontrado na mucosa do estômago e em áreas de metaplasia gástrica no duodeno, na vigência de úlcera péptica duodenal. No estômago, o *H. pylori* pode ser isolado do corpo, fundo e antro gástricos e nessa última localização observa-se maior densidade bacteriana (TAYLOR *et al.*, 1987; QUEIROZ *et al.*, 1988). Há também relatos da presença do microrganismo na placa dentária, saliva e fezes de seres humanos (WESTBLON *et al.*, 1993; NGUYEN *et al.*, 1993).

O isolamento do *H. pylori* e o reconhecimento da morbidade associada à infecção pela bactéria em seres humanos estimularam estudos que propiciaram a descoberta de outras bactérias espiraladas, não apenas gástricas como também espécies que colonizam o intestino de diversos animais. Na última década, a grande maioria das novas espécies descritas foi isolada do intestino; algumas delas foram também encontradas no fígado e vias biliares (SOLNICK & SCHAUER, 2001). Vários pesquisadores acreditam que muitas espécies novas de *Helicobacter* deverão ser isoladas desses sítios nos próximos anos graças aos conhecimentos acumulados sobre o gênero e ao aprimoramento das técnicas de cultivo.

Algumas espécies, como *H. cinaedi* e *H. fennelliae*, identificadas no trato gastrointestinal baixo de animais e seres humanos, foram vistas estar associadas à diarreia e bacteremia. Outras espécies identificadas no intestino de seres humanos com diarreia foram também isoladas de animais sadios ou doentes, como cães (*H. rappini*, *H. canis*) e frangos (*H. pullorum*), o que reforça

o potencial zoonótico desse grupo de microrganismos (ROMERO *et al.*, 1988; STANLEY *et al.*, 1993; STANLEY *et al.*, 1994).

1.1. *Helicobacter* spp. no fígado e nas vias biliares de animais

Em 1992, o *H. hepaticus*, que habitualmente coloniza o ceco e o cólon de camundongos, foi isolado do fígado de determinadas linhagens com hepatite necrotizante multifocal (FOX *et al.*, 1994). A presença do microrganismo, em camundongos da raça A/JCr, foi associada à hepatite crônica em atividade e hepatocarcinoma (WARD *et al.*, 1994a; WARD *et al.*, 1994b). As lesões hepáticas associadas à infecção pela bactéria são caracterizadas por hepatomegalia, inflamação crônica, aumento do número de células ovais, células de Kupffer e células de Ito, além de proliferação de ductos biliares. Recentemente, foi observado que animais imunodeficientes (SCID/NCr), natural e experimentalmente infectados pelo *H. hepaticus*, desenvolviam hepatite e pancolite (LI *et al.*, 1998).

Vários pesquisadores identificaram outras espécies de *Helicobacter* no intestino, fígado e vias biliares de animais. *H. rappini*, isolado de fetos ovinos abortados, possui a capacidade de atravessar a barreira placentária de ovelhas prenhas e induzir aborto, além de causar hepatite necrotizante aguda nos fetos abortados (KIRKBRIDE *et al.*, 1985; BRYNER *et al.*, 1987). *H. pullorum* foi encontrado no intestino e fígado de galinhas com hepatite (STANLEY *et al.*, 1994). O *H. bilis*, à semelhança do *H. hepaticus*, tem sido identificado no

intestino, no fígado e na bile de camundongos com hepatite crônica (FOX *et al.*, 1995). Outras espécies como *H. canis* e o *H. cholecystus* foram isoladas do fígado de um cão com hepatite necrotizante e da vesícula biliar de hamsters com colangiofibrose e pancreatite (FRANKLIN *et al.*, 1996), respectivamente.

H. cinaedi, associado com diarreia e proctite em seres humanos, foi isolado por FOX *et al.* (2001) do colon, do fígado e de linfonodos mesentéricos de primatas com diarreia crônica. Ao exame histopatológico dos fragmentos hepáticos foram verificadas hiperplasia e hipertrofia de ductos biliares, além de inflamação e fibrose periportal. Em 2002, o mesmo grupo de pesquisadores identificou o *H. marmotae* em amostra de fígado de *Marmota monax* com hepatocarcinoma e em fezes de gatos (FOX *et al.*, 2002b).

Com base nos achados acima descritos tem sido sugerido que bactérias do gênero *Helicobacter* poderiam estar envolvidas na patogênese de doenças do intestino, fígado e vias biliares tanto de animais quanto de seres humanos.

1.2. Associação entre infecção pelo *H. pylori* e doenças hepatobiliares em seres humanos, avaliada por métodos sorológicos

Como a doença ulcerosa péptica é relativamente mais freqüente nos pacientes com cirrose hepática e a principal causa de úlcera gastroduodenal é a infecção pelo *H. pylori*, a possibilidade de associação entre infecção pela bactéria e doenças do fígado tem sido considerada (VERGARA *et al.*, 2002). Vários estudos têm avaliado essa associação.

Prevalência elevada da infecção pelo *H. pylori* em pacientes com doenças crônicas do fígado tem sido descrita, por vários autores. SIRINGO *et al.* (1997), na Itália, observaram a presença de anticorpos anti-*H. pylori* mais frequentemente em pacientes com cirrose hepática (76,0%) que em doadores de sangue (42,0%). Em estudos subseqüentes, os autores observaram que o aumento da prevalência ocorria, principalmente, nos pacientes com hepatopatias crônicas associadas à infecção pelo VHB (vírus da hepatite B) (FAN *et al.*, 1998; PONZETTO *et al.*, 2000a) e VHC (vírus da hepatite C) (PELLICANO *et al.*, 2000; PONZETTO *et al.*, 2003).

Resultados semelhantes foram observados por FAN *et al.* (1998), na China, onde a infecção foi vista ser mais freqüente em pacientes com hepatite crônica pelo VHB (55/96; 57,3%) que em indivíduos saudáveis (44/104; 42,3%). Os autores, ainda, demonstraram que a infecção era mais prevalente nos pacientes com sinais de replicação viral. PONZETTO *et al.* (2000a), na Itália, também demonstraram a presença mais freqüente de anticorpos anti-*H. pylori* em pacientes infectados pelo VHB que em doadores de sangue.

Ainda na Itália, em um estudo caso-controle, PELLICANO *et al.* (2000) verificaram maior prevalência da infecção pelo *H. pylori* em pacientes com cirrose associada ao VHC (89,0%) que em pacientes internados com outras comorbidades (59,0%). Posteriormente, os mesmos autores confirmaram os achados em pacientes com hepatite crônica e cirrose hepática pelo VHC quando comparados a doadores de sangue.

Em um estudo conduzido pelo nosso grupo em colaboração com pesquisadores da Argentina, a prevalência da infecção pelo *H. pylori* foi

investigada em uma coorte de 106 pacientes argentinos com hepatite C crônica. Em análise multivariada, as variáveis idade e infecção pelo *H. pylori* foram significativa e independentemente associadas à cirrose (QUEIROZ *et al.*, 2006).

LEONE *et al.* (2003), em Turim, na Itália, avaliaram a prevalência da infecção pelo *H. pylori* em pacientes com cirrose e CHC (carcinoma hepatocelular) associados ao VHC e 46 pacientes atendidos no Serviço de Urgência do Hospital. A infecção foi significativamente mais freqüente nos pacientes com CHC (OR: 3,02; IC 95%: 1,12-8,34; $p < 0,05$).

Diferentemente dos resultados citados anteriormente, WU *et al.* (1995), na China, RUDI *et al.* (1997) na Alemanha, ZULLO *et al.* (1999), na Itália bem como CALVET *et al.* (1997), na Espanha, pela pesquisa de anticorpos anti-*H. pylori*, não observaram diferenças na prevalência da infecção entre pacientes cirróticos e indivíduos saudáveis.

DURAZZO *et al.* 2002 e 2004, na Itália, não verificaram diferença na prevalência da infecção pelo *H. pylori* quando compararam pacientes com hepatopatia crônica associada à hepatite auto-imune ou com cirrose biliar primária e doadores de sangue.

Essas diferenças entre os estudos podem ser explicadas, em parte, por diferenças geográficas e clínicas dos indivíduos estudados ou, ainda, pelo desenho dos estudos. Na TAB. 1 encontram-se os estudos, que investigaram por métodos sorológicos associação entre a infecção pelo *H. pylori* e doenças hepatobiliares em seres humanos.

TABELA 1
Prevalência da infecção pelo *H. pylori* em pacientes com doenças hepatobiliares crônicas,
avaliada por método sorológico

Autores	Hepatopatia	Infecção pelo <i>H. pylori</i>		<i>p</i>
		pacientes (%)	controles (%)	
Wu <i>et al.</i> , 1995 China	C (VHB, VHC, VHB e VHD)	82/120 (68,0)	36/60 (60,0) ^a	0,35
Siringo <i>et al.</i> , 1997 Itália	C (M)	116/153 (76,0)	422/1010(42,0) ^a	0,05
Fan <i>et al.</i> , 1998 China	HC (VHB)	55/96 (57,0)	44/104 (42,0) ^a	0,05
Ponzetto <i>et al.</i> , 2000a Itália	C (VHB)	40/45 (89,0)	183/310 (59,0) ^a	0,05
Pellicano <i>et al.</i> , 2000 Itália	C (VHC)	226/254 (89,0)	275/463 (59,0) ^b	0,05
Durazzo <i>et al.</i> , 2002 Itália	HC (HAI)	20/31 (64,0)	33/62 (53,0) ^a	0,41
Ponzetto <i>et al.</i> , 2003 Itália	HC (VHC) C (VHC)	96/135 (71,0) 35/44 (79,0)	291/619 (47,0) ^a	0,05
Leone <i>et al.</i> , 2003 Itália	CHC e C (VHC)	36/46 (78,0)	25/46 (54,0) ^b	0,05
Durazzo <i>et al.</i> , 2004 Itália	HC (CBP)	78/149 (52,0)	291/619 (47,0) ^a	0,1
Queiroz <i>et al.</i> , 2006 Argentina	C (VHC)	34/47 (72,0)	28/59 (47,0) ^c	0,05

C, cirrose; CBP, cirrose biliar primária; CHC, carcinoma hepatocelular; HAI, hepatite auto-imune; HC, hepatite crônica; M, multifatorial [VHB (11,0%); VHC (23,0%); VHB e VHC (31,0%); álcool; criptogenética; CBP; álcool e vírus B ou C (18,3%)]; VHB, vírus da hepatite B; VHC, vírus da hepatite C; VHD, vírus da hepatite D; ^asaudáveis; ^bpacientes internados sem hepatopatia; ^chepatite crônica (VHC).

1.3. Presença de *Helicobacter* spp. nas vias biliares de seres humanos

1.3.1. Doenças da vesícula biliar

LIN *et al.* (1995) detectaram por PCR, o gene *ureA* de *H. pylori* em três de sete amostras de bile de pacientes com doenças hepatobiliares. A presença de bactérias espiraladas, coradas por imunohistoquímica com anticorpos específicos para o *H. pylori*, foi demonstrada por KAWAGUCHI *et al.* (1996) em cortes histológicos de vesícula biliar retirada de uma paciente com colecistite crônica. FOX *et al.* (1998a) demonstraram a presença de DNA de *H. bilis*, “*Flexispira rappini*” e *H. pullorum* em amostras de bile e de vesícula biliar. Essas espécies de *Helicobacter* são resistentes aos ácidos biliares, assim como o *H. hepaticus*, *H. canis* e *H. cholecystus* que foram isolados do trato biliar de animais (SCHAUER *et al.*, 1993; FOX *et al.*, 1996; FRANKLIN *et al.*, 1996).

Seguiram-se a esses, outros trabalhos na mesma linha de pesquisa identificando DNA na bile e/ou em fragmentos de vesícula biliar e fígado de pacientes com doenças hepatobiliares (ROE *et al.*, 1999; MYUNG *et al.*, 2000; MONSTEIN *et al.*, 2002; HARADA *et al.*, 2001; BULAJIC *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003).

No Brasil, o nosso grupo, também investigou a presença de espécies de

Helicobacter, por cultura e PCR-aninhada, na vesícula biliar e bile de 46 pacientes com e 18 sem colelitíase. O grupo controle era constituído por doadores de fígado e pacientes que se submeteram à colecistectomia como parte do tratamento cirúrgico para obesidade mórbida. DNA de *Helicobacter* foi detectado em fragmentos da vesícula biliar e bile de 31,3% e 42,9% dos pacientes, respectivamente, tendo sido observada associação entre colecistite e a presença de DNA de *Helicobacter* na vesícula biliar. Todos os produtos amplificados foram identificados por sequenciamento como *H. pylori* (SILVA *et al.*, 2003). Entretanto, diferentemente dos resultados citados acima, RUDI *et al.* (1999), na Alemanha e FALLONE *et al.* (2003), no Canadá não identificaram DNA de *Helicobacter* spp. na bile de pacientes com doenças das vias biliares. Ainda, MENDEZ SANCHEZ *et al.* (2001), no México, detectaram a presença de DNA de *Helicobacter* spp. em apenas um (1,0%) de 95 fragmentos de epitélio biliar de pacientes com colelitíase.

1.3.2. Doenças colestáticas crônicas

Cirrose biliar primária (CBP) e colangite esclerosante primária (CEP) são doenças colestáticas crônicas de origem desconhecida. Entre os vários possíveis agentes etiológicos que têm sido investigados encontram-se espécies de *Helicobacter*. FOX *et al.* (1998b), empregando PCR e hibridação, detectaram a presença de material genômico de *Helicobacter* spp. no fígado de cinco pacientes com CEP. Os produtos clonados e seqüenciados foram

identificados como *H. rodentium*, *Flexispira rappini* e *H. pullorum*. De forma semelhante, NILSSON *et al.* (2000) verificaram maior prevalência de DNA de *Helicobacter* em fragmentos de biópsia hepática de pacientes com CEP (9 de 12) e com CBP (11 de 12) que em controles (1 de 20). A maioria das espécies foi identificada por sequenciamento como *H. pylori*. Resultado diferente foi observado por TANAKA *et al.* (1999), nos EUA, que detectaram DNA da bactéria em somente uma (3,0%) de 29 amostras de fígado de pacientes com CBP.

1.3.3. Tumores malignos das vias biliares

A etiologia dos tumores que se originam no trato biliar também não é completamente esclarecida. Nos trabalhos citados anteriormente, o material genômico de bactérias do gênero *Helicobacter* foi identificado no fígado, vias biliares e bile de pacientes com litíase da via biliar ou doenças colestáticas crônicas. Os estudos que serão descritos adiante enfocam a associação entre *Helicobacter* spp. e carcinoma do trato biliar. NILSSON *et al.* (2001), na Suécia, amplificaram DNA de bactérias do gênero *Helicobacter* em fragmentos de fígado de dez (71,0%) pacientes com colangiocarcinoma (n=14). BULAJIC *et al.* (2002), empregando o teste de urease e PCR específica, identificaram a presença de *H. pylori* na bile de 12 (80,0%) pacientes com carcinoma de vias biliares. FUKUDA *et al.* (2002), no Japão, também detectaram DNA de *Helicobacter* spp. em dez (52,6%) pacientes com neoplasia das vias biliares.

MATSUKURA *et al.* (2002) identificaram material genômico do *H. bilis*, por PCR, na bile de 13 (87,0%) japoneses e 11 (79,0%) tailandeses com câncer do trato biliar. De forma semelhante aos trabalhos descritos anteriormente, foi verificada associação significativa entre neoplasia do trato biliar e presença do microrganismo na bile dos pacientes japoneses e tailandeses. MURATA *et al.* (2004) também identificaram DNA de *H. bilis* por PCR aninhada com iniciadores específicos para o gene que codifica o RNAr 16S em três (27,2%) de 11 pacientes com tumores da vesícula biliar e em um (33,3%) de três pacientes com colangiocarcinoma.

1.4. Presença de *Helicobacter* spp. no fígado de seres humanos

O nosso grupo isolou, pela primeira vez, uma amostra de *H. pylori* do fígado de uma paciente com cirrose associada à Doença de Wilson (QUEIROZ *et al.*, 2001) confirmando a hipótese de que o microrganismo pode se manter viável no fígado. As colônias da bactéria foram identificadas no meio de cultura após dez dias de incubação sob condições de microaerofilia à 37°C. O sequenciamento do gene que codifica o RNAr 16S demonstrou homologia superior a 99,0% com *H. pylori*.

1.4.1. Hepatocarcinoma

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o tumor primário maligno do fígado mais freqüente no homem. Estima-se que cerca de 1.250.000 casos novos são diagnosticados ao ano, em todo mundo. A sobrevida, ao fim de cinco anos, situa-se abaixo de 5,0%; 70,0 a 80,0% dos pacientes falecem em média aos quatro a seis meses a partir do diagnóstico (LIOVET & BRUIX, 1999). A incidência do hepatocarcinoma varia de acordo com a localização geográfica, entre grupos étnicos e em regiões de um mesmo país. As diferenças na distribuição geográfica, no sexo e faixa etária são atribuídas a variações na exposição ao vírus da hepatite B e C, assim como a outros fatores ambientais. Vários fatores de risco potenciais para o desenvolvimento do CHC já foram identificados como infecções crônicas pelos vírus citados acima, toxinas ambientais (aflatoxinas, *microcystins*-hepatotoxina produzida por algas), hemocromatose hereditária, etilismo e cirrose de qualquer etiologia (UENO *et al.*, 1996; SHERLOCK & DOOLEY, 2002). Por outro lado, em alguns pacientes com CHC não são identificados fatores de risco conhecidos. Recentemente, a participação de bactérias no desenvolvimento de tumores tem sido aventada. A infecção pelo *H. pylori*, como descrito anteriormente, é considerada carcinogênica do tipo I e está associada ao carcinoma gástrico distal e ao linfoma gástrico do tipo MALT. Com base nesses achados, espécies de *Helicobacter* têm sido consideradas potencialmente como fator de risco na gênese do CHC.

AVENAUD *et al.* (2000) pesquisaram a presença de bactérias do gênero *Helicobacter* em fragmentos de fígado de oito pacientes franceses com CHC, por cultura e PCR. DNA de *Helicobacter* spp. foi demonstrado em todas as amostras de CHC e em somente um caso do grupo controle (12,5%).

De forma semelhante, NILSSON *et al.* (2001) verificaram a presença de DNA de bactérias do gênero *Helicobacter* em fragmentos de fígado de 12 (75,0%) pacientes com CHC (n=16). A maioria dessas espécies foi identificada por sequenciamento como *H. pylori*. DNA de *Helicobacter* spp. não foi detectado nas amostras de fígado de pacientes com metástases hepáticas de tumor colorretal.

Na Holanda, VERHOEF *et al.* (2003) pesquisaram a associação entre a presença de *Helicobacter* spp. no fígado de pacientes com CHC sem cirrose (n=20) e em amostras de pacientes com neoplasia colônica metastática (n=31). A presença de DNA de *Helicobacter*, avaliada por PCR-aninhada, estava presente em nove (45,0%) amostras de pacientes com CHC e em três (9,7%) do grupo sem hepatocarcinoma. A pesquisa do microrganismo foi positiva no estômago de três (33,0%) pacientes com CHC nos quais a pesquisa havia sido positiva no fígado. A análise das seqüências do gene que codifica o RNAr 16S das amostras gástricas e hepáticas demonstrou semelhança entre as amostras, sugerindo que o fígado é colonizado por amostras gástricas.

1.4.2. Tumores do fígado e hepatopatia crônica associados ao VHB

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) é um problema de saúde pública mundial, pois se estima que haja entre 300 e 350 milhões de portadores de VHB no mundo. Dos portadores crônicos em geral, mais de 250.000 morrem por ano em consequência de doença hepática associada à infecção pelo VHB. É possível que mais de dois bilhões de pessoas tenham sido ou ainda estejam infectadas pelo VHB e que cerca de 5,0% da população mundial seja portadora crônica do vírus (SILVA, 2003). Dos adultos portadores do VHB, 15,0% a 20,0% desenvolvem cirrose dentro de cinco anos. Indivíduos infectados cronicamente pelo VHB possuem um risco aumentado para o desenvolvimento de CHC (LOK *et al.*, 2001).

Entretanto, alguns fatores que poderiam modificar o curso da infecção pelo VHB e determinar o aparecimento de doença crônica do fígado, como a presença de bactérias do gênero *Helicobacter*, ainda, não foram bem estabelecidos.

Em um estudo realizado na China, onde a prevalência de CHC e infecção por VHB são elevadas, FAN *et al.* (2002), por PCR, detectaram DNA de *Helicobacter* spp. em fragmentos de biópsia hepática de nove (60,0%) dentre 15 pacientes com CHC, mas não no fígado de pacientes sem a doença (colelitíase, hemangioma, tumores hepáticos benignos). O produto amplificado de quatro dessas amostras foi seqüenciado e identificado como *H. pylori*. Posteriormente, os mesmos autores, em outro trabalho, investigaram por PCR,

outros genes específicos do *H. pylori* em amostras de fígado de 20 pacientes com CHC. Os genes que codificam a proteína de 26 kDa, fosfoglicosamina (*glmM*) e proteína CagA (*cagA*) foram identificados em 7/8 (87,5%), 2/8 (25,0%) e 2/8 (25,0%), amostras nas quais havia DNA de *Helicobacter*, respectivamente. Os genes que codificam a citotoxina vacuolizante (*vacA*) e a proteína ribossomal S4 (*rps4*) não foram detectados. No estudo, a presença da bactéria foi, ainda, investigada no tecido por imunohistoquímica usando anticorpos anti-*H. pylori*. Um pequeno número de organismos espiralados foi observado em sinusóides hepáticos e nos espaços porta de seis (30,0%) dos 20 pacientes com CHC (HUANG *et al.*, 2004).

ITO *et al.* (2004), no Japão, estudaram pacientes com CHC associado à infecção pelos vírus B ou vírus C (n=17) e amplificaram fragmentos do gene que codifica o RNAr 16S e do *ure B* de *Helicobacter* em todas as cinco amostras de fígado dos pacientes com CHC associados à infecção pelo vírus B (5/17). Dentre as amostras, duas foram seqüenciadas e identificadas como *H. pylori*.

Entretanto, diferentemente dos estudos citados, avaliando pacientes com CHC associado ao VHB, COPPOLA *et al.* (2002), na Itália não identificaram DNA de *Helicobacter* spp. em fragmentos de biópsias hepáticas de sete pacientes com CHC associado à infecção pelo VHB.

1.4.3. Tumores do fígado e hepatopatia crônica associados ao VHC

A infecção pelo vírus C representa, atualmente, um dos maiores problemas mundiais de saúde pública. Calcula-se que a prevalência média global seja de 3,0% (variando de 0,1 a 5,0% em diferentes países): 150 milhões de portadores do vírus em todo mundo. Estima-se, também, que a incidência anual de infecções sintomáticas seja de um a três casos/100.000 habitantes. Cerca de 80,0 a 85,0% dos pacientes com hepatite C não conseguem eliminar o vírus, tornando-se portadores crônicos, com possível evolução para hepatite crônica, cirrose hepática e CHC (LAUER & WALKER, 2001; ALBERTI & BENVEGNÚ, 2003).

Como dito anteriormente, alguns fatores de risco que determinam o curso das doenças hepáticas crônicas não estão completamente esclarecidos. Alguns estudos demonstraram associação entre a presença de espécies de *Helicobacter* no fígado e hepatopatias associadas à infecção pelo vírus C. PONZETTO *et al.* (2000b), na Itália, verificaram DNA de *Helicobacter* em fragmentos hepáticos de 23 (92,0%) pacientes com CHC e hepatite pelo VHC (n=25). DORE *et al.* (2002), também na Itália, pesquisaram DNA de microrganismos do gênero *Helicobacter* em fragmentos de fígado, por PCR, empregando iniciadores específicos para os genes que codificam o RNAr 16S e a citotoxina vacuolizante (*vacA*). A pesquisa foi positiva em cinco (17,0%) de 30 amostras de pacientes com hepatopatia crônica e cirrose associadas ao

VHC e em seis (55,0%) de 11 amostras de pacientes com cirrose e CHC. O gene *vacA* foi detectado em dez de 41 amostras (24,0%).

Ainda na Itália, PELLICANO *et al.* (2004) detectaram DNA que codifica o RNAr 16S de *Helicobacter* em 17 (85,0%) de 20 e em dois (33,0%) de seis fragmentos de biópsia hepática de pacientes com CHC e tumor de colon metastático, respectivamente. Os pacientes com hepatocarcinoma apresentavam também cirrose hepática, ambos associados à infecção pelo vírus da hepatite C. As seqüências eram similares às seqüências do gene que codifica o RNAr 16S de *H. pylori* e *H. pullorum*.

No Japão, como citado acima, ITO *et al.* (2004) avaliaram pacientes com CHC associado à infecção pelos vírus B ou vírus C (n=17) e amplificaram fragmentos do gene que codifica o RNAr 16S (75,0%) e do *ure B* (42,0%) de *Helicobacter* em fragmentos hepáticos de pacientes com CHC associado à infecção pelo VHC (n=12). Entretanto, DNA de *Helicobacter* não foi identificado em fragmentos de fígado de pacientes com cirrose sem CHC e de indivíduos com função hepática normal. A presença da bactéria no tecido foi confirmada por imunohistoquímica em três (13,0%) de sete casos cuja PCR era positiva e o sequenciamento de quatro *amplicons* mostrou que as espécies eram *H. pylori*.

Os resultados de um estudo conduzido pelo nosso grupo em colaboração com pesquisadores da Universidade de Bordeaux, também, reforçam a hipótese de uma possível participação da bactéria na gênese de doenças hepáticas associadas à infecção pelo vírus da hepatite C. DNA de *Helicobacter* spp. foi detectado em 19 de 21 (91,0%) amostras de fígado de

pacientes com CHC e em 19 de 31 (61,3%) pacientes com cirrose, ambos secundários à hepatite por vírus C. Por outro lado, o DNA da bactéria foi detectado em fragmento de fígado de apenas um de 29 (3,5%) pacientes com hepatite C sem cirrose e em um de 24 (4,2%) controles sem doenças hepáticas. Dentre as amostras seqüenciadas, 35 foram identificadas como *H. pylori* e três como *H. pullorum* (ROCHA *et al.*, 2005).

Diferentemente, COPPOLA *et al.* (2002), na Itália, como citado anteriormente, não detectaram DNA de *Helicobacter* em fragmentos hepáticos de 40 pacientes com infecção crônica pelo VHC.

2.0. OBJETIVOS

Há evidências sugerindo a participação de bactérias do gênero *Helicobacter* na gênese de doenças hepáticas. Entretanto, não há estudos sobre o assunto com desenho prospectivo. Ainda, não foi investigada a presença desses microrganismos no fígado de pacientes com doenças hepáticas de outras etiologias que as citadas na introdução. Portanto, para ampliar o conhecimento na área, são objetivos desse estudo:

1. Investigar prospectivamente por PCR e cultura a presença de *Helicobacter* spp. em fragmentos de fígado de pacientes consecutivos submetidos à biópsia hepática para esclarecimento diagnóstico;
2. Identificar as espécies de *Helicobacter* isoladas por meio de testes bioquímicos e fisiológicos, microscopia eletrônica, imunohistoquímica e sequenciamento do gene que codifica o RNAr 16S;
3. Identificar, por sequenciamento, as espécies de *Helicobacter* detectadas por PCR;
4. Avaliar a presença de infecção gástrica pelo *H. pylori*, por teste respiratório com uréia marcada com ^{13}C e por pesquisa de anticorpos específicos no soro por ELISA;
5. Avaliar associações entre a presença de *Helicobacter* spp. no fígado e as diferentes doenças hepáticas dos pacientes, em modelos logísticos ajustando para variáveis de confusão;

6. Avaliar associações entre a presença de *Helicobacter* spp. no fígado e no estômago e as alterações histológicas dos fragmentos de fígado dos pacientes estudados, em modelos logísticos ajustando para variáveis de confusão.

3.0. PACIENTES E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia da Faculdade de Medicina da UFMG. Participaram, ainda, do estudo, depois de aprovação pelo Comitê de Ética das instituições envolvidas (UFMG, ETIC 050/00; HGIP-IPSEMG; HJK-FHEMIG), o Serviço de Gastroenterologia do Hospital Governador Israel Pinheiro (HGIP-IPSEMG) e Hospital Júlia Kubitscheck (HJK-FHEMIG).

3.1. Pacientes

No período entre março de 2000 e dezembro de 2004, foram incluídos, prospectivamente, 125 pacientes (65 do sexo masculino; média de idade de $52,4 \pm 15,7$ anos; faixa etária de 18 a 93 anos) submetidos à biópsia hepática para diagnóstico ou avaliação do grau e estadiamento de lesões do fígado atendidos consecutivamente no Serviço de Gastroenterologia dos hospitais citados acima. Não foram incluídos pacientes com contra-indicações absolutas ao procedimento de biópsia hepática: comprometimento grave do estado geral; não cooperativos; transtornos graves da coagulação; uso de anti-inflamatórios não-esteróides por um período superior a sete dias que antecedem o exame; icterícia obstrutiva e dilatação acentuada das vias biliares intra-hepáticas;

infecções bacterianas das vias biliares; ascite tensa, cistos hepáticos e grandes hemangiomas (ARTURO *et al.*, 2001). Não foram incluídos pacientes que não concordaram em participar do estudo como também mulheres grávidas ou amamentando.

Ao serem incluídos no estudo, os pacientes assinaram o termo de consentimento informado e responderam a um questionário contendo informações sobre os dados pessoais, sócio-demográficos, clínicos e fatores de risco associados à hepatopatia (Anexo 1). Foram também submetidos ao exame clínico, exames complementares bioquímicos, sorológicos e radiológicos por técnicas rotineiras para o diagnóstico das diferentes doenças hepáticas. A pesquisa de marcadores para infecção pelo VHB e testes da função hepática, que estão descritos posteriormente no item métodos, foram realizados em amostras de soro de todos os pacientes incluídos no estudo. Marcadores tumorais foram investigados em todos os casos nos quais a origem da metástase hepática não estava definida. Fragmentos de fígado foram obtidos com agulha de Menghini por via transparietal ou via laparoscópica para a pesquisa de *Helicobacter* spp. por cultura, PCR e coloração específica em cortes histológicos e exame histopatológico.

O diagnóstico da infecção gástrica pelo *H. pylori* foi feito pelo teste respiratório com uréia marcada com ^{13}C e pela pesquisa de anticorpos anti- *H. pylori* pelo método de ELISA (ROCHA *et al.*, 1998; SCHADEWALDT *et al.*, 1997). Nos casos onde amostras de *Helicobacter* foram cultivadas do fígado, os pacientes que concordaram foram submetidos à esofagogas-

trooduodenoscopia para obtenção de fragmentos de biópsia gástrica para a pesquisa de *H. pylori*.

3.2. Métodos

3.2.1. Cultura

Os fragmentos de fígado e de mucosa gástrica (em dois casos), para cultura, foram colocados imediatamente em 0,5 mL de caldo tioglicolato de sódio (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), transportados em banho de gelo para o laboratório e processados no período máximo de 1 hora. Os fragmentos foram homogeneizados em triturador de tecido e inoculados em meio Belo Horizonte (BHM) (QUEIROZ *et al.*, 1987). As placas foram incubadas em microaerofilia obtida com o uso de Anaerocult C (Merck, Darmstadt, Alemanha), à 37°C, por 21 dias e foram examinadas a cada três dias.

A identificação dos microrganismos isolados foi feita inicialmente pela morfologia das colônias, coloração pelo método de Gram e pela carbolfucsina, teste da urease pré-formada, reação da oxidase e da catalase. Provas de redução do nitrato, hidrólise do hipurato, produção de gama-glutamil transferase, fosfatase alcalina e de H₂S foram realizadas com o sistema de identificação API-Campy (Biomerieux, França), segundo as recomendações do fabricante. Foi avaliada, ainda, a capacidade de crescimento das amostras em

diferentes temperaturas (25, 37 e 42°C) e diferentes condições atmosféricas (aerobiose, anaerobiose e microaerofilia), assim como, na presença de 1,0% de bile, 1,5% de NaCl, 1,0% de glicina e dos antimicrobianos ácido nalidíxico (30 µg) e cefalotina (30 µg). Uma amostra de *H. pylori* (TX30A) e uma de *Campylobacter jejuni* (NCTC 11351) foram incluídas como controles.

Depois da identificação fenotípica, o crescimento em cultura pura de uma placa foi removido com o auxílio de *swab* e transferido para um tubo de microcentrífuga contendo 500 µL de água quimicamente pura estéril. A suspensão foi centrifugada a 12000 *g* por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento mantido em freezer a -80°C até a extração de DNA e subsequente caracterização e identificação genotípica.

3.2.2. Análise ultra-estrutural por coloração negativa

Amostras cultivadas em ágar sangue foram transferidas para um tubo de microcentrífuga contendo tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. Uma gota dessa suspensão foi aplicada sobre uma tela de cobre (300 “meshs”) recoberta com *formvar* por 1 minuto. A gota foi aspirada com papel de filtro e uma gota de ácido fosfotúngstico a 1,0% p/v (pH 6,5) foi aplicada na tela e removida depois de 30 segundos (coloração negativa). As telas foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss E. M. 10) operado a 50 kV.

3.2.3. Biologia molecular

3.2.3.1. Extração do DNA

Fragmentos de fígado

O DNA foi extraído usando o *kit* QIAamp Tissue® (QIAGEN®) de acordo com as especificações do fabricante, com pequenas modificações (MONTEIRO *et al.*, 2001). Para controle da extração foi usada água destilada.

Os sedimentos foram colocados em tubos de microcentrifuga e 180 µL do Tampão ATL (*Tissue Lysis Buffer*) e 20 µL de proteinase K foram adicionados a cada tubo, misturados em vórtex, e incubados a 56°C por 18 horas. À cada amostra foram acrescentados 200 µL de Tampão AL. Os tubos foram incubados a 70°C por dez minutos.

A seguir, 200 µL de etanol (96,0-100,0%) foram adicionados a cada tubo e essa mistura foi colocada na coluna fornecida pelo *kit* QIAamp que foi centrifugada a 6.000 *g* por um minuto.

Cada coluna spin QIAamp foi colocada então dentro de um tubo coletor de dois mL. O material da coluna foi lavado duas vezes (250 µL cada) com o primeiro tampão (Buffer AW1) e duas vezes com o segundo tampão de lavagem (Buffer AW2) fornecidos pelo *kit*.

Depois da última lavagem, cada coluna spin QIAamp foi inserida no interior de um tubo de microcentrifuga e o tubo coletor contendo o filtrado foi descartado. O DNA foi eluído com 100 µL de água deionizada estéril (2 x 50 µL). Determinou-se a concentração do DNA por espectrofotometria. O DNA extraído foi estocado a - 20°C até o uso.

Microorganismos isolados em cultura

A extração de DNA dos microrganismos isolados em cultura foi feita empregado o *kit* QIAamp Tissue[®] (QIAGEN[®]) de acordo com as recomendações do fabricante, seguindo as etapas descritas no item anterior.

3.2.3.2. Reação em cadeia da polimerase para identificação de *Helicobacter* spp. diretamente dos fragmentos hepáticos

Amplificação do gene que codifica o RNAr 16S e do gene ureA de Helicobacter spp. em fragmentos de fígado

A amplificação do gene que codifica o RNAr 16S e do gene *ureA* foi feita por PCR-aninhada (*nested-PCR*). Os iniciadores e condições, previamente descritos por FOX *et al.* (1995), FOX *et al.* (1998a), FRANKLIN *et al.* (1996),

CLAYTON *et al.* (1992) e WANG *et al.* (1993) estão descritos na TAB.2. A primeira reação amplifica quase que a totalidade do gene que codifica o RNAr 16S (aproximadamente 1500 pb) de eubactérias.

Os reagentes da primeira PCR para cada um dos genes consistiram de dois μL de DNA, 200 μM de cada deoxunucleotídeo, três mM de MgCl_2 (Invitrogen), 1,0% de tampão da Taq platinum (200 mM Tris-HCl (pH 8,4) e 500 mM KCl-Invitrogen), 2,5 U de Taq DNA polimerase platinum (Invitrogen), 0,5 μM de iniciador *foward* e 0,5 μM de iniciador *reverse* de cada gene (Gibco), respectivamente, para uma reação de 20 μL .

Uma amostra padrão de *H. pylori* (TX30) foi usada como controle positivo para a pesquisa do gene que codifica o RNAr 16S de *Helicobacter* spp. e do gene *ureA* específico de *H. pylori*. Uma amostra de *Escherichia coli* (isolada de um paciente com infecção do trato urinário) e água destilada foram usadas como controle negativo e controle negativo interno da reação, respectivamente. O gene da β globulina foi usado para controle da presença de DNA no tecido.

A segunda reação (PCR-aninhada) foi feita de acordo com o protocolo descrito acima, tanto para o gene que codifica o RNAr 16S como para o gene *ureA*, com alterações apenas na concentração de MgCl_2 , que passou a ser 1,5 mM, acrescentando ao final um μL do produto de PCR.

Foi usado um termociclador (GeneAmp[®] PCR System 9700, Applied Biosystems) e os produtos amplificados foram identificados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%. O gel foi corado com brometo de etídio e examinado em luz ultravioleta.

*Critérios de positividade e negatividade para a pesquisa de DNA de **Helicobacter** spp. em fragmentos de fígado*

A pesquisa de DNA de *Helicobacter* spp. foi considerada positiva quando na 2ª reação foram detectadas bandas de 1200 e/ou 400 pb referentes à amplificação do gene que codifica o RNAr 16S. Esse resultado foi confirmado pela amplificação de um fragmento de 411 pb na primeira reação ou de 361pb na segunda reação que correspondem ao gene *ureA*.

Amplificação do gene que codifica o RNAr 16S e do gene ureA do DNA dos microrganismos isolados em cultura

A amplificação do gene que codifica o RNAr 16S e do gene *ureA* de DNA extraído dos microrganismos isolados em cultura foi feita por PCR. Para a amplificação do *ureA*, 20 a 100 ng de DNA das amostras foram adicionados à solução tampão da Taq DNA polimerase 1X (KCl 50 mM e Tris-HCl 10 mM), 1,5 mM de MgCl₂, 100 µM de cada deoxinucleotídeos, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison WI, EUA) e 10 pmol de cada iniciador para um volume final da reação de 20 µL. Foram usados os iniciadores e as condições descritas previamente por CLAYTON *et al.* (1992) (TAB. 2).

O gene que codifica o RNAr 16S do gênero *Helicobacter* foi amplificado usando os iniciadores C97 e C98 descritos por FOX *et al.* (1998a) que geram

produtos de aproximadamente 400 pb. As concentrações usadas na reação foram as mesmas descritas para a amplificação do *ureA*. As seqüências dos iniciadores e as condições da reação são mostradas na TAB. 2. Uma amostra padrão de *H. pylori* (TX30) foi usada como controle positivo, uma amostra de *E. coli* como controle negativo e água destilada como controle negativo interno da reação. Quase a totalidade do gene que codifica o RNAr 16S (aproximadamente 1500 pb) foi amplificado de acordo com FOX *et al.* (1995) para posterior sequenciamento.

Foi usado um termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) e os produtos amplificados foram identificados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, que foi corado com brometo de etídio e examinado em luz ultravioleta.

3.2.3.3. Detecção de genes de virulência do *H. pylori*

Amplificação do gene cagA de DNA de microrganismos isolados em cultura

Para aumentar a sensibilidade de detecção do *cagA* de DNA extraído dos microrganismos isolados em cultura, foram usados dois pares de iniciadores: os descritos por PEEK *et al.* (1995) e os propostos por KOEHLER *et al.* (2003).

Iniciou-se a pesquisa com os iniciadores de PEEK *et al.* (1995). A amplificação foi feita em um volume total de 20 µL, contendo 20 a 100 ng do DNA das amostras, tampão da Taq DNA polimerase 1X (KCL 50 mM e Tris-HCl 10 mM), 1,5 mM de MgCl₂, 100 µM de cada deoxinucleotídeos, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, WI, EUA) e 10 pmol de cada iniciador.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% que foi corado com brometo de etídio e analisado em transiluminador de luz ultravioleta. Quando o resultado foi negativo, foram usados os iniciadores descritos por KOEHLER *et al.* (2003). As concentrações usadas na reação foram as mesmas detalhadas acima. As condições da reação estão descritas na TAB. 2.

Em todas as reações, uma amostra de *H. pylori* da coleção do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia (1010-95) foi usada como controle positivo e a amostra padrão TX30, como controle negativo. Água destilada foi usada como controle negativo interno da reação. Foram consideradas *cagA*-positivas as amostras que apresentaram resultado positivo em pelo menos uma das reações e *cagA*-negativas, quando o resultado das duas reações foi negativo.

TABELA 2
Iniciadores e condições das reações de PCR

Gene amplificado	Iniciadores	Temperatura, tempo e ciclos para PCR	Produto PCR (pb)
<i>RNAr16S</i>	FOX <i>et al.</i> (1995) C70 (f): 5'-AGAGTTTGATYMTGGC-3' B37 (r): 5'-TACGGYTACCTTGTACGA-3'	95°C-5 min., 24 ciclos de 94°C-45s, 50°C-45s, 72°C-45s, mais 5s/ciclo e 72°C-15min.	1500
<i>RNAr16S</i>	FOX <i>et al.</i> (1998a) C97 (f): 5'-GCTATGACGGGTATCC-3' C05 (r): 5'-ACTTCACCC CAGTCGCTG-3'	95°C-5min., 34 ciclos de 94°C-1min., 55°C-2,30min., 72°C-3min., 72°C-15min.	1200
<i>RNAr 16S</i>	FRANKLIN <i>et al.</i> (1996) C97 (f): 5'-GCTATGACGGGTATCC-3' C98 (r): 5'-GATTTTACCCCTACACCA-3'	95°C-5min., 34 ciclos de 94°C-1min., 55°C-2,30min., 72°C-3min. e 72°C-15min	400
<i>ureA</i>	CLAYTON <i>et al.</i> (1992) <i>ureA</i> (f) 5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3' <i>ureA</i> (r) 5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3'	95°C-5min., 34 ciclos de 94°C-1min., 45°C-1 min., 72°C-1min. e 72°C-5min	411
<i>ureA</i>	WANG <i>et al.</i> (1993) <i>Urenest.</i> (f): 5'-AGTTCCTGGTGAGTTGTTCT-3' <i>Urenest.</i> (r): 5'-AGCGCCATGAAAACCACGCT-3'	96°C 30s, 40 ciclos de 56°C-15s, 74°C-30s.	361
<i>cagA</i>	PEEK <i>et al.</i> (1995) <i>cagA</i> (f): 5'- GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG-3' <i>cagA</i> (r): 5'- CTGCAAAAGATTGTTTGCGAGA-3'	94°C -1 min., 39 ciclos de 55°C-1 min., 72°C- 2 min.	349
<i>cagA</i>	KOELER <i>et al.</i> (2003) 1(f): 5'-CGTTGATAAGAA(C/T)GATAGGGATAA-3' 1 (r): 5'-GATCCCCAAATTTCTGAAAGCTCTT-3'	95°C-5min., 34 ciclos de 95°C-1min., 58°C-1 min., 72°C-1min	181

pb, pares de base (tamanho do produto)

3.2.3.4. Sequenciamento do gene que codifica o RNAr 16S

Para certificar se os produtos amplificados de 1500 pb ou de 400 pb pertencem ao gene que codifica o RNAr 16S das bactérias do gênero *Helicobacter* e para determinar a espécie do microrganismo os mesmos foram seqüenciados diretamente após purificação (Wizard® PCR Preps DNA Purification System, Promega Corporation, Madison, WI, EUA).

Os produtos amplificados de 1500 pb de DNA extraído dos microrganismos isolados em cultura foram diretamente seqüenciados com o *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante e nove iniciadores descritos na TAB. 3 em um seqüenciador automatizado de DNA Applied Biosystems (ABI PRISM 310, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Os produtos amplificados de 400 pb de DNA extraído de fragmentos de fígado e de mucosa gástrica de um paciente foram seqüenciados com os iniciadores C97 e C98 citados na TAB. 3. Foram obtidas seqüências de todas as amostras estudadas.

As seqüências foram alinhadas usando o programa CAP da INFOBIOGEN (www.infobiogen.fr) e em seguida as seqüências consenso foram comparadas com as seqüências de diversos microrganismos disponibilizadas pelo GenBank usando o programa BLAST do National Center of Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

TABELA 3
Seqüência dos iniciadores utilizados no seqüenciamento do gene que
codifica o RNAr 16S

<i>Iniciador</i>	Seqüência 5' - 3'	Posição ^a
C70 (f)	AGAGTTTGATYMTGGC	8-23
C97 (f)	GCTATGACGGGTATCC	262-277
C98 (r)	GATTTTACCCCTACACCA	642-659
B34 (r)	RCTGCTGCCTCCCGT	344-358
B35 (r)	GTRTTACCGCGGCTGCTG	519-536
B37 (r)	ACGGYTACCTTGTTACGA	1495-1513
X91 (r)	CCCGGGAACGTATTCACCG	1369-1387
C01 (r)	GGTTGCGCTCGTTGCGGG	1096-1113
C31 (f)	GGAATCGCTAGTAATCG	1337-1353

^a Número baseado na seqüência da *E. coli*; (f), *forward*; (r), *reverse*.

3.3. Exame histopatológico

Os fragmentos de biopsia foram fixados imediatamente em formaldeído a 10,0%, desidratados em soluções de concentrações crescentes de álcool e em xilol e, a seguir, embebidos em parafina. Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram obtidos e corados pela hematoxilina e eosina, tricromo de Gomori e coloração para reticulina. Os diagnósticos histológicos de cirrose e hepatite crônica foram baseados na classificação de ISHAK *et al.* (1995). A caracterização anátomo-patológica da esteatohepatite não-alcólica foi

realizada de acordo com os critérios de BRUNT (2001). A classificação do carcinoma hepatocelular foi baseada nas orientações da Organização Mundial da Saúde (ISHAK, *et al.*, 1994). Os tumores primários do fígado ocupavam 10,0 a 100,0% do fragmento hepático (média 75,0% $\pm$ 43,6%, mediana 95). Os tumores hepáticos secundários foram identificados através do aspecto morfológico. As metástases hepáticas ocupavam 20,0 a 100,0% do fragmento hepático (média 68,5 % $\pm$ 31,5%, mediana 85).

Os componentes da atividade necroinflamatória (necrose, presença e tipo de infiltrado inflamatório) foram avaliados nos espécimes de biópsia hepática (disponível em 117 pacientes; média do número de tratos portais 15,4 $\pm$ 8,1; faixa de 4-34; mediana 13) de acordo com protocolo estabelecido (Anexo 2). Necrose e infiltrado inflamatório foram analisados nas três regiões do ácino hepático, região periportal ou zona 1, região médio-zonal ou zona 2 e região perivenular ou zona 3. Alterações na arquitetura, presença de expansão fibrosa do espaço porta, fibrose em ponte (septos porta-porta; septos porta-centro) e fibrose (esboço de nódulos e cirrose) também foram avaliados nos fragmentos de fígado estudados de acordo com protocolo estabelecido (Anexo 2).

3.3.1. Imunohistoquímica para identificação de *H. pylori*

Cortes histológicos de 4 μ m de espessura foram também obtidos para a detecção de *H. pylori* por imunohistoquímica pelo método da estreptavidina-avidina-biotina (LSAB^{plus}) com o *kit* da BIOGEN[®]. Foram usados um anticorpo

policlonal (NovoCastra, NewCastle, Reino Unido), na diluição de 1:25 e um anticorpo policlonal de fabricação caseira, na diluição de 1:800, ambos em solução comercial (*NovoCastra Antibody Diluent with Background Reducing Components*) (BARBOSA *et al.*, 1988; MARZIO *et al.*, 1998; VAIRA *et al.*, 1999). Resumidamente, a reativação dos sítios antigênicos para o anticorpo foi efetuada por imersão das lâminas em tampão citrato (pH 6,0) ou solução de EDTA (pH 8,0) pré-aquecidos em calor úmido (56°C). Depois da imersão, procedeu-se ao bloqueio da atividade de peroxidase endógena pela incubação dos cortes em solução de H₂O₂ a 3,0% e metanol por 20 minutos. A seguir, a incubação com o anti-soro primário foi feita em câmara úmida a 4°C por 18 horas e, posteriormente, procedeu-se à incubação com anti-soro secundário por 20 minutos (*Biotinylated Anti-Polyvalent-Dako*) em câmara úmida à temperatura ambiente. A seguir, a incubação com o complexo sABC-peroxidase (*Streptavidin-Biotin*) foi feita em câmara úmida à temperatura ambiente, por 20 minutos. Depois dessa última etapa de incubação, foi efetuada a revelação com 3-3'-diaminobenzidina (DAB líquido, Dako[®], substrato-cromógeno), por 20 segundos. A seguir, lavagens intermediárias foram feitas com PBS (2 x, 5 minutos cada uma). A coloração de fundo foi feita com hematoxilina de Harris. Cortes de fragmentos gástricos com gastrite crônica associada ao *H. pylori* foram usados como controles positivos. O resultado foi considerado positivo quando foram identificados microrganismos morfológicamente semelhantes ao *H. pylori* corados em marrom.

3.4. Diagnóstico da infecção gástrica por *H. pylori*

3.4.1. Teste respiratório com uréia marcada com ^{13}C

Foram colhidas duas amostras de ar expirado, em bolsas de plástico; a primeira do paciente em jejum de 6 horas e a outra 30 minutos depois da ingestão de 75 mg de uréia marcada com ^{13}C diluída em 200 mL de suco de laranja. A urease da bactéria presente no estômago de pacientes *H. pylori* positivos desdobra a uréia ingerida em amônia e CO_2 marcado (GRAHAM *et al.*, 1987). A concentração de carbono marcado foi determinada em espectrometria de luz infravermelha de isótopos estáveis (IRIS Analysator, Wagner Analysen Technik, Worspswede, Alemanha). Os resultados expressos em DOB (delta-over-baseline) foram considerados positivos sempre que o seu valor foi maior que 4‰. A sensibilidade e a especificidade do teste para a nossa população são de 97,0% e 95,0%, respectivamente.

3.4.2. Pesquisa de anticorpos anti-*H. pylori*

De cada paciente foram colhidos 5 mL de sangue venoso com sistema a vácuo (Vacuum II, Industria e Comércio Ltda, São Paulo). O soro foi separado por centrifugação, dividido em alíquotas e conservado em freezer à -20°C . A

pesquisa de anticorpos anti-*H. pylori* foi feita pelo método imunoenzimático (ELISA) usando o kit comercial Cobas Core anti-*H. pylori* EIA (Roche Diagnostic Systems, Basel, Suíça) que apresenta sensibilidade e especificidade de 95,4% e 100,0%, respectivamente para adultos brasileiros (ROCHA *et al.*, 1998). O antígeno usado no *kit* é composto por proteínas da bactéria, parcialmente purificadas, incluindo a urease e excluindo as flagelares. As reações foram feitas no aparelho Cobas Core (espectrofotômetro) de acordo com as recomendações do fabricante. O procedimento é automatizado.

Numa primeira etapa, as amostras de soro diluídas 1:41 com a solução diluente foram incubadas em tubos de ensaio contendo esferas de poliestireno revestidas com antígenos de *H. pylori*, por 18 minutos, a 37°C, protegidos da luz. Os anticorpos reativos ao antígeno do *H. pylori* fixaram-se à esfera. O material não aderido foi removido com a lavagem das esferas com água deionizada. A seguir, foi acrescentado à reação o conjugado anti-IgG humana, de origem caprina, marcado com peroxidase. Depois de novas etapas de incubação e lavagem, uma solução do substrato contendo 5 mmol/L de 3,3', 5,5' tetrametil-benzidina em 3 mmol/L de dimetil-sulfóxido e peróxido de hidrogênio em tampão citrato foi adicionada à reação. Os tubos foram incubados nas condições citadas anteriormente e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico a 5,0%.

*Critérios de positividade e negatividade para o diagnóstico da infecção gástrica pelo **H. pylori***

Os pacientes foram considerados *H. pylori*-positivos quando o teste respiratório ou ELISA foram positivos e *H. pylori*-negativo quando ambos foram negativos.

3.5. Pesquisa de VHB no soro

Com base nos dados da literatura associando a infecção crônica pelo vírus da hepatite B e presença de DNA de *Helicobacter* spp. no fígado, os marcadores sorológicos HBsAg, anti-HBc e anti-HBs foram investigados nas amostras de soro dos 125 pacientes estudados, independentemente da situação clínica ou natureza da moléstia.

3.5.1. Pesquisa de HBsAg

A pesquisa de HBsAg foi feita pelo método imunoenzimático usando o *kit* comercial Enzygnost® HBsAg 5.0 (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, EUA) que apresenta sensibilidade e especificidade de 100,0% e 99,8%, respectivamente. A reação foi feita de acordo com as recomendações do

fabricante. Resumidamente, as amostras de soro e os controles foram incubados a 37°C, por 60 minutos, com anticorpo policlonal anti-HBs previamente aderido aos orifícios da placa de microtitulação e também com uma solução de anti-HBs marcado com biotina. A seguir, os orifícios foram lavados por quatro vezes com tampão de lavagem, quando, foi acrescentado à reação o conjugado estreptavidina/peroxidase. Procedeu-se à incubação por 30 minutos a 37°C. Depois de nova etapa de lavagem nas condições descritas anteriormente, uma solução de peróxido de hidrogênio e tetrametil-benzidina (TMB) foi acrescentada à reação, com um período de incubação de 30 minutos, a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de solução de ácido sulfúrico 0,5 N. A leitura da densidade óptica foi feita por espectrofotometria com filtro de 450 nm.

3.5.2. Pesquisa de anticorpos anti-HBc

A pesquisa de anticorpos anti-HBc foi feita pelo método imunoenzimático usando o *kit* comercial Enzygnost® anti-HBc monoclonal (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, EUA) que apresenta sensibilidade e especificidade de 96,9% e 99,2%, respectivamente. O teste baseia-se em uma reação competitiva na qual o antiHBc da amostra testada e o conjugado anti-HBc-peroxidase competem entre si para se fixarem ao antígeno HBc previamente aderido aos orifícios da placa de microtitulação. A reação foi feita de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, as amostras de soro e

os controles foram adicionados aos orifícios da placa de microtitulação, e a seguir, o conjugado anti-HBc-monoclonal marcado com peroxidase foi acrescentado à reação. Procedeu-se a incubação por 60 min a 37°C. Depois desse período, os orifícios foram lavados por quatro vezes com tampão de lavagem. A seguir, foi acrescentada à reação, uma solução do substrato contendo peróxido de hidrogênio e tetrametil-benzidina (TMB). Procedeu-se a uma nova etapa de incubação por 30 minutos a 25°C, quando a reação foi interrompida pela adição de solução de ácido sulfúrico 0,5 N. A leitura da densidade óptica foi feita por espectrofotometria com filtro de 450 nm.

3.5.3. Pesquisa de anticorpos anti-HBs

A pesquisa de anticorpos anti-HBs foi feita pelo método imunoenzimático usando o *kit* comercial Enzygnost® anti-HBs monoclonal (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, EUA) que apresenta sensibilidade e especificidade de aproximadamente 99,0%. A reação foi feita de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, as amostras de soro e os controles foram adicionados aos orifícios da placa de microtitulação, e a seguir, o conjugado anti HBs-monoclonal marcado com peroxidase foi acrescentado à reação. Procedeu-se a incubação por 60 minutos a 37°C quando os orifícios foram lavados por quatro vezes com tampão de lavagem. A seguir, foi acrescentada à reação, uma solução do substrato contendo peróxido de hidrogênio e tetrametil-benzidina (TMB). Depois de nova etapa de incubação

por 30 minutos a 25°C, a reação foi interrompida pela adição de solução de ácido sulfúrico 0,5 N. A leitura da densidade óptica foi feita por espectrofotometria com filtro de 450 nm.

3.6. Pesquisa de infecção pelo VHC

Infecção pelo VHC foi investigada pela pesquisa de IgG anti-VHC por ELISA de terceira geração (AxSYM HCV 3.0, ABBOTT, Wiesbaden, Alemanha) e de RNA do vírus (Cobas amplicor HCV 2.0; Roche diagnostics, Branchburg, Nova Jersey, EUA) no soro dos pacientes.

Para o diagnóstico de infecção pelo VHB e VHC, além dos testes citados nos itens 3.5 e 3.6, a análise histopatológica de fragmentos hepáticos também foi considerada para o diagnóstico da infecção.

3.7. Perfil sorológico hepático

A função hepática foi avaliada por métodos rotineiros: marcadores de necrose hepática [aspartato aminotransferase (AST) e a alanino aminotransferase (ALT)]; marcadores de colestase (fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase e bilirrubinas) e síntese hepática (proteínas totais e frações e tempo de protrombina) (BRANDÃO & MARRONI *et al.*, 2001).

3.8. Critérios diagnósticos das doenças hepáticas

3.8.1. Doença hepática metastática

O diagnóstico de tumores hepáticos secundários foi baseado no estudo histopatológico do fígado e na pesquisa de marcadores tumorais específicos de acordo com a suspeita clínica do foco primário [CEA (antígeno carcino-embriônico), AFP (alfa-fetoproteína), CA19-9, CA125 e PSA (antígeno prostático)] (SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

3.8.2. Hepatocarcinoma

O diagnóstico foi baseado em métodos de imagem (ultra-sonografia, tomografia helicoidal, ressonância magnética), na elevação da AFP (alfa-fetoproteína) acima de 400 ng e nas alterações da histologia hepática que foram classificadas de acordo com as orientações da Organização Mundial da Saúde (ISHAK, *et al.*, 1994).

3.8.3. Colangite esclerosante primária

O diagnóstico da CEP foi baseado em três critérios: 1) exclusão de causas de colangite esclerosante secundária; 2) aumento superior a três vezes o valor de referência da fosfatase alcalina por um período mínimo de seis meses; 3) achados colangiográficos compatíveis com CEP que se traduzem por áreas irregulares de estenoses curtas (0,5 cm) ou longas (2,0 cm), acompanhadas de dilatações, situadas na árvore biliar intra e/ou extra-hepática (padrão em colar de contas). Procedeu-se também à pesquisa de anticorpos p-ANCA (anticorpos anti-citoplasma de neutrófilo de padrão perinuclear), que foi considerada positiva quando os títulos foram iguais ou superiores a 1:80 e ao estudo histopatológico do fígado (PORTINCASA *et al.*, 2005).

3.8.4. Hemocromatose

O diagnóstico de hemocromatose foi feito com base no encontro de sintomas e sinais clínicos clássicos concomitantemente aos exames laboratoriais indicativos de sobrecarga de ferro e lesão tissular hepática. O diagnóstico foi confirmado quando a saturação de transferrina ultrapassou a taxa de 45,0%, o nível sérico de ferritina excedeu 200 µg/L (400 ng/mL) e a determinação semi-quantitativa da impregnação hepática de ferro, pela

coloração de Perls, foi superior a dois com distribuição desse íon predominantemente periportal e hepatocitária (PIETRANGELO, 2003).

3.8.5. Doença de Wilson

O diagnóstico da doença de Wilson foi feito com base no encontro de sintomas e sinais clínicos clássicos concomitantemente aos exames laboratoriais indicativos de alteração da excreção hepatobiliar de cobre com acúmulo desse elemento no fígado e sinais de lesão hepática. O diagnóstico foi confirmado por níveis séricos baixos de ceruloplasmina (<20 mg/dL) e cobre sérico (<70 μ g/dL) e aumento da excreção de cobre na urina de 24/horas (>100 μ g/24 horas). Ainda, foi considerado no diagnóstico, o estudo histopatológico do fígado. Para avaliação da presença do cobre em fragmentos de fígado foi empregada a coloração com rodamina (ALA & SCHILSKY, 2004).

3.8.6. Esteatohepatite não-alcóolica

O diagnóstico de esteatohepatite não-alcóolica foi feito com base nos achados da ultra-sonografia (fígado hiper-refringente e com atenuação do feixe sonoro nos planos profundos), na elevação, superior a 1,5 vezes o valor de referência das enzimas hepáticas (ALT e gama-GT) e nos critérios morfológicos de BRUNT (2001).

3.8.7. Hepatite auto-imune

O diagnóstico de HAI foi baseado na presença de quadro clínico compatível de acordo com os critérios diagnósticos do Grupo Internacional de estudos da HAI (ALVAREZ *et al.*, 1999).

3.8.8. Síndrome de sobreposição

O diagnóstico de Síndrome de sobreposição foi feito em todas as situações em que o paciente não apresentou formas clássicas de HAI, caracterizando assim as formas variantes (CZAJA, 1996; CANÇADO *et al.*, 2003).

3.8.9. Hepatopatia alcoólica

O diagnóstico de hepatopatia alcoólica foi baseado na história de ingestão crônica de álcool e na ausência de evidências de outras causas de doença hepática (SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

3.9. Análise estatística

Os dados foram analisados no programa estatístico SPSS versão 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Foram criados vários modelos logísticos para identificar fatores de risco (variáveis independentes) associados à presença de DNA de *H. pylori* no fígado (variável dependente), pois foi verificada a sobreposição de diversos co-fatores. As variáveis independentes foram dicotomizadas em presentes e ausentes. Inicialmente foram avaliadas como co-fatores independentes as lesões hepáticas independentemente da causa: hepatite aguda, hepatite crônica e cirrose e fatores do hospedeiro, idade, sexo e status *H. pylori* no estômago. No segundo modelo, foram incluídas as causas das alterações hepáticas, fatores do hospedeiro (idade, sexo) e status *H. pylori* no estômago. Só foram selecionadas as doenças hepáticas com frequência ≥ 6 para permitir um ajustamento adequado do modelo. Doença hepática induzida por drogas e doenças infecto-parasitárias não foram incluídas devido à variedade das drogas e dos parasitas. As variáveis, hepatite alcoólica, esteatohepatite não-alcoólica e hepatite pelo VHC foram avaliadas como co-fatores independentes. Infecção prévia ou atual pelo VHB, analisadas em conjunto, doenças do pâncreas [pancreatite crônica (n=2); doença policística do pâncreas (n=1); adenocarcinoma (n=9)], neoplasia de vesícula biliar, idade (categorizada) e sexo, também, foram incluídos no modelo como variáveis independentes. Variáveis com valor de $p \leq 0,25$ na análise univariada foram selecionadas para a análise multivariada. As diferenças foram consideradas

estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$. As razões de chance e intervalos de confiança de 95% foram calculados. O teste de *Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit* foi usado para avaliar a adequabilidade dos modelos.

Da mesma maneira, como foi descrito acima, devido à sobreposição de causas de lesão hepática, modelos logísticos foram criados para identificar fatores de risco (variáveis independentes) associados à presença de alterações necroinflamatórias (variável dependente). As variáveis independentes foram dicotomizadas em presentes e ausentes. Infecção gástrica pelo *H. pylori*, etiologias de doença hepática com frequência ≥ 6 [hepatopatia alcóolica, doença hepática auto-imune (hepatite auto-imune mais síndrome de sobreposição), esteatohepatite não-alcóolica, hepatopatia crônica pelo VHC e hepatite por medicamentos] e fatores do hospedeiro (idade e sexo) foram avaliados como cofatores independentes associados com a presença de necrose no fígado (variável dependente). Associação entre essas variáveis independentes e presença de infiltrado inflamatório (variável dependente) com neutrófilos ou mononucleares (linfócitos e histiócitos) no fígado, também, foi investigada. Vale ressaltar que na avaliação histopatológica, as afecções com características de auto-imunidade, hepatite auto-imune e síndrome de sobreposição, foram avaliadas em conjunto. O objetivo principal nessa análise era verificar co-fatores associados à presença de lesão no fígado. Diferentemente, na primeira análise, em que o objetivo era avaliar os co-fatores (etiologia de doença hepática) que estavam associados com a presença da bactéria no fígado, as afecções auto-imunes foram analisadas separadamente.

As síndromes de sobreposição apresentam aspectos peculiares ou desvios dos quadros típicos das hepatopatias auto-imune clássicas, assim, apresentam dificuldades na definição da etiologia e do diagnóstico.

4.0. RESULTADOS

4.1. Características demográficas e detalhes clínicos dos pacientes estudados

Dos 125 pacientes estudados, 29 foram submetidos à biópsia hepática devido à presença de tumores metastáticos originados do pâncreas (n=9), do tubo digestivo [esôfago (n=1), estômago (n=3), cólon e reto (n=3)], vesícula biliar (n=6), pulmão (n=1), rim (n=1), colo uterino (n=1), mama (n=2) e ovário (n=2). Em dois casos não foi possível definir o sítio primário das metástases hepáticas. Outras doenças malignas foram observadas em seis casos [linfoma (n=4), hemangioepitelioma (n=1) e tumor neuroendócrino (n=1)] TAB. 4.

Hepatopatia alcóolica [(n=26), incluindo CHC (n=2)], hepatite auto-imune (n=5), síndrome de sobreposição (n=4), esteatohepatite não-alcóolica (n=6), hepatopatia crônica pelo VHB [(n=4), incluindo CHC (n=1)], hepatopatia crônica pelo VHC (n=8), doença hepática induzida por drogas [cetoconazol (n=2), amoxicilina-clavulanato (n=1), quinolona (n=1), anestésicos (n=2), anti-retrovirais (n=1), agrotóxico (n=1), corticosteróide (n=1), anti-hipertensivos (n=1), anfetamina (n=1)], cirrose criptogenética (n=5) e doenças infecto-parasitárias [forma hepatointestinal (n=3) e forma hepato-esplênica (n=2) de

TABELA 4

Características demográficas dos pacientes, doenças hepáticas, presença de *H. pylori* no fígado, infecção gástrica pelo *H. pylori* e marcador sorológico para a infecção pelo VHB (n=125)

Doença	n	Sexo (M/F)	Média de idade $\pm$ DP (anos)	Faixa etária (anos)	DNA de <i>H. pylori</i> no fígado ¹ (n/%)	Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i> ² (n/%)	IgG anti- HBc ³ (n/%)
Neoplasias malignas ⁴	37	14/23	57,3 $\pm$ 15,0	30-93	13 (35,1)	24 (64,9)	4 (10,8)
Hepatopatia alcoólica ⁵	26	24/2	51,2 $\pm$ 12,3	24-71	8 (30,8)	24 (92,3)	6 (23,1)
Hepatite auto-imune	5	0/5	38,0 $\pm$ 18,1	18-56	1 (20,0)	3 (60,0)	0 (0,0)
Síndrome de sobreposição	4	1/3	42,5 $\pm$ 4,2	37-47	0 (0,0)	2 (50,0)	1 (25,0)
Esteatohepatite não-alcoólica	6	1/5	57,2 $\pm$ 15,8	47-87	4 (66,7)	6 (100,0)	0 (0,0)
Hepatopatia crônica pelo VHB ⁶	4	3/1	56,0 $\pm$ 9,8	46-69	3 (75,0)	4 (100,0)	4 (100,0)
Hepatopatia crônica pelo VHC ⁷	8	4/4	57,3 $\pm$ 11,7	42-75	5 (62,5)	7 (87,5)	0 (0,0)
Hepatopatia por medicamentos	11	5/6	44,2 $\pm$ 20,1	18-70	6 (54,5)	8 (72,7)	0 (0,0)
Cirrose criptogenética	5	3/2	59,4 $\pm$ 19,5	34-80	4 (80,0)	4 (80,0)	2 (40,0)
Doença infecto-parasitária ⁸	6	3/3	44,0 $\pm$ 15,5	21-67	2 (33,3)	5 (83,3)	0 (0,0)
Outros ⁹	13	7/6	51,7 $\pm$ 17,9	23-84	5 (38,5)	8 (61,5)	1 (7,7)
TOTAL	125	65/60	52,4 $\pm$ 15,7	18-93	51 (40,8)	95 (76,0)	18 (14,4)

n, número de indivíduos; M, masculino; F, feminino; DP, desvio padrão; VHB, vírus da hepatite B; VHC, vírus da hepatite C; 1, por PCR; 2, por ELISA e teste respiratório; 3, por ELISA; 4, não inclui os CHC, que estão incluídos nas causas primárias; tumores pancreáticos (n=9); 5, dois casos de pancreatite crônica associada à hepatite alcoólica e dois casos de CHC; 6, um caso de CHC; 7, um caso de co-infecção com HIV (vírus da imunodeficiência adquirida) e um caso de infecção crônica pelo VHC associada ao uso de álcool; 8, Esquistossomose e Calazar; 9, Síndrome de Dubin-Johnson, litíase intra-hepática, elevação da gama-glutamil transferase, colangite esclerosante primária, hemocromatose, Doença de Wilson, CHC sem cirrose, lupus eritematoso sistêmico, doença policística pancreática e doença inflamatória intestinal.

esquistossomose mansônica e Calazar (n=1)] foram identificados em 75 pacientes. Nos demais, o diagnóstico foi de síndrome de Dubin-Johnson (n=1), litíase intra-hepática (n=1), elevação da gama-GT (n=2), CEP (n=2), hemocromatose (n=2), Doença de Wilson (n=1), CHC sem cirrose (n=1), lupus eritematoso sistêmico (n=1), doença policística pancreática (n=1) e doença inflamatória intestinal (n=1) TAB. 4. Na TAB. 5 encontram-se a avaliação do grau e o estadiamento das lesões hepáticas.

TABELA 5
Avaliação do grau de atividade e estadiamento das lesões hepáticas

Doença	Hepatite aguda	Hepatite crônica	Cirrose	CHC
Hepatopatia alcoólica ¹	8	-	16	2
Hepatite auto-imune	-	4	1	-
Síndrome de sobreposição	-	4	-	-
Esteatohepatite não-alcoólica	-	4	2	-
Hepatopatia crônica pelo VHB ²	-	1	2	1
Hepatopatia crônica pelo VHC	-	6	2	-
Hepatopatia por medicamentos	5	6	-	-
Cirrose criptogenética	-	-	5	-
Doença infecto-parasitária	-	1	-	-
Outros ³	-	-	5	1
TOTAL	13	26	33	4

VHB, vírus da hepatite B; VHC, vírus da hepatite C; CHC, carcinoma hepatocelular; 1, CHC associado à cirrose (n=2); 2, CHC associado à hepatite crônica (n=1); 3, Doença de Wilson, colangite esclerosante primária, hemocromatose, CHC sem cirrose.

4.2. Detecção de *Helicobacter* spp. no fígado

4.2.1. Isolamento em cultura de amostras de *Helicobacter* spp. do fígado dos pacientes estudados

Amostras de *Helicobacter* spp., depois de nove dias de incubação, foram isoladas de fragmentos do fígado de três pacientes. As colônias da bactéria eram puntiformes e douradas, indistinguíveis de colônias de *H. pylori*. Dos três casos foram obtidas subculturas com dois a três dias de incubação em microaerofilia a 37°C; porém, não houve crescimento a 25°C e 42°C, em aerobiose e anaerobiose. À coloração de Gram, os microrganismos isolados foram classificados como Gram-negativos. O teste da urease pré-formada, reação da oxidase e da catalase, produção de gama-glutamil transferase e fosfatase alcalina foram positivos em todos os casos. Os microrganismos não foram capazes de reduzir nitrato em nitrito e hidrolizar o hipurato, assim como não cresceram na presença de 1,0% de bile, 1,5% de NaCl, 1,0% de glicina, 30 µg de ácido nalidíxico e de 30 µg de cefalotina.

À microscopia eletrônica, as bactérias eram ligeiramente espiraladas com três a quatro flagelos embainhados bipolares com bulbo terminal FIG. 1.

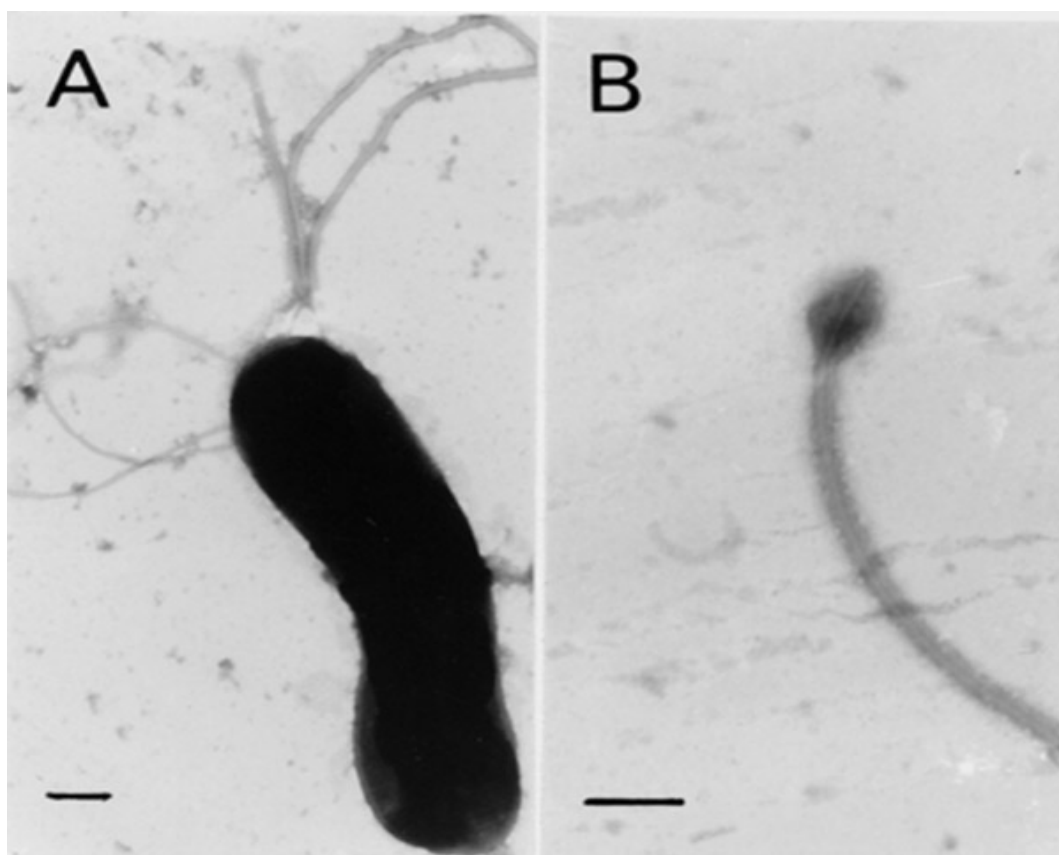


Figura 1. Coloração negativa de amostra de *Helicobacter pylori* isolada do fígado de um dos pacientes. A. Bactéria ligeiramente espiralada com três a quatro flagelos (barra= 0,2 μ m). B. Magnificação do flagelo embainhado com um bulbo terminal (barra= 0,2 μ m).

4.2.2. Amplificação dos genes *ureA*, *cagA* e *vacA* das amostras isoladas

A pesquisa de *ureA* e *cagA* foi positiva nas três e uma (33,4%) das três amostras, respectivamente. O genótipo s2m2 do gene *vacA* foi identificado em uma das amostras e o padrão s1m1 nas demais.

As características dos pacientes bem como do microrganismo estão descritas na TAB. 6.

TABELA 6
Dados demográficos dos três pacientes dos quais isolou-se *H. pylori* do fígado e características do microrganismo

Doença	Hospedeiro		<i>H. pylori</i>		
	Sexo (M/F)	Idade (anos)	<i>ureA</i>	<i>cagA</i>	<i>vacA</i>
Hepatite fulminante secundária a medicamentos em paciente com doença de Wilson	F	23	+	-	S2m2
Hepatite crônica em atividade pelo VHC	F	53	+	+	S1m1
Hepatite aguda por álcool	M	39	+	-	S1m1

M, masculino; F, feminino; VHC, infecção pelo vírus da hepatite C; *ureA*, gene que codifica urease; *cagA*, gene que codifica a proteína CagA; *vacA*, gene que codifica a proteína VacA (citotoxina vacuolizante).

4.2.3. Detecção de DNA de *Helicobacter* spp. no fígado dos pacientes estudados

A primeira PCR, que amplifica um fragmento de 1500 pb do gene que codifica o RNAr 16S, foi positiva em quatro (3,2%) das 125 amostras avaliadas. Em três desses casos, a bactéria foi isolada em cultura. As duas PCR-aninhadas, com iniciadores específicos para amplificar o gene que codifica o RNAr 16S de *Helicobacter* gerando fragmentos de 1200 pb e 400 pb, foram positivas em 48 (38,5%) e 51 (40,8%) das 125 amostras, respectivamente FIG. 2.

A pesquisa de *ureA* por PCR aninhada confirmou o resultado das 51 PCR aninhadas positivas para a detecção do fragmento de 400 pb do gene que codifica o RNAr 16S FIG. 2. Esses resultados e as características clínicas dos pacientes estão descritas na TAB. 4.

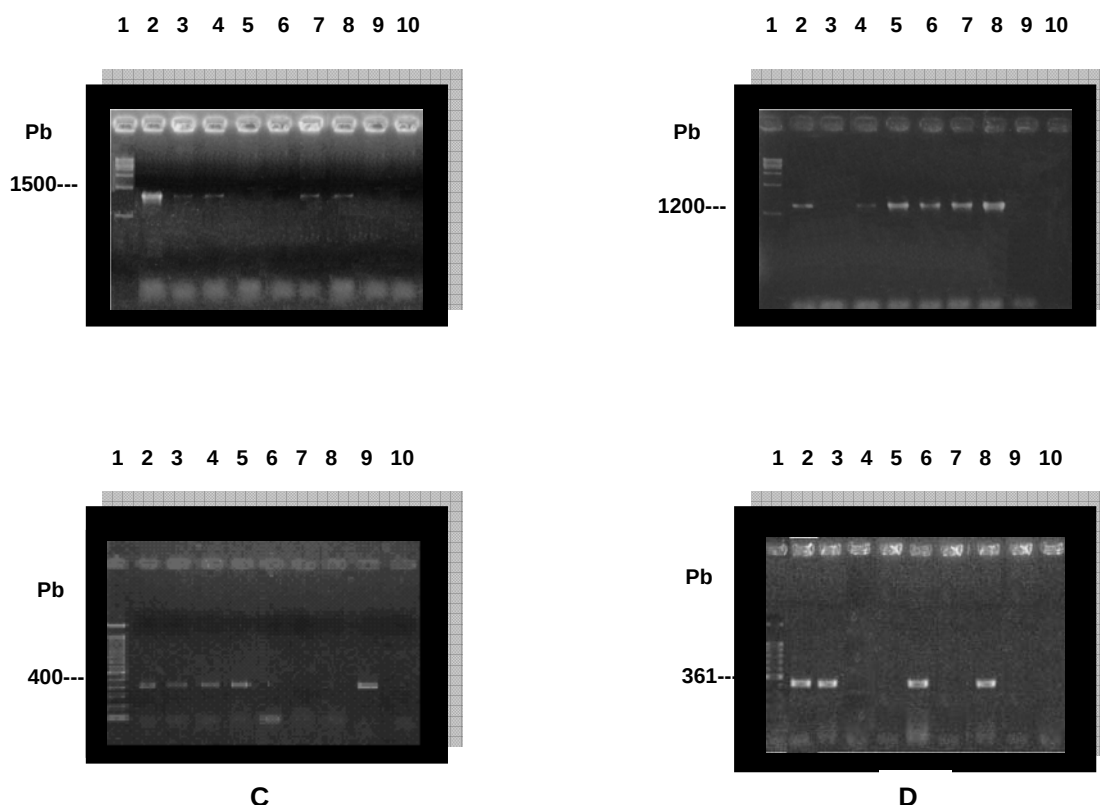


Figura 2. A. Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o RNAr 16S: canaleta 1, padrão de peso molecular (100 pb, Promega); canaleta 2, controle positivo (TX30), canaletas 3, 4, 7 e 8, amostras positivas (banda de 1500 pb); canaletas 5, 6 e 9, amostras negativas; canaleta 10, controle negativo interno (água destilada). B. Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o RNAr 16S: canaleta 1, padrão de peso molecular (100 pb, Promega); canaleta 2, controle positivo (TX30), canaletas 4, 5, 6, 7 e 8, amostras positivas (banda de 1200 pb); canaletas 3 e 9, amostras negativas; canaleta 10, controle negativo interno (água destilada). C. Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o RNAr 16S: canaleta 1, padrão de peso molecular (100 pb, Promega); canaleta 2, controle positivo (TX30), canaletas 3, 4, 5 e 9 amostras positivas (banda de 400 pb); canaletas 6, 7 e 8 amostras negativas; canaleta 10, controle negativo interno (água destilada). D. Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o *ureA*: canaleta 1, padrão de peso molecular (100 pb, Promega); canaleta 2, controle positivo (TX30), canaletas 3, 6 e 8, amostras positivas (banda de 361 pb); canaletas 4, 5, 7 e 9, amostras negativas; canaleta 10, controle negativo interno (água destilada).

4.2.4. Sequenciamento dos *amplicons* do gene que codifica o RNAr 16S

Foram seqüenciados os três *amplicons* de 1500 pb (referentes aos microrganismos isolados em cultura) e os 51 *amplicons* de 400 pb (referentes aos fragmentos de tecido hepático). A análise do sequenciamento mostrou em todas as amostras estudadas homologia com *H. pylori* igual ou superior a 99,0% (Anexo 3).

4.2.5. Imunohistoquímica para identificação de *H. pylori*

Microrganismos ligeiramente espiralados, semelhantes ao *H. pylori*, foram identificados por imunohistoquímica específica no parênquima hepático dos três pacientes, nos quais o microrganismo foi isolado em cultura, mas não em cinco amostras de tecido hepático, cujas PCRs foram negativas para DNA de *Helicobacter* spp. FIG. 3.

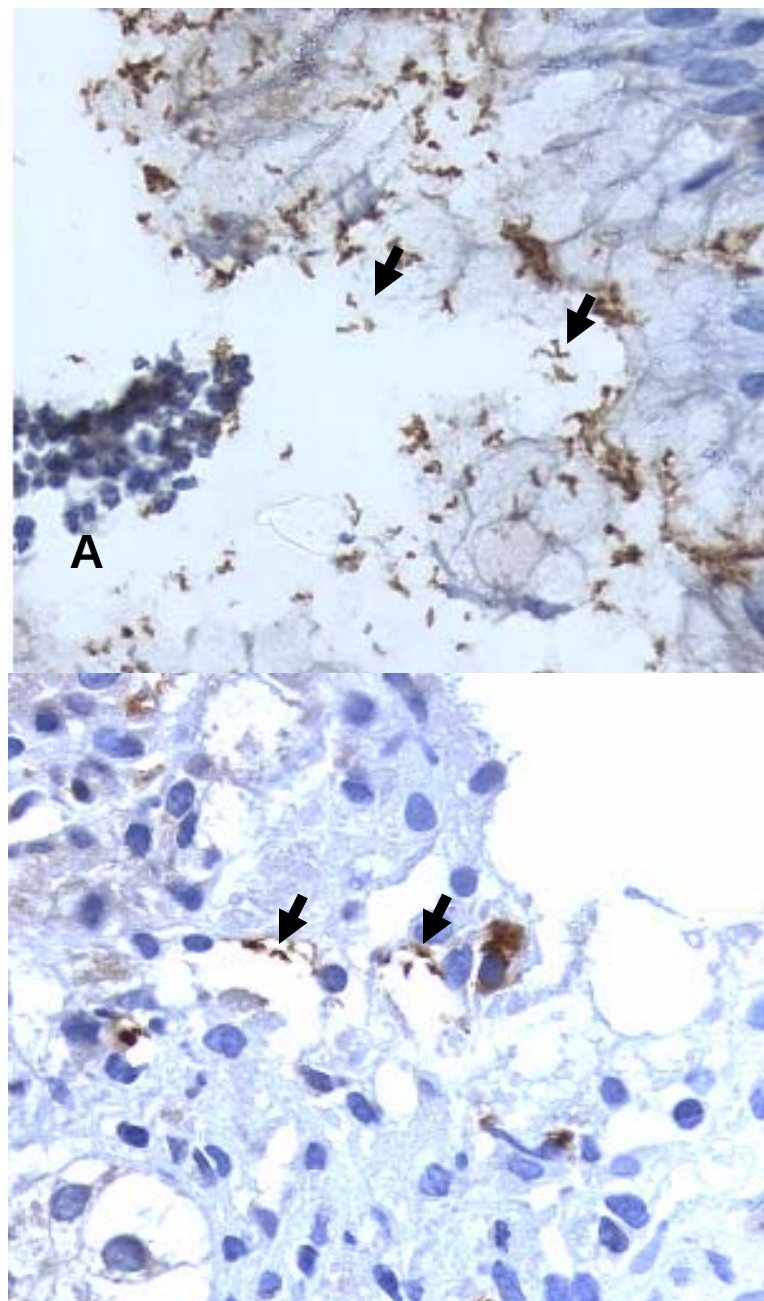


Figura 3. Imunohistoquímica para identificação de *H. pylori* em cortes histológicos de mucosa gástrica e fígado de um paciente do qual a bactéria foi isolada do fígado. Bactérias amarronzadas (setas) em fundo azul, espiraladas, aderidas ao muco superficial ou na luz faveolar da mucosa gástrica A e no parênquima hepático B.

4.3. Frequência dos marcadores sorológicos para a infecção pelo VHB

Marcadores sorológicos para a infecção pelo VHB foram detectados no soro de 18 pacientes. Dentre eles, em dez, o DNA da bactéria foi verificado no fígado.

4.4. Doença hepática primária ou metastática e presença de *H. pylori* no fígado

Dentre as lesões hepáticas incluídas na análise, somente a hepatite aguda foi selecionada na análise univariada e incluída na análise multivariada TAB. 7. Dados demográficos dos pacientes não foram selecionados, mas a presença de infecção gástrica também foi selecionada na análise univariada e incluída na análise multivariada TAB. 7.

Na análise multivariada, somente a infecção gástrica pelo microrganismo permaneceu significativa e independentemente associada à presença de *H. pylori* no tecido hepático TAB. 7. O modelo logístico estava adequadamente ajustado de acordo com o Teste de Hosmer-Lemeshow ($p=0,29$, df 8, 10 “steps”).

TABELA 7
Covariáveis associadas à presença de *H. pylori* no fígado dos pacientes submetidos à biópsia hepática (n=125)

Covariáveis	DNA de <i>H. pylori</i> no fígado			
	Análise univariada	Análise Multivariada		
	<i>p</i>	Razão de chance	Intervalo de confiança de 95%	<i>p</i>
Sexo	0,85	-	-	-
Idade	0,80	-	-	-
Hepatite aguda	0,18	2,14	0,66-6,84	0,20
Hepatite crônica	0,54	-	-	-
Cirrose	0,36	-	-	-
Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>	0,008	3,62	1,35-9,71	0,01

Posteriormente, escolheram-se as causas das alterações hepáticas como variáveis independentes, respeitando o critério de selecionar somente as doenças hepáticas com frequência ≥ 6 para permitir um ajustamento adequado do modelo. Na análise univariada, hepatopatia alcoólica, esteatohepatite não-alcoólica, infecção prévia ou atual pelo VHB, hepatopatia crônica pelo VHC, doença pancreática, neoplasia da vesícula biliar e infecção gástrica pelo *H. pylori* foram selecionadas e incluídas na análise multivariada. Sexo e idade não preencheram os critérios para a seleção TAB. 8.

TABELA 8

Covariáveis associadas à presença de *H. pylori* no fígado dos pacientes submetidos à biópsia hepática (n=125)

Covariáveis	DNA de <i>H. pylori</i> no fígado			
	Análise univariada	Análise Multivariada		
	<i>p</i>	Razão de chance	Intervalo de confiança de 95%	<i>p</i>
Sexo	0,85	-	-	-
Idade	0,80	-	-	-
Hepatopatia alcoólica	0,24	0,41	0,14-1,21	0,11
Esteatohepatite não-alcoólica	0,19	3,12	0,51-18,94	0,22
Infecção prévia ou atual pelo VHB	0,17	3,44	1,12-10,61	0,03
Hepatopatia crônica pelo VHC	0,20	3,10	0,64-14,85	0,16
Doenças do pâncreas	0,002	12,33	2,38-63,71	0,003
Neoplasia de vesícula biliar	0,22	0,43	0,05-4,08	0,46
Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>	0,008	3,65	1,23-10,91	0,02

VHB, vírus da hepatite B; VHC, vírus da hepatite C.

A presença de *H. pylori* no fígado permaneceu significativa e independentemente associada com infecção prévia ou atual pelo VHB, doença pancreática e infecção gástrica pelo *H. pylori* TAB. 8. O modelo logístico estava adequadamente ajustado ($p=0,47$, df 8, 10 “steps”).

4.5. Alterações histopatológicas no fígado dos pacientes dos quais isolou-se *H. pylori*

Várias alterações histopatológicas foram identificadas nos fragmentos de fígado dos três pacientes dos quais isolou-se *H. pylori*. Necrose periportal com infiltrado de linfócitos moderado no espaço porta e formação de agregados linfóides foram alterações observadas pela análise histopatológica do fragmento hepático da paciente com hepatite crônica em atividade pelo VHC FIG. 4. No fígado da paciente com doença de Wilson e hepatite fulminante secundária a medicamentos, verificou-se subversão da arquitetura lobular pela presença de septos fibrosos, hepatócitos com degeneração hidrópica acentuada e núcleos anisomórficos. Ainda, observou-se necrose hepática submaciça, presença global de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, neoformação de ductos biliares e colestase intracelular e intracanalicular FIG. 4. Por último, no fragmento de fígado do paciente com hepatite aguda por abuso de álcool, identificou-se arquitetura lobular preservada, hepatócitos com degeneração hidrópica moderada e necrose lobular discreta com presença de poucos linfócitos e neutrófilos FIG. 4.

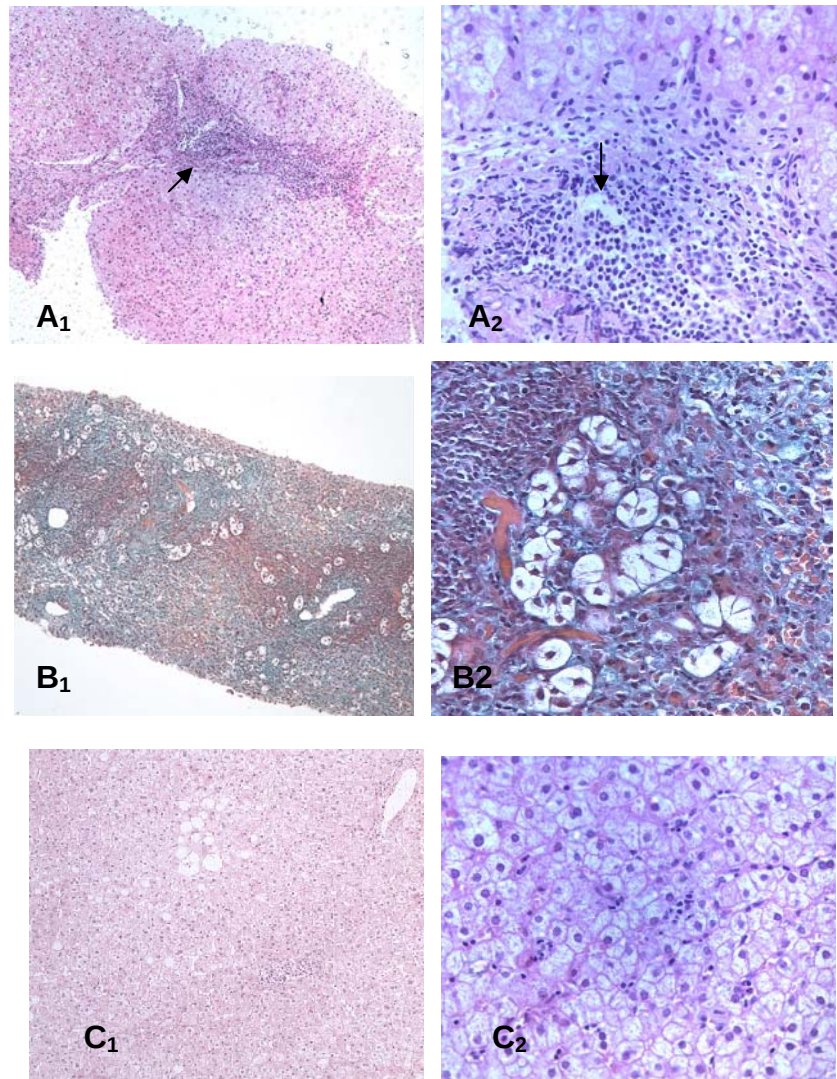


Figura 4. Cortes histológicos de fígado dos pacientes dos quais se isolou *H. pylori*. **A.** Presença de necrose periportal com infiltrado de linfócitos moderado no espaço porta e formação de agregados linfóides (seta) em fragmento hepático da paciente com hepatite crônica em atividade pelo VHC. **A₁**, HE 100X; **A₂**, HE 400X. **B.** Subversão da arquitetura lobular pela presença de septos fibrosos, hepatócitos com degeneração hidrópica acentuada e núcleos anisomórficos (setas), necrose hepática submaciça, presença global de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, neoformação de ductos biliares e colestase intracelular e intracanalicular em fragmento de fígado da paciente com doença de Wilson e hepatite fulminante secundária a medicamentos. **B₁**, Tricromo de Gomori (TG) 100X; **B₂**, TG 400X. **C.** Hepatócitos com degeneração hidrópica moderada e necrose lobular discreta com presença de poucos linfócitos e neutrófilos (seta) em fragmento de fígado do paciente com hepatite aguda por álcool. **C₁**, HE 100X; **C₂**, HE 400X.

4.6. Alterações histopatológicas no fígado dos pacientes dos quais detectou-se DNA de *H. pylori*

Nos espécimes hepáticos, disponíveis em 117 pacientes (média do número de tratos portais $15,4 \pm 8,1$), foi avaliada a presença de necrose e fibrose. Não foram observadas associações estatisticamente significativas entre essas alterações e a presença de *H. pylori* no fígado TAB. 9.

TABELA 9
Presença de necrose e fibrose nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)*

Dados histológicos	DNA de <i>H. pylori</i> no fígado		<i>p</i>
	Positivo (n=50) n (%)	Negativo (n=67) n (%)	
Necrose periportal	21 (42,0)	27 (40,3)	0,88
Necrose médio-zonal	29 (58,0)	36 (53,7)	0,65
Necrose perivenular	06 (12,0)	10 (15,0)	0,64
Necrose global	32 (64,0)	39 (58,2)	0,53
Fibrose global	19 (38,0)	25 (37,3)	0,94

*análise univariada; n, número de indivíduos.

Quando células inflamatórias nas diversas localizações foram avaliadas como covariáveis, tendência de associação com a presença de DNA de *H. pylori* foi vista com infiltrado global de linfócitos e infiltrado de linfócitos na região médio-zonal do lóbulo hepático TAB. 10.

TABELA 10
Avaliação da presença e do tipo de infiltrado inflamatório nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)*

Infiltrado inflamatório		DNA de <i>H. pylori</i> no fígado		<i>p</i>
		Positivos (n=50) n (%)	Negativos (n=67) n (%)	
Portal				
	Neutrófilo	21 (42,0)	29 (43,3)	0,89
	Linfócito	26 (52,0)	38 (56,7)	0,61
	Histiócito	23 (46,0)	37 (55,2)	0,32
Periportal				
	Neutrófilo	20 (40,0)	26 (38,8)	0,90
	Linfócito	22 (44,0)	30 (44,8)	0,93
	Histiócito	17 (34,0)	29 (43,3)	0,31
Médio-zonal				
	Neutrófilo	22 (44,0)	27 (40,3)	0,69
	Linfócito	30 (60,0)	33 (49,3)	0,25
	Histiócito	26 (52,0)	32 (47,8)	0,65
Perivenular				
	Neutrófilo	4 (8,0)	10 (14,9)	0,39
	Linfócito	5 (10,0)	9 (13,4)	0,57
	Histiócito	4 (8,0)	9 (13,4)	0,40
Global				
	Neutrófilo	32 (64,0)	39 (58,2)	0,53
	Linfócito	39 (78,0)	45 (67,2)	0,19
	Histiócito	34 (68,0)	43 (64,2)	0,67

*análise univariada; n, número de indivíduos.

Então, essas variáveis foram consideradas variáveis dependentes em modelos logísticos incluindo outras causas que levariam ao aumento de células inflamatórias, além da presença de DNA de *H. pylori* no fígado. Inicialmente, na

análise de co-fatores associados à presença global de linfócitos, as variáveis, hepatite alcoólica e presença de DNA de *H. pylori* no fígado foram selecionadas na análise univariada e incluídas na análise multivariada TAB. 11.

TABELA 11
Covariáveis associadas à presença global de linfócitos nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)

Covariáveis	Presença global de linfócitos			
	Análise univariada	Análise Multivariada		
	<i>p</i>	Razão de chance	Intervalo de confiança de 95%	<i>p</i>
Sexo	0,31	-	-	-
Idade	0,90	-	-	-
Hepatopatia alcoólica	0,01	6,59	1,44-30,21	0,02
Doença hepática auto-imune [#]	0,40	-	-	-
Esteatohepatite não-alcoólica	0,77	-	-	-
Hepatopatia crônica pelo VHC	0,30	-	-	-
Hepatopatia por medicamentos	0,44	-	-	-
DNA de <i>H. pylori</i> no fígado	0,20	2,04	0,86-4,86	0,11

VHC, vírus da hepatite C; [#]hepatite auto-imune mais síndrome de sobreposição.

Dentre essas variáveis, somente hepatopatia alcoólica permaneceu significativa e independentemente associada com a presença de linfócitos em qualquer localização nos fragmentos hepáticos TAB. 11. O modelo logístico estava adequadamente ajustado ($p=0,45$, df 8, 10 “steps”).

Posteriormente, na análise de co-fatores associados à presença de linfócitos na região médio-zonal do lóbulo hepático, as variáveis, sexo, hepatite

alcoólica, hepatopatia crônica pelo VHC, hepatopatia por medicamentos e presença de DNA de *H. pylori* no fígado foram selecionadas na análise univariada e incluídas na análise multivariada TAB. 12.

TABELA 12
Covariáveis associadas à presença de linfócitos na região médio-zonal do lóbulo hepático nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)

Covariáveis	Presença de linfócitos na região médio-zonal			
	Análise univariada	Análise Multivariada		
	<i>p</i>	Razão de chance	Intervalo de confiança de 95%	<i>p</i>
Sexo	0,18	0,78	0,33-1,85	0,58
Idade	0,38	-	-	-
Hepatopatia alcoólica	0,04	3,67	1,24-10,90	0,02
Doença hepática auto-imune [#]	0,34	-	-	-
Esteatohepatite não-alcóolica	0,85	-	-	-
Hepatopatia crônica pelo VHC	0,05	10,04	1,16-86,53	0,04
Hepatopatia por medicamentos	0,05	6,61	1,32-33,11	0,02
DNA de <i>H. pylori</i> no fígado	0,25	1,54	0,69-3,46	0,30

VHC, vírus da hepatite C; [#]hepatite auto-imune mais síndrome de sobreposição.

As variáveis que permaneceram significativa e independentemente associadas com a presença de linfócitos na região médio-zonal do lóbulo hepático foram: hepatopatia alcoólica, hepatopatia crônica pelo VHC e hepatopatia por medicamentos TAB. 12. O modelo logístico estava adequadamente ajustado ($p=0,66$, df 8, 10 “steps”).

4.7. Alterações histopatológicas no fígado de pacientes com infecção gástrica pelo *H. pylori*

Analisando os dados com o mesmo critério adotado no item 4.6, foram observadas: associação ($p < 0,05$) ou tendência de associação ($p < 0,25$) entre infecção gástrica e necrose periportal, necrose médio-zonal do lóbulo hepático, necrose global e fibrose global TAB. 13.

TABELA 13

Avaliação de necrose e fibrose nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)*

Dados histológicos	Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>		<i>P</i>
	Positivos (n=88) n (%)	Negativos (n=29) n (%)	
Necrose periportal	39 (44,3)	9 (31,0)	0,20
Necrose médio-zonal	55 (62,5)	10 (34,5)	0,008
Necrose perivenular	13 (14,8)	3 (10,4)	0,76
Necrose global	60 (68,2)	11 (37,9)	0,004
Fibrose global	36 (40,9)	8 (27,6)	0,19

*análise univariada; n, número de indivíduos.

Essas variáveis foram consideradas, individualmente como variáveis dependentes e analisadas em modelos logísticos que incluíam também outras causas possíveis de necrose e fibrose hepática, além da infecção gástrica pelo *H. pylori*.

Inicialmente, foram analisados os co-fatores associados à necrose global. As variáveis, hepatite alcoólica, doença hepática auto-imune, hepatopatia crônica pelo VHC, hepatopatia por medicamentos e infecção gástrica pelo *H. pylori* foram selecionadas na análise univariada e mantiveram-se associadas na análise multivariada TAB. 14. O modelo logístico estava adequadamente ajustado ($p=0,66$, df 8, 10 “steps”).

TABELA 14
Covariáveis associadas à presença global de necrose nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)

Covariáveis	Presença global de necrose			
	Análise univariada	Análise Multivariada		
	<i>p</i>	Razão de chance	Intervalo de confiança de 95%	<i>p</i>
Sexo	0,60	-	-	-
Idade	0,81	-	-	-
Hepatopatia alcoólica	0,002	8,89	2,36-33,52	0,001
Doença hepática auto-imune [#]	0,16	15,69	1,56-157,27	0,02
Esteatohepatite não-alcoólica	0,76	-	-	-
Hepatopatia crônica pelo VHC	0,11	9,26	1,03-83,60	0,05
Hepatopatia por medicamentos	0,13	7,54	1,39-40,77	0,02
Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>	0,004	3,92	1,36-11,30	0,01

VHC, vírus da hepatite C; [#]hepatite auto-imune mais síndrome de sobreposição.

Posteriormente, na análise de co-fatores associados à necrose na região médio-zonal do lóbulo hepático, as variáveis, sexo, hepatite alcoólica, hepatopatia crônica pelo VHC, hepatopatia por medicamentos e infecção

gástrica pelo *H. pylori* foram selecionadas na análise univariada e incluídas na análise multivariada TAB. 15.

TABELA 15
Covariáveis associadas à presença de necrose na região médio-zonal do lóbulo hepático nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)

Covariáveis	Presença de necrose na região médio-zonal			
	Análise univariada	Análise Multivariada		
	<i>p</i>	Razão de chance	Intervalo de confiança de 95%	<i>p</i>
Sexo	0,19	0,87	0,36-2,10	0,76
Idade	0,59	-	-	-
Hepatopatia alcoólica	0,006	4,76	1,45-15,60	0,01
Doença hepática auto-imune [#]	0,38	-	-	-
Esteatohepatite não-alcoólica	0,57	-	-	-
Hepatopatia crônica pelo VHC	0,06	9,46	1,10-82,17	0,04
Hepatopatia por medicamentos	0,07	7,11	1,38-36,47	0,02
Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>	0,008	2,54	0,97-6,66	0,06

VHC, vírus da hepatite C; [#]hepatite auto-imune mais síndrome de sobreposição

As variáveis que permaneceram significativa e independentemente associadas com necrose na região médio-zonal do lóbulo hepático foram: hepatopatia alcoólica, hepatopatia crônica pelo VHC e hepatite por medicamentos TAB. 15. Entretanto, o modelo logístico não estava adequadamente ajustado ($p=0,08$, df 8, 10 “steps”).

Ainda, co-fatores associados à necrose na região periportal nos fragmentos hepáticos foram analisados. As variáveis, hepatite alcoólica,

doença hepática auto-imune, hepatopatia crônica pelo VHC e infecção gástrica pelo *H. pylori* foram selecionadas na análise univariada e incluídas na análise multivariada TAB. 16.

TABELA 16
Covariáveis associadas à presença de necrose na região periportal nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)

Covariáveis	Presença de necrose na região periportal			
	Análise univariada	Análise Multivariada		
	<i>p</i>	Razão de chance	Intervalo de confiança de 95%	<i>p</i>
Sexo	0,33	-	-	-
Idade	0,90	-	-	-
Hepatopatia alcoólica	0,03	3,66	1,40-9,55	0,008
Doença hepática auto-imune [#]	0,09	7,90	1,34-46,36	0,02
Esteatohepatite não-alcoólica	0,65	-	-	-
Hepatopatia crônica pelo VHC	0,006	17,60	2,03-152,40	0,009
Hepatopatia por medicamentos	0,34	-	-	-
Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>	0,21	1,65	0,59-4,61	0,34

VHC, vírus da hepatite C; [#]hepatite auto-imune mais síndrome de sobreposição

As variáveis que permaneceram significativa e independentemente associadas com necrose da região periportal nos fragmentos hepáticos foram: hepatopatia alcoólica, doença hepática auto-imune e hepatopatia crônica pelo VHC TAB. 16. O modelo logístico estava adequadamente ajustado ($p=0,87$, df 8, 10 “steps”).

Em relação à presença global de fibrose, as variáveis, idade, hepatite alcoólica, hepatopatia crônica pelo VHC e infecção gástrica pelo *H. pylori* foram selecionadas na análise univariada TAB. 17.

TABELA 17
Covariáveis associadas à presença global de fibrose nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)

Covariáveis	Presença global de fibrose			
	Análise univariada	Análise Multivariada		
	<i>p</i>	Razão de chance	Intervalo de confiança de 95%	<i>p</i>
Sexo	0,36	-	-	-
Idade	0,16	0,83	0,34-2,02	0,67
Hepatopatia alcoólica	0,03	3,47	1,22-9,87	0,02
Doença hepática auto-imune [#]	0,27	-	-	-
Esteatohepatite não-alcoólica	0,82	-	-	-
Hepatopatia crônica pelo VHC	0,007	15,58	1,77-137,2	0,013
Hepatopatia por medicamentos	0,57	-	-	-
Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>	0,19	1,32	0,49-3,55	0,58

VHC, vírus da hepatite C; [#]hepatite auto-imune mais síndrome de sobreposição

As variáveis que permaneceram significativa e independentemente associadas à presença global de fibrose nos fragmentos hepáticos foram: hepatopatia alcoólica e hepatopatia crônica pelo VHC TAB. 17. O modelo logístico estava adequadamente ajustado ($p=0,89$, df 8, 10 “steps”).

Quando as células inflamatórias nas diversas localizações foram avaliadas como covariáveis, associação ($p<0,05$) ou tendência de associação

($p < 0,25$) foi vista entre infecção gástrica pelo *H. pylori* e infiltrado inflamatório (neutrófilos, linfócitos ou histiócitos) global e na região médio-zonal nos fragmentos hepáticos, respectivamente TAB. 18.

Então, essas variáveis foram consideradas variáveis dependentes em modelos logísticos incluindo outras causas que levariam ao aumento de células inflamatórias, além da presença de *H. pylori* no estômago.

Inicialmente, na análise de co-fatores associados à presença global de neutrófilos as variáveis, hepatite alcoólica, doença hepática auto-imune, hepatopatia crônica pelo VHC e infecção gástrica pelo *H. pylori* foram selecionadas na análise univariada e incluídas na análise multivariada TAB. 19.

Dentre essas variáveis, somente hepatopatia alcoólica permaneceu significativa e independentemente associada com a presença de neutrófilos em qualquer localização nos fragmentos hepáticos. O modelo logístico estava adequadamente ajustado de ($p = 0,83$, df 8, 10 “steps”) TAB. 19.

TABELA 18

Avaliação da presença e do tipo de infiltrado inflamatório nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)*

Infiltrado inflamatório		Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>		<i>p</i>
		Positivos (n=88) n (%)	Negativos (n=29) n (%)	
Portal				
	Neutrófilo	38 (43,2)	12 (41,4)	0,86
	Linfócito	50 (56,8)	14 (48,3)	0,42
	Histiócito	47 (53,4)	13 (44,8)	0,42
Periportal				
	Neutrófilo	37 (42,0)	9 (31,0)	0,29
	Linfócito	41 (46,6)	11 (37,9)	0,42
	Histiócito	34 (38,6)	11 (37,9)	0,95
Médio-zonal				
	Neutrófilo	43 (48,9)	6 (20,7)	0,006
	Linfócito	52 (59,1)	11(37,9)	0,047
	Histiócito	47 (53,4)	11 (37,9)	0,15
Perivenular				
	Neutrófilo	11 (12,5)	3 (10,3)	1,0
	Linfócito	11 (12,5)	3 (10,3)	1,0
	Histiócito	11 (12,5)	2 (6,9)	0,51
Geral				
	Neutrófilo	58 (65,9)	13 (44,8)	0,046
	Linfócito	69 (78,4)	15 (51,7)	0,007
	Histiócito	62 (70,5)	15 (51,7)	0,07

*análise univarada; n, número de indivíduos.

TABELA 19
Covariáveis associadas à presença global de neutrófilos nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)

Covariáveis	Presença global de neutrófilos			
	Análise univariada	Análise Multivariada		
	<i>p</i>	Razão de chance	Intervalo de confiança de 95%	<i>P</i>
Sexo	0,27	-	-	-
Idade	0,60	-	-	-
Hepatopatia alcoólica	0,03	3,53	1,18-10,54	0,02
Doença hepática auto-imune [#]	0,16	8,34	0,90-76,98	0,06
Esteatohepatite não-alcoólica	0,76	-	-	-
Hepatopatia crônica pelo VHC	0,11	6,50	0,75-56,19	0,09
Hepatopatia por medicamentos	0,83	-	-	-
Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>	0,05	2,31	0,90-5,90	0,08

VHC, vírus da hepatite C; [#]hepatite auto-imune mais síndrome de sobreposição

Posteriormente, na análise de co-fatores associados à presença de neutrófilos na região médio-zonal do lóbulo hepático, as variáveis, hepatite alcoólica, esteato-hepatite não-alcoólica, hepatopatia por medicamentos e infecção gástrica pelo *H. pylori*, foram selecionadas na análise univariada e incluídas na análise multivariada TAB. 20.

TABELA 20
Covariáveis associadas à presença de neutrófilos na região médio-zonal
do lóbulo hepático nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados
(n=117)

Covariáveis	Presença de neutrófilos na região médio-zonal			
	Análise univariada	Análise Multivariada		
		Razão de chance	Intervalo de confiança de 95%	<i>p</i>
Sexo	0,26	-	-	-
Idade	0,36	-	-	-
Hepatopatia alcoólica	0,01	3,53	1,32-9,37	0,01
Doença hepática auto-imune [#]	0,96	-	-	-
Esteatohepatite não-alcoólica	0,21	3,61	0,61-21,58	0,16
Hepatopatia crônica pelo VHC	0,80	-	-	-
Hepatopatia por medicamentos	0,12	4,33	1,10-16,97	0,04
Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>	0,008	2,90	1,02-8,30	0,05

VHC, vírus da hepatite C; [#]hepatite auto-imune e síndrome de sobreposição

As variáveis que permaneceram significativa e independentemente associadas com a presença de neutrófilos na região médio-zonal do lóbulo hepático foram: hepatopatia alcoólica, hepatite por medicamentos e infecção gástrica pelo *H. pylori*. O modelo logístico estava adequadamente ajustado ($p=0,80$, df 8, 10 “steps”) TAB. 20.

A presença global de linfócitos e infiltrado de linfócitos na região médio-zonal do lóbulo hepático também foram considerados individualmente como variáveis dependentes. Na análise de co-fatores associados à presença global

de linfócitos as variáveis, hepatopatia alcoólica e infecção gástrica pelo *H. pylori* foram selecionadas na análise univariada e mantiveram-se associadas na análise multivariada TAB. 21. O modelo logístico estava adequadamente ajustado ($p=0,47$, df 8, 10 “steps”) TAB. 21.

TABELA 21
Covariáveis associadas à presença global de linfócitos nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)

Covariáveis	Presença global de linfócitos			
	Análise univariada	Análise Multivariada		
	<i>p</i>	Razão de chance	Intervalo de confiança de 95%	<i>p</i>
Sexo	0,31	-	-	-
Idade	0,90	-	-	-
Hepatopatia alcoólica	0,01	4,73	1,03-21,81	0,05
Doença hepática auto-imune [#]	0,40	-	-	-
Esteatohepatite não-alcoólica	0,77	-	-	-
Hepatopatia crônica pelo VHC	0,31	-	-	-
Hepatopatia por medicamentos	0,44	-	-	-
Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>	0,006	2,80	1,13-6,96	0,03

VHC, vírus da hepatite C; [#]hepatite auto-imune mais síndrome de sobreposição

Em relação à presença de linfócitos na região médio-zonal do lóbulo hepático, as variáveis, sexo, hepatopatia alcoólica, hepatopatia crônica pelo VHC, hepatopatia por medicamentos e infecção gástrica pelo *H. pylori* foram

selecionadas na análise univariada e incluídas na análise multivariada TAB. 22.

TABELA 22
Covariáveis associadas à presença de linfócitos na região médio-zonal do
lóbulo hepático nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados
(n=117)

Covariáveis	Presença de linfócitos na região médio-zonal			
	Análise univariada	Análise Multivariada		
	<i>p</i>	Razão de chance	Intervalo de confiança de 95%	<i>p</i>
Sexo	0,18	0,75	0,32-1,78	0,52
Idade	0,38	-	-	-
Hepatopatia alcoólica	0,04	2,96	0,99-8,84	0,05
Doença hepática auto-imune [#]	0,34	-	-	-
Esteatohepatite não-alcóolica	0,85	-	-	-
Hepatopatia crônica pelo VHC	0,05	9,76	1,13-84,18	0,04
Hepatopatia por medicamentos	0,05	6,93	1,37-35,02	0,02
Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>	0,05	1,93	0,75-4,93	0,17

VHC, vírus da hepatite C; [#]hepatite auto-imune mais síndrome de sobreposição

As variáveis que permaneceram significativa e independentemente associadas à presença de linfócitos na região médio-zonal do lóbulo hepático foram: hepatopatia crônica pelo VHC e hepatopatia por medicamentos. O modelo logístico estava adequadamente ajustado ($p=0,65$, df 8, 10 “steps”) TAB. 22.

Por último, foram analisados como variáveis dependentes: presença global de histiócitos e infiltrado de histiócitos na região médio-zonal do lóbulo hepático. Na análise dos co-fatores associados à presença global de histiócitos as variáveis, hepatite alcoólica, doença hepática auto-imune, hepatopatia crônica pelo VHC, hepatopatia por medicamentos e infecção gástrica pelo *H. pylori* foram selecionadas na análise univariada e incluídas na análise multivariada TAB. 23.

TABELA 23
Covariáveis associadas à presença global de histiócitos nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)

Covariáveis	Presença global de histiócitos			
	Análise univariada	Análise Multivariada		
	<i>p</i>	Razão de chance	Intervalo de confiança de 95%	<i>p</i>
Sexo	0,39	-	-	-
Idade	0,47	-	-	-
Hepatopatia alcoólica	0,008	6,44	1,73-23,93	0,005
Doença hepática auto-imune [#]	0,25	7,69	0,84-71,01	0,07
Esteatohepatite não-alcoólica	0,96	-	-	-
Hepatopatia crônica pelo VHC	0,18	6,39	0,74-55,52	0,09
Hepatopatia por medicamentos	0,24	4,61	0,90-23,37	0,07
Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>	0,07	2,04	0,78-5,31	0,15

VHC, vírus da hepatite C; [#]hepatite auto-imune mais síndrome de sobreposição

Dentre essas variáveis, somente hepatopatia alcoólica permaneceu significativa e independentemente associada à presença de histiócitos em qualquer localização nos fragmentos hepáticos. O modelo logístico estava adequadamente ajustado ($p=0,86$, df 8, 10 “steps”) TAB. 23.

Em relação à presença de histiócitos na região médio-zonal do lóbulo hepático, as variáveis, sexo, idade, hepatopatia alcoólica, doença hepática auto-imune, hepatopatia por medicamentos e infecção gástrica pelo *H. pylori* foram selecionadas na análise univariada e incluídas na análise multivariada TAB. 24.

TABELA 24
Covariáveis associadas à presença de histiócitos na região médio-zonal do lóbulo hepático nos fragmentos de fígado dos pacientes estudados (n=117)

Covariáveis	Presença de histiócitos na região médio-zonal			
	Análise univariada	Análise Multivariada		
	<i>p</i>	Razão de chance	Intervalo de confiança de 95%	<i>p</i>
Sexo	0,23	0,98	0,96-1,01	0,27
Idade	0,06	0,75	0,31-1,79	0,51
Hepatopatia alcoólica	0,04	2,77	0,96-8,00	0,06
Doença hepática auto-imune [#]	0,23	5,39	0,86-33,62	0,07
Esteatohepatite não-alcoólica	0,98	-	-	-
Hepatopatia crônica pelo VHC	0,45	-	-	-
Hepatopatia por medicamentos	0,03	7,17	1,39-37,08	0,02
Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i>	0,15	2,05	0,77-5,46	0,15

VHC, vírus da hepatite C; [#]hepatite auto-imune mais síndrome de sobreposição

Dentre essas variáveis, somente hepatopatia por medicamentos permaneceu significativa e independentemente associada à presença de histiócitos na região médio-zonal do lóbulo hepático. O modelo logístico estava adequadamente ajustado ($p=0,45$, df 8, 10 “steps”) TAB. 24.

5.0. DISCUSSÃO

5.1. Isolamento em cultura de amostras de *Helicobacter* spp. do fígado dos pacientes estudados

A camada mucosa do trato gastrointestinal de animais e de seres humanos é o habitat permanente ou temporário de um grande número de bactérias espiraladas, móveis, Gram-negativas e microaerófilas. Várias espécies de *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Wolinella* e *Arcobacter* já foram descritas e muitas outras têm sido identificadas. Diversos estudos têm demonstrado que essas bactérias colonizam a camada mucosa do trato gastrintestinal formando nicho específico. Entretanto, em determinadas situações, dependentes da relação entre hospedeiro e microrganismo, os limites dessa colonização podem ser ultrapassados (BLASER, 1998).

Além do *H. pylori*, outras espécies do gênero têm sido identificadas nas vias biliares e fígado de seres humanos e animais. A pesquisa de bactérias do gênero *Helicobacter* no fígado de seres humanos foi motivada por analogia ao observado em animais onde microrganismos do gênero associam-se a doenças hepáticas (FOX *et al.*, 1994; WARD *et al.*, 1994a; WARD *et al.*, 1994b; FOX *et al.*, 2001; FOX *et al.*, 2002b) e por resultados de estudos

epidemiológicos que demonstraram associação entre a presença de anticorpos anti-*H. pylori* e doenças hepáticas crônicas em seres humanos (WU *et al.*, 1995; SIRINGO *et al.*, 1997; FAN *et al.*, 1998; PONZETTO *et al.*, 2000; PELLICANO *et al.*, 2000; DURAZZO *et al.*, 2002; PONZETTO *et al.*, 2003; DURAZZO *et al.*, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2006).

Nesse estudo, o primeiro no assunto com desenho prospectivo, isolaram-se, em cultura e detectou-se por PCR, amostras e DNA de *H. pylori* em fragmentos de fígado de três (2,4%) e 51 (40,8%) pacientes, respectivamente. Pela primeira vez, amostras de bactérias do gênero *Helicobacter* foram isoladas em cultura a partir de fragmentos de fígado de seres humanos. Dentre os fatores que contribuíram para o isolamento do microrganismo, a semeadura de tecido recentemente colhido e a sensibilidade elevada da técnica de cultura adotada no Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia (QUEIROZ *et al.*, 1987) devem ser destacados. Quando comparada a outros métodos diagnósticos, a cultura apresenta sensibilidade que varia de 82,0 a 98,0% (VANZWET *et al.*, 1993; THIJS *et al.*, 1996; ANDERSEN *et al.*, 1998; LERANG *et al.*, 1998) dependendo da experiência do serviço. Alguns estudos têm demonstrado que a capacidade de detecção do *H. pylori* pela cultura pode ser comparada à da PCR (VALENTINE *et al.*, 1991; VANZWET *et al.*, 1993; FABRE *et al.*, 1994).

O isolamento de amostras de *H. pylori* do fígado de três pacientes confirma a hipótese de que o microrganismo pode se manter viável no fígado humano, a despeito do fato de que o *H. pylori* é sensível *in vitro* aos ácidos biliares primários, desoxicólico e quenodesoxicólico, presentes na bile do

homem (MATHAI *et al.*, 1991; HANNINEN, 1995; ITOH *et al.*, 1999; WORKU *et al.*, 2004), que exercem efeitos inibitórios no crescimento e alteram a capacidade de aderência da bactéria (TOMPKINS & WEST, 1987; MATHAI *et al.*, 1991). Assim, os resultados desse estudo sugerem que a bactéria pode desenvolver mecanismos adaptativos que a protegem do pH alcalino e dos ácidos biliares da bile, sobrevivendo nesse nicho. Vários estudos têm demonstrado que formas viáveis da bactéria podem ser encontradas nas fezes, reforçando, assim, a possibilidade de sobrevivência em meio aos ácidos biliares (THOMAS *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2004) e não há evidências de que a taxa de colonização gástrica pelo *H. pylori* é menor em condições fisiológicas ou patológicas de refluxo de bile (NIEMELA *et al.*, 1989; KELLOSALO *et al.*, 1991).

Por outro lado, modificação do pH e de constituintes da bile tem sido identificada em determinadas situações clínicas que poderiam permitir a viabilidade de *H. pylori* no fígado de pacientes com doenças hepatobiliares (SHODA *et al.*, 1993; REYNOLDS *et al.*, 1995; VENKATARAMANI *et al.*, 1998). O microrganismo pode atingir o fígado migrando através do duodeno e do colédoco ou pela circulação enterohepática. Tanto bactérias viáveis, por translocação, ou DNA de bactérias, fagocitadas por macrófagos intestinais, poderiam alcançar o fígado pela circulação portal FIG. 5. Recentemente, foi demonstrado em modelo animal que *H. pylori* inoculado em camundongo C57BL6 pode atingir o fígado pelas duas vias sugeridas (TIAN *et al.*, 2005).

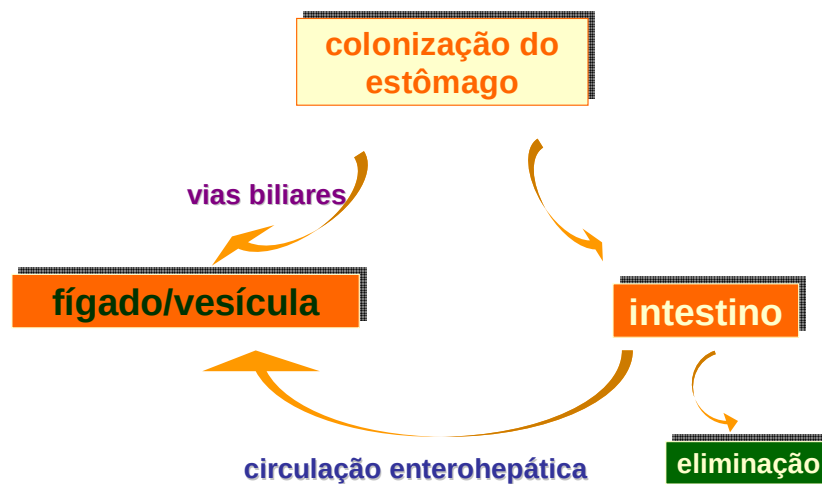


Figura 5. Possíveis vias de acesso ao fígado de amostras gástricas de *H. pylori*.

Nesse estudo, em um dos três casos nos quais a bactéria foi isolada do fígado, a paciente apresentava hepatite fulminante, sobreposta à hepatopatia crônica, com sinais de necrose hepatocelular acentuada à histologia. A hepatite aguda fulminante é considerada uma síndrome clínica grave, com evolução rápida, ocasionando insuficiência hepatocelular, traduzida por hipoglicemia, falência de múltiplos órgãos, coagulopatia e distúrbios do sistema nervoso central (BERNUAU & DURAND, 1997). Geralmente, 45,0 a 80,0% dos pacientes com insuficiência hepática fulminante evoluem com infecções bacterianas e fúngicas graves, pois, nesses casos, verificam-se menor capacidade funcional do sistema retículo endotelial, deficiência do sistema de complemento e de opsonização e diminuição da atividade quimioatratante, da capacidade de aderência de neutrófilos e de fagocitose (ALTIN *et al.*, 1982;

ALTIN *et al.*, 1983; IMAWARI *et al.*, 1985; MAS & RODES; 1997). Assim, é possível que a hepatite fulminante seja uma situação clínica que favoreça a colonização hepática por amostras de *H. pylori* em quantidade suficiente ($\geq 10^3$ unidades formadoras de colônia) para permitir o isolamento da bactéria em cultura.

O microrganismo foi, ainda, isolado do fragmento hepático de um paciente com hepatite alcoólica aguda e outro com hepatite crônica pelo VHC. Embora não haja aparentemente uma explicação para justificar o isolamento do microrganismo nessas condições de etiologias tão diversas, vale ressaltar que DNA de *Helicobacter* tem sido consistentemente identificado no fígado de pacientes com complicações secundárias à infecção pelo VHC.

5.2. Detecção de DNA de *Helicobacter* spp. no fígado dos pacientes estudados

Recentemente, vários grupos de pesquisadores de diferentes regiões do mundo como Europa, Ásia, EUA e Brasil demonstraram DNA de *Helicobacter* spp. na bile, epitélio das vias biliares e fígado de seres humanos com colelitíase, colecistite, colangiocarcinoma, doenças colestáticas crônicas (CEP e CBP), cirrose associada ao VHC e hepatocarcinoma com frequência variando entre 3,5 a 100% (LIN *et al.*, 1995; KAWAGUCHI *et al.*, 1996, FOX *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2003; FOX *et al.*, 1998a; NILSSON *et al.*, 2000; AVENAUD *et al.*, 2000; NILSSON *et al.*, 2001; FAN *et al.*, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2001; DORE *et*

al., 2002; BULAJIC *et al.*, 2002; FUKUDA *et al.*, 2002; MATSUKURA *et al.*, 2002; VERHOEF *et al.*, 2003; PELLICANO *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2005; BOOMKENS *et al.*, 2005; XUAN *et al.*, 2005; STALKE *et al.*, 2005).

Resultados diferentes foram relatados por COPPOLA *et al.* (2002), que na Itália, não identificaram DNA de *Helicobacter* spp. no fígado de seres humanos. Provavelmente, esse resultado deve-se à menor sensibilidade do método usado. No presente estudo, usou-se PCR-aninhada que detecta quantidades mínimas de DNA (LIN *et al.*, 1995). A reação com iniciadores e condições adotadas é capaz de detectar um fragmento de DNA de *Helicobacter* que equivale a 10^{-3} fg (WANG *et al.*, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2004). Entretanto, nesse tipo de reação, há maior risco de contaminações, com conseqüentes resultados falso-positivos. No estudo, todas as etapas das reações foram controladas e em todas as ocasiões, os controles negativos foram sempre negativos. Ainda, a presença de DNA de *Helicobacter* spp. foi avaliada, com a mesma técnica, no soro dos pacientes e em todos os casos o resultado foi negativo (dados não apresentados). Em conjunto, esses resultados minimizam a possibilidade de resultados falso-positivos.

No presente estudo, DNA de *H. pylori* foi demonstrado em fragmentos hepáticos de 51 pacientes (40,8%) com doenças hepáticas primárias ou metastáticas. À semelhança do observado na maioria dos trabalhos conduzidos anteriormente, os produtos amplificados de DNA de *Helicobacter* nesse estudo foram identificados por sequenciamento como *H. pylori* (AVENAUD *et al.*, 2000; NILSSON *et al.*, 2001; FAN *et al.*, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2001; VERHOEF *et*

al., 2003; PELLICANO *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2005; BOOMKENS *et al.*, 2005; XUAN *et al.*, 2005; STALKE *et al.*, 2005). Em menor proporção, DNA de *H. bilis*, *H. pullorum*, *H. canis* e *H. ganmani* também tem sido verificado em outros estudos (TOLIA *et al.*, 2004; PELLICANO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2005).

Vale ressaltar que a maior parte dos pacientes incluídos nesse estudo reside em Belo Horizonte, caracterizando, assim, uma população urbana, o que diminui a possibilidade de transmissão zoonótica de outras espécies do gênero *Helicobacter* como o *H. pullorum*, encontrado no intestino e fígado de galinhas. Essa espécie, como dito anteriormente, foi identificada por outros autores nas vias biliares e fígado de seres humanos (STANLEY *et al.*, 1994; FOX *et al.*, 1998a; PELLICANO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2005).

Diferentemente desse estudo, em trabalhos anteriores, de desenho retrospectivo, não foi investigada infecção gástrica pelo microrganismo. Nesse trabalho, em quase 90,0% dos casos nos quais a pesquisa de *H. pylori* no fígado foi positiva a pesquisa da infecção gástrica também foi positiva indicando fortemente o estômago como fonte do microrganismo. Em apenas seis casos, o teste respiratório com ^{13}C e a reação de ELISA foram negativos o que pode ser explicado pela sensibilidade desses métodos que não atinge 100,0%. Por outro lado, o método usado para a pesquisa da bactéria no fígado, como já discutido, é muito sensível. Deve ser considerado, ainda, que pode ocorrer diminuição da sensibilidade do método sorológico na vigência de doenças graves que alteram a resposta imunológica do indivíduo.

Os achados do presente estudo, à semelhança de resultados de trabalhos anteriores, fortalecem a hipótese de que, em determinadas condições, *H. pylori* presente no estômago de seres humanos pode migrar e, até mesmo, colonizar o fígado. Há, entretanto, autores que acreditam que a presença de DNA de *H. pylori* no fígado significa apenas contaminação desse sítio por material genômico da bactéria fagocitado por macrófagos, que alcançariam esse órgão pela veia porta. O mesmo raciocínio se aplicaria à microrganismos que compõem a microbiota gastrointestinal. Entretanto, somente na minoria dos trabalhos, conduzidos com o objetivo de identificar *Helicobacter* spp. no fígado de seres humanos, foi pesquisado também DNA de enterobactérias (TANAKA *et al.*, 1999; NILSSON *et al.*, 2000; ITO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2005). Os resultados desses estudos não são homogêneos. No estudo de TANAKA *et al.* (1999), DNA de várias bactérias de gêneros diferentes foi observado nos fragmentos de fígado; esse resultado pode refletir baixa especificidade do método usado ou contaminação no manuseio dos fragmentos. NILSSON *et al.* (2000) também verificaram a presença de *E. coli* na quase totalidade das amostras hepáticas nas quais foi identificado DNA de *Helicobacter* spp. Já nos trabalhos de ITO *et al.* (2004) e ROCHA *et al.* (2005), bem como no presente estudo, DNA desses microrganismos, especificamente *E. coli* e *Bacteroides fragilis*, não foi detectado no fígado (dados não apresentados). Esses achados minimizam a possibilidade de que *H. pylori*, no nosso estudo, seja um simples contaminante do fragmento hepático. Provavelmente, fatores próprios das bactérias do gênero *Helicobacter*

associados a características do hospedeiro favoreçam o estabelecimento desses microrganismos no fígado do homem.

5.3. Doença hepática primária ou metastática e presença de *H. pylori* no fígado

5.3.1. Complicações da doença hepática primária e presença de *H. pylori* no fígado

Na maioria dos estudos que identificaram DNA de bactérias do gênero *Helicobacter* no fígado foram avaliados pacientes com hepatocarcinoma (AVENAUD *et al.*, 2000; NILSSON *et al.*, 2001; FAN *et al.*, 2001; DORE *et al.*, 2002; VERHOEF *et al.*, 2003; PELLICANO *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2005; XUAN *et al.*, 2005). Outros autores estudaram pacientes com hepatite crônica e/ou cirrose hepática associadas à hepatite pelo VHC (DORE *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2005) e pacientes com CEP e CBP (TANAKA *et al.*, 1999; NILSSON *et al.*, 2000; BOOMKENS *et al.*, 2005).

Nessas investigações, a presença de DNA de *Helicobacter* spp. no fígado variou de acordo com o grau de lesão hepática: 3,5%, 17,0 a 92,0% e 40,0 a 100,0% na presença de hepatite crônica, cirrose e hepatocarcinoma, respectivamente. O trabalho de ROCHA *et al.* (2005) compara pacientes com

diversos graus de lesão hepática associada ao VHC com um grupo controle e demonstra que a positividade para DNA da bactéria aumentou na medida em que o grau das lesões hepáticas era mais grave.

No presente estudo, apesar de o número de casos de CHC (n=4) não permitir tratamento estatístico, DNA do microrganismo foi verificado na maioria dos fragmentos hepáticos dos pacientes com CHC (75,0%). Juntamente com os dados de literatura, esse resultado sugere uma possível participação de espécies de *Helicobacter* na progressão da hepatite crônica para cirrose e CHC no homem. A bactéria poderia contribuir como um co-fator para o agravamento do processo inflamatório e, assim, favorecer o desenvolvimento de CHC; entretanto há apenas dois trabalhos avaliando a participação de *Helicobacter* spp. no processo de carcinogênese (YANAGISAVA *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005). Recentemente, YANAGISAVA *et al.* (2005), usando técnicas de ELISA, imunohistoquímica e RT-PCR, identificaram expressão aumentada de membros da família das metaloproteases (MMP-2; MMP-9), enzimas proteolíticas associadas à disseminação de tumores, em cultura de células hepáticas (HepG2) infectadas por cepas de *H. pylori* *cagA*-positivas/*cagE*-positivas e por amostras de *H. cholecystus*, mas não por outras espécies de *Helicobacter*. No estudo de ZHANG *et al.* (2005) foi vista maior expressão de produtos codificados por oncogenes bem como proteínas que regulam a transcrição gênica em células hepáticas (Hep G2) expostas a amostras de *H. pylori* que células não expostas. Por outro lado, vários autores preconizam que a presença de *Helicobacter* spp. no fígado de pacientes com CHC seria consequência direta da neoplasia. O ambiente intra-hepático modificado pelo

tumor criaria condições favoráveis para a migração e colonização do fígado pela bactéria. O CHC pode causar colestase intra-hepática crônica, favorecendo a persistência do microrganismo no fígado. Outro fator que poderia estar relacionado à presença do *H. pylori* no tecido tumoral seria a escassez ou, até mesmo, a ausência de células de Kupffer no tumor, o que evitaria a fagocitose da bactéria que sobreviveria em um nicho diferente do habitual. LIU e cols (2003), por imunohistoquímica, demonstraram que o número de células de Kupffer é significativamente menor no tecido tumoral que no fígado normal adjacente à neoplasia.

Diferentemente dos resultados observados por ROCHA *et al.* (2005), no presente estudo, não foi observada associação entre DNA de *Helicobacter* no fígado e cirrose hepática. Deve ser ressaltado; entretanto, que no estudo de ROCHA *et al.* (2005) não foram avaliados pacientes com outras causas de cirrose como a secundária ao uso de álcool, que nesse estudo contribui com 18 casos.

Essas diferenças entre os resultados dos estudos podem ser explicadas, em parte, por diferenças geográficas e clínicas dos indivíduos estudados ou, ainda, pelo desenho dos estudos e pela sensibilidade dos métodos usados. Entretanto, outra possibilidade não pode ser excluída: a presença da bactéria no fígado estaria associada não somente às complicações como também às etiologias da doença hepática. É possível que os fatores causais das hepatopatias contribuam de alguma forma para a migração e o estabelecimento do microrganismo no fígado.

5.3.2. Causas da doença hepática primária e presença de *H. pylori* no fígado

Em oito, dentre os 17 trabalhos que investigaram a presença de bactérias do gênero *Helicobacter* spp. no fígado, a causa da doença hepática era infecção pelo VHC e/ou VHB (FAN *et al.*, 2001; DORE *et al.*, 2002; PELLICANO *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2005). No presente trabalho, DNA de *H. pylori* nos fragmentos hepáticos associou-se à infecção prévia ou atual pelo VHB. Associação entre a presença de espécies de *Helicobacter* no fígado e hepatopatia associada à infecção pelo vírus B foi descrita na China (FAN *et al.*, 2002) e no Japão (ITO *et al.*, 2004), mas não há estudos avaliando todo o espectro da infecção pelo VHB. Com base nos resultados desse estudo é possível que fatores inerentes à infecção pelo VHB, provavelmente, dependentes da relação entre hospedeiro e vírus, contribuam para que bactérias presentes no estômago se estabeleçam no fígado de seres humanos. É provável que a interação entre vírus e *H. pylori* modifique o curso natural das infecções causadas por esses agentes.

Há estudos demonstrando que a resposta imunológica específica do hospedeiro pode determinar o curso da infecção pelo VHB. O perfil de resposta Th1 é frequentemente observado nos indivíduos com doença auto-limitada (LECHNER *et al.*, 2000). A produção de citocinas pró-inflamatórias pelos linfócitos CD4⁺ e a ativação de linfócitos CD8⁺ e linfócitos B associam-se à redução da replicação viral (MIZUKOSKI *et al.*, 2004). Com base nessas observações, tem sido proposto que a habilidade do hospedeiro em orquestrar

uma resposta celular eficiente é o principal mecanismo responsável pelo controle da infecção pelo vírus. Por outro lado, falhas na elaboração dessa resposta, seriam responsáveis pela cronicidade da infecção.

Dessa maneira, a função alterada da célula T parece ser um fator determinante para a persistência do vírus B, inclusive depois do estabelecimento da infecção crônica. Assim, a alteração da resposta imunológica do hospedeiro ocasionada pelo VHB poderia contribuir para o estabelecimento do *Helicobacter* spp. no fígado. Entretanto, pela falta de dados, vários fatos necessitam ainda ser esclarecidos, inclusive a possibilidade de bactérias do gênero *Helicobacter* contribuírem para o agravamento das hepatopatias pelo vírus B.

Diferentemente de outras investigações preliminares, nesse estudo não foi identificada associação entre a presença de *H. pylori* no fígado e VHC (ITO *et al.*, 2004; PELLICANO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2005). Nos trabalhos de ITO *et al.* (2004) e PELLICANO *et al.* (2004) só foram incluídos pacientes com cirrose e/ou hepatocarcinoma. Já, no trabalho de ROCHA *et al.* (2005), pacientes com VHC sem cirrose e hepatocarcinoma também foram avaliados e DNA de *Helicobacter* spp. foi detectado em 91% (19/21), 61,3% (19/31) e 3,5% (1/29) das amostras de fígado de pacientes infectados pelo VHC com CHC, cirrose e hepatite crônica sem cirrose, respectivamente. De acordo com esses estudos, a presença da bactéria no fígado está associada às complicações da infecção pelo VHC. No presente estudo; no entanto, os pacientes com hepatopatia crônica pelo VHC foram analisados em conjunto, independentemente da presença ou ausência de complicações da doença

hepática e somente dois (em ambos havia DNA de *H. pylori* no fígado) dos oito pacientes tinham cirrose, o que explica os resultados observados.

Como já mencionado, as diferenças entre os trabalhos que identificaram bactérias do gênero *Helicobacter* no fígado do homem podem ser explicadas por vários fatores. Entretanto, a causa da doença hepática como a sensibilidade das técnicas de biologia molecular usadas devem ser destacadas.

5.3.3. Doença hepática metastática e presença de *H. pylori* no fígado: doença do pâncreas

Nesse estudo observou-se associação entre a presença de DNA de *H. pylori* no fígado e doenças pancreáticas, especialmente neoplasia. Vale ressaltar que foi a mais forte associação observada. Há dois estudos epidemiológicos avaliando associação entre infecção pelo *H. pylori* e tumores malignos do pâncreas (RADERER *et al.*, 1998; STOLZENBERG–SOLOMON *et al.*, 2001). No primeiro deles, os autores observaram maior prevalência de infecção pelo *H. pylori*, investigada por sorologia, no grupo de pacientes com adenocarcinoma pancreático que em pacientes com outros tumores do tubo digestivo ou indivíduos saudáveis. No estudo de STOLZENBERG–SOLOMON *et al.* (2001) foram avaliados, em uma coorte de 29133 homens na Finlândia, 125 pacientes que desenvolveram tumores pancreáticos no período de dez anos e 226 controles, tendo sido demonstrado que a infecção prévia pelo *H.*

pylori conferia uma chance duas vezes maior de desenvolver carcinoma pancreático que se tornou mais evidente quando os dados foram ajustados com o tempo de tabagismo.

Entretanto, somente em 2002, DNA de *Helicobacter* foi investigado diretamente no pâncreas de pacientes com tumores do órgão. Os autores detectaram DNA da bactéria em cinco de seis casos (NILSSON *et al.*, 2002). O mesmo grupo, mais recentemente, observou a presença de DNA de *Helicobacter* (*H. pylori*, “*Flexispira rappini*” e *H. cinaedi*) no pâncreas de 50,0% dos pacientes com doença pancreática, incluindo neoplasias malignas, mas em nenhum pâncreas de pacientes com neoplasia de outros órgãos e adenoma benigno do órgão (NILSSON *et al.*, 2003).

Analisando em conjunto esses resultados, não se pode ignorar a possibilidade de que bactérias do gênero *Helicobacter* possam participar como co-fatores na gênese de doenças pancreáticas. Por outro lado, as alterações induzidas pela doença poderiam facilitar a migração e estabelecimento desses microrganismos, tanto no pâncreas como no fígado. Dentre eles, a estase com modificação da composição da bile e alterações da resposta imunológica que ocorre nos pacientes com neoplasia do pâncreas podem ser mencionadas. Desvio para resposta imunológica do tipo Th2 com aumento de expressão de TGF- β e da IL-10 foi observado em pacientes com carcinoma pancreático (BELLONE *et al.*, 1999; MONTI *et al.*, 2004). Estudo, *in vitro*, também demonstrou que células pancreáticas tumorais inibem a resposta Th1 (BELLONE *et al.*, 1999).

5.4. Alterações histopatológicas no fígado dos pacientes dos quais detectou-se *H. pylori*

No presente trabalho, diferentemente ao observado nos estudos conduzidos em animais com infecção hepática por bactérias do gênero *Helicobacter* (FOX *et al.*, 1994; FOX *et al.*, 1996; TIAN *et al.*, 2005), não foi observada associação entre presença de DNA de *H. pylori* no fígado e alterações histopatológicas. Esse resultado, aparentemente, enfraquece a hipótese de que o microrganismo no fígado teria um papel como co-fator na gênese ou na evolução desfavorável das doenças hepáticas. Entretanto, é necessário considerar a grande dificuldade para avaliar essas variáveis em face da variedade de etiologias das doenças hepáticas incluídas no estudo e devido ao fato de que a bactéria não estava presente em algumas doenças hepáticas, mesmo na vigência de alterações histológicas importantes no órgão, como foi o caso de alcoolismo e de doença hepática auto-imune. Assim, torna-se necessário um desenho de estudo mais adequado para avaliar essa questão incluindo um grupo controle saudável, como por exemplo doadores de fígado.

5.5. Alterações histopatológicas no fígado de pacientes com infecção gástrica pelo *H. pylori*

Não há relatos na literatura de estudos avaliando a associação entre presença de *H. pylori* no estômago e lesões histopatológicas do fígado. De maneira inédita, no presente trabalho, a infecção gástrica pela bactéria associou-se independentemente à presença de alterações necroinflamatórias hepáticas. Foi demonstrada, pela primeira vez, associação entre presença da bactéria no estômago e necrose hepática. Ainda, foi demonstrada associação com a presença de infiltrado inflamatório de neutrófilos localizados principalmente no lóbulo hepático e com a presença de linfócitos em qualquer localização nos fragmentos hepáticos. Cabe aqui enfatizar que na análise multivariada, essas associações permaneceram significativas, independentemente da presença dos outros co-fatores de lesão do fígado. Entretanto, não foi observada associação estatisticamente significativa entre presença de fibrose hepática e bactéria no estômago.

Há várias explicações para esses achados. A infecção gástrica pelo *H. pylori* estimula a resposta imunológica local e sistêmica. Há infiltração de células inflamatórias e aumento de produção de várias substâncias vasoativas como endotelina-1 (potente constritor de arteríolas e vênulas), citocinas pró-inflamatórias (IL-1, -IL6, -IL8, TNF- α) e eicosanóides (leucotrienos, prostaglandinas) (CRABTREE *et al.*, 1996; REALDI *et al.*, 1997), que na circulação sanguínea, poderiam atingir o fígado e intensificar lesões

inflamatórias pré-existent. Uma vez no fígado, citocinas e quimiocinas também atuam como mediadores da inflamação, contribuindo para o aumento da migração de células inflamatórias mono e polimorfonucleares. Outra via de acesso de citocinas pró-inflamatórias ao fígado seria a circulação portal. O fluxo de sangue da mucosa gástrica através da circulação portal é quase totalmente direcionado aos sinusóides hepáticos permitindo que concentrações elevadas de IL-1, IL-6 e TNF- α , induzidas pela infecção no estômago, estimulem moléculas de adesão (ICAM-1) nas células endoteliais, aumentando a infiltração de células inflamatórias no fígado.

No fígado, o processo inflamatório é caracterizado por concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias e presença de infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear. Assim, mediadores inflamatórios, associados à presença da bactéria no estômago, ao atingirem o fígado, poderiam ocasionar recrutamento de um número maior de células inflamatórias. Ainda, poderiam ocasionar alterações da microcirculação hepática: vasoconstrição, estase capilar, diminuição da saturação de oxigênio e isquemia progressiva (ROSSER & GORES, 1995; KOUNTOURAS *et al.*, 2005). Adicionalmente, metabólitos reativos de oxigênio, metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, fator ativador de plaquetas, leucotrienos) e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8), derivadas de granulócitos e macrófagos ativados, poderiam interagir com a microcirculação hepática, aumentando a permeabilidade vascular. Outros mecanismos, associados à infecção gástrica pelo *H. pylori*, poderiam, também, intensificar a necrose hepática. Dentre eles destacam-se a agregação plaquetária, a liberação de substâncias vasoativas (endotelina-1) e do fator

tecidual pró-coagulante que converte fibrinogênio em fibrina. Essas alterações poderiam ocasionar a formação de microtrombos, bloqueio dos sinusóides hepáticos, lentidão do fluxo sanguíneo e hipóxia. Em conjunto esses eventos causariam edema e destruição dos hepatócitos.

Assim, é possível que a infecção gástrica pelo *H. pylori* seja um co-fator de lesão do parênquima hepático. Diversos estudos têm proposto que a infecção gástrica pela bactéria, processo crônico que persiste por várias décadas, causaria inflamação crônica e estimularia mecanismos imunológicos capazes de induzir lesões diretamente no estômago bem como à distância desse sítio primário da infecção (CZINN & NEDRUD, 1997). Entretanto, investigações adicionais avaliando um número maior de pacientes são necessárias.

Finalmente, nesse estudo, algumas limitações foram identificadas. A variedade das causas de doença primária ou secundária do fígado, que motivaram a realização da biópsias, foi responsável pela separação dos pacientes em pequenos grupos de acordo com o diagnóstico da afecção hepática. Esse fato, em algumas situações, inviabilizou uma análise estatística adequada. Ainda, no desenho do estudo não foi incluído um grupo controle por razões éticas e, dessa maneira, não foi possível avaliar a frequência pela qual o microrganismo poderia ser encontrado no fígado normal. Em outro estudo em andamento no Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia, fígados saudáveis (doadores para transplante) foram analisados e amostras de DNA de *Helicobacter* não foram detectadas. Assim, é possível que a colonização hepática pela bactéria não ocorra nos indivíduos saudáveis.

Apesar dessas limitações, os resultados desse estudo ampliam o conhecimento no assunto, demonstrando, pela primeira vez, associação entre presença do microrganismo no fígado e doença pancreática, principalmente neoplasia maligna. Ainda, demonstra associação com VHB, independentemente de doença atual ou passada, sugerindo fatores de suscetibilidade comuns. Além disso, revela, de forma inédita, associação entre presença de *H. pylori* no estômago e alterações necroinflamatórias hepáticas. Todavia, os mecanismos pelos quais o microrganismo contribuiria para a patogênese da doença hepática não estão completamente esclarecidos. Dessa maneira, estudos prospectivos, que englobem um número maior de pacientes para permitir formar grupos de pacientes com hepatopatias de etiologias diferentes e diferentes fases da doença, são necessários para análise do grau de participação da bactéria no curso das doenças do fígado. Além deste aspecto, a contribuição da infecção gástrica pelo *H. pylori* no agravamento de lesões (necroinflamatórias) pré-existentes no parênquima hepático necessita ser comprovada. De toda forma, o impacto desse achado, se confirmado, será enorme, pois seria teoricamente possível prevenir alguns casos de cirrose e/ou CHC com a erradicação do *H. pylori*, especialmente, se o tratamento for feito em fases precoces da doença hepática.

6.0. CONCLUSÕES

1. De forma inédita foram isoladas em cultura pura bactérias do gênero *Helicobacter* no fígado de seres humanos. Por métodos de biologia molecular (PCR-aninhada), foram confirmados os dados relatados em estudos anteriores sobre a presença de DNA de bactérias do gênero *Helicobacter* no fígado de pacientes com hepatopatias.
2. Similarmente à maioria das investigações prévias descritas na literatura, a espécie de *Helicobacter* identificada, tanto nas amostras isoladas em cultura como nas amostras detectadas por PCR, pela análise das seqüências mostrou homologia com *H. pylori* igual ou superior a 99%.
3. De maneira inédita, a presença de DNA da bactéria no fígado associou-se à pancreatopatias, especialmente às neoplasias pancreáticas.
4. Pela primeira vez, foi observada associação entre a presença de DNA de *Helicobacter* no fígado e infecção passada ou atual pelo VHB, sugerindo fatores de susceptibilidade comuns.
5. Semelhantemente às investigações anteriores, apesar do pequeno número de casos de CHC não permitir análises de associação, DNA do

microrganismo foi verificado na maioria dos fragmentos hepáticos dos pacientes com CHC.

6. Não foi observada associação entre a presença de *H. pylori* no fígado e cirrose hepática. Entretanto, esse resultado deve ser analisado com cautela, pois, além da variedade das causas de hepatopatia entre os pacientes incluídos, somente poucos com VHC e CEP apresentavam cirrose, condição previamente associada à presença da bactéria no fígado.

7. A presença da bactéria no fígado foi associada à infecção gástrica pelo *H. pylori*, achado que fortalece a hipótese de que a colonização do fígado se deu por bactérias oriundas do estômago.

8. Diferentemente do observado nos estudos conduzidos em animais com infecção hepática por bactérias do gênero *Helicobacter*, alterações qualitativas à histologia do fígado não se associaram à presença da bactéria nos fragmentos hepáticos.

9. De forma inédita, a infecção gástrica pelo *H. pylori* associou-se positivamente à presença de alterações necroinflamatórias (necrose e infiltrado inflamatório com neutrófilos ou linfócitos) no fragmento de fígado, o que sugere uma possível contribuição da infecção gástrica pelo *H. pylori* no agravamento de lesões pré-existentes no parênquima hepático.

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ala A, Schilsky ML. Wilson disease: pathophysiology, diagnosis, treatment, and screening. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 787-805.

Alberti A, Benvegna L. Management of hepatitis C. *J Hepatol* 2003; 38 (Supl 1): S104-18.

Altin M, Hughes RD, Williams R. Neutrophil adherence during hemoperfusion in fulminant hepatic failure. *Int J Artif Organs* 1982; 5: 315-7.

Altin M, Rajkovic IA, Hughes RD, Williams R. Neutrophil adherence in chronic liver disease and fulminant hepatic failure. *Gut* 1983; 24: 746-50.

Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WGE, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston ALWF, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RNM, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde K-H, Mieli-Vergani G, Nakanuma Y, Nishioka M, Penner E, Porta G, Portmann BC, Reed DW, Rodes J, Schalm SW, Scheuer PJ, Schrumpf E, Seki T, Toda G, Tsuji T, Tygstrup N, Vergani D, Zeniya M: International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-938.

Andersen LP, Kiilerick S, Pedersen G, Thoreson AC, Jorgensen F, Rath J, Larsen NE, Borup O, Krogfelt K, Scheibel J, Rune S. An analysis of seven different methods to diagnose *Helicobacter pylori* infections. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 24-30.

Arturo A. Bravo MD, Sunil G, Sheth MD, Sanjiv Chopra MD. Liver Biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344: 495-500.

Avenaude P, Marais A, Monteiro L, Le Bail B, Bioulac Sage P, Balabaud C, Megraud F. Detection of *Helicobacter* species in the liver of patients with and without primary liver carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1431-9.

Barbosa AJ, Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Lima GF Jr, Oliveira CA. Immunocytochemical identification of *Campylobacter pylori* in gastritis and correlation with culture. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 523-5.

Bellone G, Turetti A, Artusio E, Mareschi K, Carbone A, Tibaudi D, Robecchi A, Emanuelli G, Rodeck U. Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients. *Am J Pathol* 1999; 155: 537-47.

Bernuau J, Durand F. Fulminating and subfulminating hepatic failure, emergency of prevention. *Gastroenterol Clin Biol* 1997; 21: 387-90.

Bizzozzero G. Sulle ghiandole tubulari del tube gastroenterico e sui rapporti del loro coll'epitelio de rivestimento della mucosa. *Atti R.Accad. Sci. Torino* 1892; 28: 233-251.

Blaser MJ. *Helicobacters* and biliary tract disease. *Gastroenterology* 1998; 114: 840-2.

Boomkens SY, de Rave S, Pot RG, Egberink HF, Penning LC, Rothuizen J, Zondervan PE, Kusters JG. The role of *Helicobacter* spp. in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 44: 221-5.

Brandão ABM, Marroni CA. Testes de função hepática. In: Mattos AA, Dantas W, editors. *Compêndio de hepatologia*. São Paulo Fundação Byk, 2001: 35-50.

Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 3-16.

Bryner JH, Ritchie AE, Pollet L, Kirkbride CA, Collins JE. Experimental infection and abortion of pregnant guinea pigs with a unique spirillum-like bacterium isolated from aborted ovine fetuses. *Am J Vet Res* 1987; 48: 91-5.

Buckley MJ, O'Morain CA. *Helicobacter* biology discovery. *Br Med Bull* 1998; 54: 7-16.

Bulajic M, Maisonneuve P, Schneider-Brachert W, Muller P, Reischl U, Stimec B, Lehn N, Lowenfels AB, Lohr M. *Helicobacter pylori* and the risk of benign and malignant biliary tract disease. *Cancer* 2002; 95: 1946-53.

Calvet X, Navarro M, Gil M, Mas P, Rivero E, Sanfeliu I, Brullet E, Campo R, Dalmau B, Lafont A. Seroprevalence and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26: 1249-54.

Cançado ELR, Farias AQ, Bittencourt PL. Hepatite auto-imune. In: Silva LC, editor. *Hepatites agudas e crônicas*. São Paulo Savier Ltda, 2003: 191-205.

Chen W, Li D, Cannan RJ, Stubbs RS. Common presence of *Helicobacter* DNA in the gallbladder of patients with gallstone diseases and controls. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 237-43.

Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 192-200.

Coppola N, De Stefano G, Marrocco C, Scarano F, Scolastico C, Tarantino L, Piccinino F, Sagnelli E, Giorgio A, Filippini P. Absence of *Helicobacter* spp. in the liver of patients with primary or metastatic liver cancer. *Hepatology* 2002; 36: 1300-1.

Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*: a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer. *ASM news* 1995; 6121-6.

Crabtree JE. Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1996; 215: 3-10.

Czaja AJ. The variant forms of autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1996; 125: 588-98.

Czinn SJ, Nedrud JG. Immunopathology of *Helicobacter pylori* infection and disease. *Springer Semin Immunopathol* 1997; 18: 495-513.

Dore MP, Realdi G, Mura D, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter* infection in patients with HCV-related chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1638-43.

Dubois A, Tarnawski A, Newell DG, Fiala N, Dabros W, Stachura J, Krivan H, Heman-Ackah LM. Gastric injury and invasion of parietal cells by spiral bacteria in rhesus monkeys. Are gastritis and hyperchlorhydria infectious diseases? *Gastroenterology* 1991; 100: 884-91.

Durazzo M, Pellicano R, Premoli A, Berrutti M, Leone N, Ponzetto A, Rizzetto M. *Helicobacter pylori* seroprevalence in patients with autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 380-3.

Durazzo M, Rosina F, Premoli A, Morello E, Fagoonee S, Innarella R, Solerio E, Pellicano R, Rizzetto M. Lack of association between seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection and primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3179-81.

Fabre R, Sobhani I, Laurent-Puig P, Hedef N, Yazigi N, Vissuzaine C, Rodde I, Potet F, Mignon M, Etienne JP, et al. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests. *Gut* 1994; 35: 905-8.

Fallone CA, Tran S, Semret M, Discepolo F, Behr M, Barkun AN. *Helicobacter* DNA in bile: correlation with hepato-biliary diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 453-8.

Fan XG, Peng XN, Huang Y, Yakoob J, Wang ZM, Chen YP. *Helicobacter* species ribosomal DNA recovered from the liver tissue of Chinese patients with primary hepatocellular carcinoma. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1555-7.

Fan XG, Zou YY, Wu AH, Li TG, Hu GL, Zhang Z. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with hepatitis B. *Br J Biomed Sci* 1998; 55: 176-8.

Fox JG. Other *Helicobacters* involved in human diseases. *Acta Gastroenterol Belg* 2002a; 65: 24-32.

Fox JG, Dewhirst FE, Shen Z, Feng Y, Taylor NS, Paster BJ, Ericson RL, Lau CN, Correa P, Araya JC, Roa I. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterol* 1998a; 114: 755-763.

Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, Collins MJ, Gorelick PL, Ward JM. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J. Clin. Microbiol* 1994; 32: 1238-1245.

Fox JG, Handt L, Sheppard BJ, Xu S, Dewhirst FE, Motzel S, Klein H. Isolation of *Helicobacter cinaedi* from the colon, liver, and mesenteric lymph node of a rhesus monkey with chronic colitis and hepatitis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1580-5.

Fox JG, Li X, Yan L, Cahill RJ, Hurley R, Lewis R, Murphy JC. Chronic proliferative hepatitis in A/JCr mice associated with persistent *Helicobacter hepaticus* infection: a model of *Helicobacter*-induced carcinogenesis. *Infect. Immun* 1996; 64: 1548-1558.

Fox JG, Shen Z, Xu S, Feng Y, Dangler CA, Dewhirst FE, Paster BJ, Cullen JM. *Helicobacter marmotae* sp. nov. isolated from livers of woodchucks and intestines of cats. *J Clin Microbiol* 2002b; 40: 2513-9.

Fox JG, Shen Z, Feng F, Dufour JF, Kaplan MM, Dewhi F. Enterohepatic *Helicobacter* spp. identified from humans with primary biliary cirrhosis. *Gut* 1998b; 43 (suppl. 2):A67 (Abstract).

Fox JG, Yan L, Dewhirst FE, Paster BJ, Shames B, Murphy JC, Hayward A, Belcher JC, Mendes E.N. *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mouse strains. *J. Clin. Microbiol* 1995; 33: 445-454.

Franklin CL, Beckwith CS, Livingston RS, Riley LK, Gibson SV, Besch-Williford CL, Hook RR. Isolation of a novel *Helicobacter* species, *Helicobacter cholecystus* sp nov., from the gallbladders of Syrian hamsters with cholangiofibrosis and centrilobular pancreatitis. *J. Clin. Microbiol* 1996; 34: 2952-2958.

Fukuda K, Kuroki T, Tajima Y, Tsuneoka N, Kitajima T, Matsuzaki S, Furui J, Kanematsu T. Comparative analysis of *Helicobacter* DNAs and biliary pathology in patients with and without hepatobiliary cancer. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1927-31.

Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. As *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39: 397-405.

Graham DY, Adam, E, Klein, PD, Evans Jr., DJ, Hazell, SL, Alpert, LC, Michaletz, PA, Yoshimura, HH. Epidemiology of *Campylobacter pylori* infection. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 1989; 13: 84B-9.

Graham DY, Klein PD, Evans DG., Opekun AR, Boutton TW. *Campylobacter pylori* detected non invasively by the carbon¹³-urea breath test. *Lancet* 1987; *i*: 1174-1177.

Hanninen ML. Sensitivity of *Helicobacter pylori* to different bile salts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 515-8.

Harada K, Ozaki S, Kono N, Tsuneyama K, Katayanagi K, Hiramatsu K, Nakanuma Y. Frequent molecular identification of *Campylobacter* but not *Helicobacter* genus in bile and biliary epithelium in hepatolithiasis. *J Pathol* 2001; 193: 218-23.

Huang Y, Fan XG, Wang ZM, Zhou JH, Tian XF, Li N. Identification of *Helicobacter* species in human liver samples from patients with primary hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1273-7.

Imawari M, Hughes RD, Gove CD, Williams R. Fibronectin and Kupffer cell function in fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1985; 30: 1028-33.

Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-9.

Ishak KG, Anthony PP, Sobin LH. Histological typing of tumours of the liver. World Health Organization. New York: Springer Verlag 1994; 125.

Ito K, Nakamura M, Toda G, Negishi M, Torii A, Ohno T Potential role of *Helicobacter pylori* in hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Med* 2004; 13: 221-7. 29.

Itoh M, Wada K, Tan S, Kitano Y, Kai J, Makino I. Antibacterial action of bile acids against *Helicobacter pylori* and changes in its ultrastructural morphology: effect of unconjugated dihydroxy bile acid. *J Gastroenterol* 1999; 34: 571-6.

Kawaguchi M, Saito T, Ohno H, Midorikawa S, Sanji T, Handa Y, Morita S, Yoshida H, Tsurui M, Misaka R, Hirota T, Saito M, Minami K. Bacteria closely resembling *Helicobacter pylori* detected immunohistologically and genetically in resected gallbladder mucosa. *J. Gastroenterol* 1996; 31: 294-298.

Kellosalo J, Alavaikko M, Laitinen S. Effect of biliary tract procedures on duodenogastric reflux and the gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26: 1272-8.

Kirkbride CA, Gates CE, Collins JE, Ritchie AE. Ovine abortion associated with an anaerobic bacterium. *J Am Vet Med Assoc* 1985; 186: 789-91.

Koehler CI, Mues MB, Dienes HP, Kriegsmann J, Schirmacher P, Odenthal M. *Helicobacter pylori* genotyping in gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma by multiplex PCR analyses of paraffin wax embedded tissues. *Mol Pathol* 2003; 56: 36-42.

Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. A concept on the role of *Helicobacter pylori* infection in autoimmune pancreatitis. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 196-207.

Krienitz W. Auftreten von spirochäten verschiedener form in mageninhalt bei carcinoma ventriculi. *Dtsch Med Wochenschr* 1906; 28: 872-889.

Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345: 41-52.

Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000; 191: 1499-512.

Leone N, Pellicano R, Brunello F, Cutufia MA, Berrutti M, Fagoonee S, Rizzetto M, Ponzetto A. *Helicobacter pylori* seroprevalence in patients with cirrhosis of the liver and hepatocellular carcinoma. *Cancer Detect Prev* 2003; 27: 494-7.

Lerang F, Moum B, Mowinckel P, Haug JB, Ragnhildstveit E, Berge T, Bjorneklett A. Accuracy of seven different tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the impact of H2-receptor antagonists on test results. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 364-9.

Li X, Fox JG, Whary MT, Yan L, Shames B, Zhao Z. SCID/NCr mice naturally infected with *Helicobacter hepaticus* develop progressive hepatitis, proliferative typhlitis, and colitis. *Infect Immun* 1998; 66: 5477-84.

Lin TT, Yeh CT, Wu CS, Liaw YF. Detection and partial sequence analysis of *Helicobacter pylori* DNA in the bile samples. *Dig Dis Sci*. 1995; 40: 2214-9.

Liu K, He X, Lei XZ, Zhao LS, Tang H, Liu L, Lei BJ. Pathomorphological study on location and distribution of Kupffer cells in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1946-9.

Llovet JM, Bruix J. Prognostic assessment and medical treatment of advanced hepatocellular carcinoma. In: Arroyo V, Bosch J, Bruguera M, Ródes J, Sanchez Tapias JM, editors. *Treatment of liver diseases*. Barcelona Masson S.A, 1999: 345-54.

Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001; 120: 1828-53.

Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1273-1275.

Marzio L, Angelucci D, Grossi L, Diodoro MG, Di Campi E, Cellini L. Anti-*Helicobacter pylori* specific antibody immunohistochemistry improves the diagnostic accuracy of *Helicobacter pylori* in biopsy specimen from patients treated with triple therapy. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 223-6.

Mas A, Rodes J. Fulminant hepatic failure. *Lancet* 1997; 349: 1081-5.
Mathai E, Arora A, Cafferkey M, Keane CT, O'Morain C. The effect of bile acids on the growth and adherence of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1991; 5: 653-8.

Matsukura N, Yokomuro S, Yamada S, Tajiri T, Sundo T, Hadama T, Kamiya S, Naito Z, Fox JG. Association between *Helicobacter bilis* in bile and biliary tract malignancies: *H. bilis* in bile from Japanese and Thai patients with benign and malignant diseases in the biliary tract. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 842-7.

Megraud F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Clin N Am* 1993; 22: 73-88.

Mendez-Sanchez N, Pichardo R, Gonzalez J, Sanchez H, Moreno M, Barquera F, Estevez HO, Uribe M. Lack of association between *Helicobacter* spp. colonization and gallstone disease. *J Clin Gastroenterol* 2001; 32: 138-41.

Mizukoshi E, Sidney J, Livingston B, Ghany M, Hoofnagle JH, Sette A, Rehmann B. Cellular immune responses to the hepatitis B virus polymerase. *J Immunol* 2004; 173: 5863-71.

Monstein HJ, Jonsson Y, Zdolsek J, Svanvik J. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in human cholesterol gallstones. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 112-9.

Monteiro L, Gras N, Vidal R, Cabrita J, Megraud F. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. *J Microbiol Methods* 2001; 45: 89-94.

Monti P, Leone BE, Zerbi A, Balzano G, Cainarca S, Sordi V, Pontillo M, Mercalli A, Di Carlo V, Allavena P, Piemonti L. Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10^{high}IL-12^{low} regulatory dendritic cell. *J Immunol* 2004; 172: 7341-9.

Murata H, Tsuji S, Tsujii M, Fu HY, Tanimura H, Tsujimoto M, Matsuura N, Kawano S, Hori M. *Helicobacter bilis* infection in biliary tract cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 (Suppl 1): 90-4.

Myung SJ, Kim MH, Shim KN, Kim YS, Kim EO, Kim HJ, Park ET, Yoo KS, Lim BC, Seo DW, Lee SK, Min YI, Kim JY. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human biliary tree and its association with hepatolithiasis. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1405-12.

Niemela S, Karttunen T, Heikkila J, Maentausta O, Lehtola J. Relationship of *Campylobacter pylori* and duodenogastric reflux. *Dig Dis Sci* 1989; 34: 1021-4.

Nguyen AM, Engstrand L, Genta RM, Graham DY, el-Zaatari FA. Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 783-7.

Nilsson HO, Mulchandani R, Tranberg KG, Taneera J, Caastedal M, Glatz E, Olsson R, Wasdröm T. *Helicobacter* species identified in liver from patients with cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol* 2001; 120: 323-324.

Nilsson HO, Stahlbrandt H, Abu Al-Soud W, Ihse I, Steram U, Wadström. *Helicobacter* species in the pancreas, stomach and duodenum of patients with pancreas cancer. *Helicobacter* 2003; 8: 442 (Abstract 13.04).

Nilsson HO, Stenram U, Ihse I, Wadstrom T. Re: *Helicobacter pylori* seropositivity as a risk factor for pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 632-3.

Nilsson HO, Taneera J, Caastedal M, Glatz E, Olsson R, Wasdröm T. Identification of *H. pylori* and other *Helicobacter* species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. *J. Clin Microbiol* 2000; 38: 1072-1076.

Oliveira AG, das Gracas Pimenta Sanna M, Rocha GA, Rocha AM, Santos A, Dani R, Marinho FP, Moreira LS, de Lourdes Abreu Ferrari M, Moura SB, Castro LP, Queiroz DM. *Helicobacter* species in the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 384-6.

Peek RM, Miller GG, Tham KT, Perez-perez GI, Zhao X, Atherton JC, Blaser MJ. Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to *cagA*⁺ *Helicobacter pylori*. *Lab. Investig* 1995; 71: 760-770.

Pellicano R, Leone N, Berrutti M, Cutufia MA, Fiorentino M, Rizzetto M, Ponzetto A. *Helicobacter pylori* seroprevalence in hepatitis C virus positive patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33: 648-50.

Pellicano R, Mazzaferro V, Grigioni WF, Cutufia MA, Fagoonee S, Silengo L, Rizzetto M, Ponzetto A. *Helicobacter* species sequences in liver samples from patients with and without hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 598-601.

Pietrangelo A. Haemochromatosis. *Gut* 2003; 52(Suppl 2): ii23-30.

Ponzetto A, Pellicano R, Leone N, Berrutti M, Turrini F, Rizzetto M. *Helicobacter pylori* seroprevalence in cirrhotic patients with hepatitis B virus infection. *Neth J Med* 2000a; 56: 206-10.

Ponzetto A, Pellicano R, Leone N, Cutufia MA, Turrini Grigioni WF, D'errico A, Mortimer P, Rizzetto M, Silengo L. *Helicobacter* infection and cirrhosis in hepatitis C virus carriage: is it an innocent bystander or a troublemarker? *Med. Hypotheses* 2000b; 54: 275-277.

Ponzetto A, Pellicano R, Redaelli A, Rizzetto M, Roffi L. *Helicobacter pylori* infection in patients with Hepatitis C Virus positive chronic liver diseases. *New Microbiol* 2003; 26: 321-8.

Portincasa P, Vacca M, Moschetta A, Petruzzelli M, Palasciano G, van Erpecum KJ, van Berge-Henegouwen GP. Primary sclerosing cholangitis: updates in diagnosis and therapy. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7-16.

Queiroz DM, Rocha AMC, Rocha GA, Cinque SMS, Oliveira AG, Godoy A, Tanno H. Association between *Helicobacter pylori* infection and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 370-3.

Queiroz DM, Barbosa AJ, Mendes EN, Rocha GA, Cisalpino EO, Lima GF Jr, Oliveira CA. Distribution of *Campylobacter pylori* and gastritis in the stomach of patients with and without duodenal ulcer. *Am J Gastroenterol* 1988; 83: 1368-70.

Queiroz, DMM, Mendes, EN & Rocha, GA. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol* 1987; 25: 2378-2379.

Queiroz DMM, Santos A, Oliveira AG, Rocha GA, Moura SB, Camargo ERS, Valle PR, Bicalho LAF, Dani R. Isolation of a *Helicobacter* strain from the human liver. *Gastroenterology* 2001; 121: 1023-1024.

Raderer M, Wrba F, Kornek G, Maca T, Koller DY, Weinlaender G, Hejna M, Scheithauer W. Association between *Helicobacter pylori* infection and pancreatic cancer. *Oncology* 1998; 55: 16-9.

Rappin G. Contribution a l'etude bactéries de la bouche a l'etat normal et dans la fièvre typhoïde. *A. Parent, Paris* 1881.

Realdi G, Dore MP, Fastame L. Extradigestive manifestations of *Helicobacter pylori* infection: fact and fiction. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 229-36.

Reynolds MA, Siow Y, Collet D, Klar E, Richardson JD, Vitale GC. The role of bile acid secretion in the hepatic response to operation and infection. *Am Surg.* 1995; 61: 469-74.

Rocha GA, Oliveira AM, Queiroz DM, Mendes EN, Moura SB, Oliveira CA, Ferrari TC. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection by Cobas Core ELISA in adults from Minas Gerais, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 1263-8.

Rocha M, Avenaud P, Menard A, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P, de Magalhaes Queiroz DM, Megraud F. Association of *Helicobacter* species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. *Gut* 2005; 54: 396-401.

Roe IH, Kim JT, Lee HS, Lee JH. Detection of *Helicobacter* DNA in bile from bile duct diseases. *J Korean Med Sci* 1999; 14: 182-6.

Romero S, Archer JR, Hamacher ME, Bologna SM, Schell RF. Case report of an unclassified microaerophilic bacterium associated with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 142-3.

Rosenow E.C., Sanford A.H. The bacteriology of ulcer of the stomach and duodenum in man. *J Infect Dis* 1915; 17: 219-226.

Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108: 252-75.

Rudi J, Engler S, Theilmann L, Otto G, Stremmel W. Prevalence of serum antibodies to *Helicobacter pylori* and to CagA protein in liver transplant recipients. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1492-5.

Rudi J, Rudy A, Maiwald M, Stremmel W. *Helicobacter* sp. are not detectable in bile from German patients with biliary disease. *Gastroenterology* 1999; 116: 1016-7.

Schadewaldt P, Schommartz B, Wienrich G, Brosicke H, Piolot R, Ziegler D. Application of isotope-selective nondispersive infrared spectrometry (IRIS) for evaluation of [13C] octanoic acid gastric-emptying breath tests: comparison with isotope ratio-mass spectrometry (IRMS). *Clin Chem* 1997; 43: 518-22.

Schauer DB, Ghorri N, Falkow S. Isolation and characterization of "*Fexispira rappini*" from laboratory mice. *J. Clin Microbiol* 1993; 31: 2709-2714.

Sherlock S, Dooley J. Malignant liver tumours. In: Sherlock S, Dooley J, editors. *Diseases of the liver and biliary system*. UK Blackwell Science Ltda, 2002: 537-554.

Shoda J, Tanaka N, He BF, Matsuzaki Y, Osuga T, Miyazaki H. Alterations of bile acid composition in gallstones, bile, and liver of patients with hepatolithiasis, and their etiological significance. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 2130-41.

Silva CP, Pereira-Lima JC, Oliveira AG, Guerra JB, Marques DL, Sarmanho L, Cabral MM, Queiroz DM. Association of the presence of *Helicobacter* in gallbladder tissue with cholelithiasis and cholecystitis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5615-8.

Silva LC. Aspectos peculiares e história natural da hepatite B. In: Silva LC, editor. *Hepatites agudas e crônicas*. São Paulo Savier Ltda, 2003:191-205.

Siringo S, Vaira D, Menegatti M, Piscaglia F, Sofia S, Gaetani M, Miglioli M, Corinaldesi R, Bolondi L. High prevalence of *Helicobacter pylori* in liver cirrhosis: relationship with clinical and endoscopic features and the risk of peptic ulcer. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 2024-30.

Solnick JV, Schauer DB. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 59-97.

Stalke P, Al-Soud WA, Bielawski KP, Bakowska A, Trocha H, Stepinski J, Wadstrom T. Detection of *Helicobacter* species in liver and stomach tissues of patients with chronic liver diseases using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis and immunohistochemistry. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1032-41.

Stanley J, Linton D, Burnens AP, Dewhirst FE, On SLW, Porter A, Owen RJ, Costas M. *Helicobacter pullorum* sp. nov., genotype and fenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiol* 1994; 140: 3441-3449.

Stanley J, Linton D, Burnens AP, Dewhirst FE, Owen RJ, Porter A, On SL, Costas M. *Helicobacter canis* sp. nov., a new species from dogs: an integrated study of phenotype and genotype. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 2495-504.

Stolzenberg-solomon RZ, Blaser MJ, Limburg PJ, Perez-Perez G, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. ATBC Study *Helicobacter pylori* seropositivity as a risk factor for pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2001; 93: 937-41.

Tanaka A, Prindiville TP, Gish R, Solnick JV, Coppel RL, Keeffe EB, Ansari A, Gershwin ME. Are infectious agents involved in primary biliary cirrhosis? A PCR approach. *J Hepatol* 1999; 31: 664-71.

Taylor DE. Genetics of *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu. Rev. Microbiol* 1992; 46: 35-64.

Taylor DE, Blaser MJ. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol Rev* 1992; 46: 35-64.

Taylor DN, Hargraves JA, Lai-King NG, Sherbaniuk RW, Jewell LD. Isolation and characterization of *Campylobacter pyloridis* from gastric biopsies. *Am J Clin Pathol* 1987; 87: 49-54.

Thijs JC, van Zwet AA, Thijs WJ, Oey HB, Karrenbeld A, Stellaard F, Luijt DS, Meyer BC, Kleibeuker JH. Diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: a prospective evaluation of their accuracy, without selecting a single test as the gold standard. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 2125-9.

Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 1992; 340: 1194-5.

Tian XF, Fan XG, Fu CY, Huang Y, Zhu C. Experimental study on the pathological effect of *Helicobacter pylori* on liver tissues. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2005; 13: 780-3.

Tolia V, Nilsson HO, Boyer K, Wuerth A, Al-Soud WA, Rabah R, Wadstrom T. Detection of *Helicobacter ganmani*-like 16S rDNA in pediatric liver tissue. *Helicobacter* 2004; 9: 460-8.

Tompkins DS, West AP. *Campylobacter pylori*, acid, and bile. *J Clin Pathol* 1987; 40: 1387.

Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HD, Chen GC, Chen G, Yu SZ. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1317-21.

Vaira D, Holton J, Menegatti M, Ricci C, Landi F, Ali' A, Gatta L, Acciardi C, Farinelli S, Crosatti M, Berardi S, Miglioli M. New immunological assays for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1999; 45: 123-7.

Valentine JL, Arthur RR, Mobley HL, Dick JD. Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 689-95.

van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AM, Schirm J, Snijder JA. Sensitivity of culture compared with that of polymerase chain reaction for detection of *Helicobacter pylori* from antral biopsy samples. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1918-20.

Venkataramani A, Strong RM, Anderson DS, Gilmore IT, Stokes K, Hofmann AF. Abnormal duodenal bile composition in patients with acalculous chronic cholecystitis. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 434-41.

Verhoef C, Pot RG, de Man RA, Zondervan PE, Kuipers EJ, IJzermans JN, Kusters JG. Detection of identical *Helicobacter* DNA in the stomach and in the non-cirrhotic liver of patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 1171-4.

Vergara M, Calvet X, Roque M. *Helicobacter pylori* is a risk factor for peptic ulcer disease in cirrhotic patients. A meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 717-22.

Xuan SY, Li N, Shi YX, Sun Y, Zhang J, Jiang WJ, Qiang X. Association between *Helicobacter* infection in liver tissue and primary liver carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85: 391-5.

Yanagisawa N, Geironsen L, Al-Soud WA, Ljungh S. Expression of matrix metalloprotease-2, -7 and -9 on human colon, liver and bile duct cell lines by enteric and gastric *Helicobacter* species. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 44: 197-204.

Wang JT, Lin JT, Sheu JC, Yang JC, Chen DS, Wang TH. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy tissue by polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 367-71.

Ward JM, Anver MR, Haines DC, Benveniste RE. Chronic active hepatitis in mice caused by *Helicobacter hepaticus*. *Am. J. Pathol* 1994a, 145: 959-968.

Ward JM., Fox JG, Anver MR, Haines DC, George C.V, Collins MJ Jr, Gorelik P, Nagashima K, Gonda MA, Gidden RV, Tully JG, Russell RJ, Beveniste RE, Paster BJ, Dewhirst FE, Donovan JC, Anderson LM, Rice JM. Chronic active hepatitis and associated livers tumours in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. *J. Natl. Cancer Inst* 1994b; 86: 1222-1227.

Warren JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1273-1275.

Westblom TU, Phadnis S, Yang P, Czinn SJ. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by means of a polymerase chain reaction assay for gastric juice aspirates. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 367-71.

Worku ML, Karim QN, Spencer J, Sidebotham RL. Chemotactic response of *Helicobacter pylori* to human plasma and bile. *J Med Microbiol* 2004; 53: 807-11.

Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR & Isaacson PG *Helicobacter pylori* associated gastritis and primary B cell gastric lymphoma. *Lancet* 1991; 338: 1175-1176.

Wu CS, Lin CY, Liaw YF. *Helicobacter pylori* in cirrhotic patients with peptic ulcer disease: a prospective, case controlled study. *Gastrointest Endosc* 1995; 42: 424-7.

Zhang Y, Fan XG, Chen R, Xiao ZQ, Feng XP, Tian XF, Chen ZH. Comparative proteome analysis of untreated and *Helicobacter pylori*-treated HepG2. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3485-9.

Zullo A, Rinaldi V, Meddi P, Folino S, Lauria V, Diana F, Winn S, Attili AF. *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic cirrhotic patients. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 395-400.

8.0. ANEXO 1

Projeto: “Detecção de *Helicobacter pylori* no fígado de pacientes com doenças hepatobiliares”

Data __/__/__ Pesquisador: _____

Caso nº (IPSEMG) ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

Caso nº (LPB) ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

Nome: _____

Local de moradia atual:

Rua _____ Nº _____

Suspeita diagnóstica/ Indicação da biópsia hepática: _____

Idade ☐ ☐

Sexo ☐ (M ou F)

Cor: _____ Estado civil: _____

Altura ☐ ☐ ☐ (em cm)

Peso ☐ ☐ ☐ ☐ (em Kg)

Naturalidade: _____

Zona rural ou urbana: ☐ (R ou U)

Grau de escolaridade:

Analfabeto=1; I grau incompleto =2; I grau completo=3; II grau incompleto=4;

II grau completo=5; III grau incompleto=6; III grau completo=7

Profissão: _____

Características da moradia:

Nº de pessoas na moradia ☐ ☐

Nº de cômodos na casa (exceto banheiro e cozinha) ☐ ☐

Tem animais de estimação dentro de casa? ☐ ☐ (S ou N)

Fonte de água:

água tratada ☐ (S ou N)

rede de esgoto ☐ (S ou N)

Renda familiar: _____ (salários mínimos por mês)

Hábitos:

Fuma ☐ (S ou N) Quantidade de cigarros/dia/ano: _____

Bebe ☐ (S ou N) (qual tipo de bebida): _____

Quantidade de álcool/dia/ano: _____

Uso de medicação:

Uso de medicação nos últimos dois meses ☐ (S ou N)

Quais medicamentos: _____

Uso de antibióticos no último mês: ☐ (S ou N)

Quais atbs? _____

Há quanto tempo? _____

Uso de anti-inflamatório no último mês: ☐ (S ou N)

Comorbidades: ☐ (S ou N)

HAS ☐ (S ou N)

Diabetes ☐ (S ou N)

Asma ☐ (S ou N)

Anemia ☐ (S ou N)

Insuficiência renal ☐ (S ou N)

Úlcera péptica ☐ (S ou N)

HIV ☐ (S ou N)

Outras _____

Hepatopatia ☐ (S ou N) Qual: _____

Idade do diagnóstico da hepatopatia ☐ ☐

Cirrose ☐ (S ou N) Child (última internação) ☐ (A ou B ou C)

Idade do diagnóstico da cirrose ☐ ☐

Desenvolveu carcinoma hepatocelular: ☐ (S ou N)

Se sim tipo histológico:

outros: _____

Cirurgia: ☐ (S ou N) Motivo: _____

Já foi submetido à EDA ☐ (S ou N) Urease ☐ (P ou N)

Diagnóstico da EDA _____

Hipertensão portal ☐ (S ou N)

Outras informações relevantes: _____

Projeto: “Detecção de *Helicobacter pylori* no fígado de pacientes com doenças hepatobiliares”

Dados clínicos

Nome (Iniciais):

Caso n:

Hg ☐ Ht ☐ VCM ☐ CHCM ☐
Plaquetas ☐ LeucTotais ☐
Seg: ☐ Linf: ☐
Proteínas totais ☐ Albumina ☐
BilirrubinaTotal ☐ Bilirrubina Direta ☐ Bilirrubina indireta ☐
TGO ☐ TGP ☐
Fosfatase alcalina ☐ GGT ☐
Na⁺ sangue ☐ k⁺ sangue ☐
uréia ☐ creatinina ☐
AP ☐ PTTA ☐ RNI: _____ Tempo de protrombina ☐
HBsag ☐ positivo ☐ negativo
Anti-HBc ☐ positivo ☐ negativo
Anti HBs ☐ positivo ☐ negativo
Anti HCV ☐ positivo ☐ negativo
Ferro sérico ☐ Ferritina ☐ CTL ☐ IS % ☐
Ceruloplasmina ☐ Cobre sérico ☐ Cobre urinário ☐
FAN ☐ ASMA ☐ AMA ☐ anti-LKM ☐
Laparoscopia: _____

Histologia do fígado: _____

Líquido ascítico: Proteínas totais ☐ PMN ☐
Citologia _____ Cultura _____
Tratamento: ☐ (S ou N) Diuréticos: ☐ (S ou N) Quais/dose: _____
Medidas para encefalopatia/Quais: _____

8.0. ANEXO 2

Lâmina n^o: _____ Data do exame: ____/____/____ LPB n^o _____

Iniciais do paciente: _____ Idade: ____ Sexo: ____ Diagnóstico: _____

Número de tratos portais: _____					#(0 ausente; 1 leve; 2 moderada; 3 acentuada); \$(0 ausente; 1 presente)				
Parâmetros					Lâminas Topografia				
Alterações estruturais (Estadiamento)									
Expansão fibrosa de espaços-porta ^{\$}									
Expansão fibrosa portal-septos porta-porta ^{\$}									
Expansão fibrosa portal-septos porta-centro ^{\$}									
Esboços de nódulos ^{\$}									
Cirrose ^{\$}									
Alterações hepatocelulares									
					1 Portal	2 Periportal	3 Médiozonal	4 Perivenular	
Esteatose [#] (1- até 33%; 2- 33-66%; 3- >66%)									
Tipo esteatose (0 macro; 1 micro; 2 misto)									
Degeneração hidrópica [#] (1- até 33%; 2- 33-66%; 3- >66%)									
Corpos apoptóticos [#]									
Glicogenização nuclear [#]									
Necrose [#]									
Necrose lobular (1 focal; 2 confluyente; 3 panacinar)									
Necr periportal (1 Focal; 2 poucas áreas; 3. maioria dos tratos portais)									
Colestase									
Quantos tratos têm ducto? _____									
Proliferação dos ductos biliares [#]									
Colatestase [#]									
Colestase [#]									

Colestase [#] (intracitoplasmática)				
Colestase [#] (intracanalicular)				
Lagos biliares [#]				
Granulomas biliares [#]				
Agressão ao epitélio ductal [#]				
Alterações vasculares				
Congestão da veia centrolobular [#]				
Hemorragia na região da veia centrolobular [#]				
Esclerose da veia centrolobular [#]				
Dilatação sinusoidal[#]				
Endotelialite				

Parâmetros		Lâminas Topografia			
	1 Portal	2 Periportal	3 Médiozonal	4 Perivenular	
Alterações hepatocelulares					
Citoplasma em vidro fosco #					
Corpúsculo Hialino de Mallory #					
Megamitocôndrias #					
Displasia hepatocelular #					
Hiperplasia adenomatosa #					
Regeneração hepatócito #					
Tipo de regeneração (1.Trabecular; 2. Pseudoacinar (Rosetas de hepatócitos); 3. Misto)					
Infiltrado inflamatório					
Spill over #					
Hepatite de interface #					
Infiltrado inflamatório geral (panorâmica) #					
Acomete quantos tratos portais? ____					
Infiltrado: Neutrófilo #					
Infiltrado: Linfócito #					
Infiltrado: Eosinófilo #					
Infiltrado: Plasmócito #					
Infiltrado: Histiócito #					
Agregado linfóide#					
Formação de folículos linfóides #					
Colorações especiais					
Inclusões intracelulares PAS+ #					
Outros achados					
Formação de granulomas					
Diagnóstico: _____					

8.0. ANEXO 3

Sequenciamento dos *amplicons* do gene que codifica o RNAr 16S detectados em fragmentos hepáticos

Amostra	Doença do fígado	Nº de pb seqüenciados	Similaridade com <i>H.pylori</i> (%)
602.01	MH esôfago	325	99%
623.00	MH Vesícula biliar	363	99%
149.00	MH Pâncreas	339	100%
180.00	MH Pâncreas	393	99%
369.01	MH Pâncreas	389	99%
155.02	MH Pâncreas	386	99%
13.03	MH Pâncreas	391	100%
257.03	MH Pâncreas	391	99%
300.03	MH Pâncreas	356	99%
05.04	MH Pâncreas	353	99%
810.02	MH pulmão	398	99%
622.00	MH Linfoma	389	99%
184.03	MH Sítio primário desconhecido	329	99%
151.02	Hepatopatia alcoólica	390	99%
423.04 ¹	Hepatopatia alcoólica	1451	100%
666.00	Hepatopatia alcoólica	349	99%
610.00	Hepatopatia alcoólica	390	99%
06.04	Hepatopatia alcoólica	363	99%
609.00	Hepatopatia alcoólica e pancreatite crônica	390	99%
427.04	Hepatopatia alcoólica e colelitíase	388	99%
138.04	Hepatopatia alcoólica e CHC	376	99%
131.04	Hepatite auto-imune	395	99%

1, amplicons de 1500pb (referentes aos microrganismos isolados em cultura); CHC, carcinoma hepatocelular; MH, metástases hepáticas; VHB, vírus da hepatite B; VHC, vírus da hepatite C.

Sequenciamento dos *amplicons* do gene que codifica o RNAr 16S detectados em fragmentos hepáticos

Amostra	Doença do fígado	Nº de pb seqüenciados	Similaridade com <i>H.pylori</i> (%)
656.00	Esteatohepatite não-alcoólica	317	99%
11.03	Esteatohepatite não-alcoólica	379	99%
147.00	Esteatohepatite não-alcoólica	395	99%
412.04	Esteatohepatite não-alcoólica	374	99%
367.01	Hepatopatia crônica pelo VHB	391	99%
11.04	Hepatopatia crônica pelo VHB	386	99%
411.04	Hepatopatia crônica pelo VHB e CHC	383	99%
624.00	Hepatopatia crônica pelo VHC	391	99%
409.04 ¹	Hepatopatia crônica pelo VHC	1459	99%
431.04	Hepatopatia crônica pelo VHC	366	99%
432.04	Hepatopatia crônica pelo VHC	383	99%
668.00	Hepatopatia crônica pelo VHC	381	99%
14.03	Hepatite por medicamentos	386	99%
413.04	Hepatite por medicamentos	368	99%
261.00	Hepatite por medicamentos	384	99%
621.00	Hepatite por medicamentos	375	99%
430.04	Hepatite por medicamentos	395	99%
433.04	Hepatite por medicamentos	376	99%
361.01	Cirrose criptogenética	397	99%
13.04	Cirrose criptogenética	396	99%
445.04	Cirrose criptogenética	394	100%
1246.03	Cirrose criptogenética	393	99%
667.00	Esquistossomose forma hepato-esplênica	395	99%
187.03	Esquistossomose forma hepato-esplênica	357	99%
428.04	Colangite esclerosante primária	379	99%
669.00 ¹	Doença de Wilson	1469	99%
09.04	CHC sem cirrose	383	99%
620.00	Doença policística do pâncreas	387	99%
183.03	Litíase intra-hepática	376	99%

1, amplicons de 1500pb (referentes aos microrganismos isolados em cultura); CHC, carcinoma hepatocelular; MH, metástases hepáticas; VHB, vírus da hepatite B; VHC, vírus da hepatite C.

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR EM UM ESTUDO DE PESQUISA CLÍNICA

Título: “Detecção de *Helicobacter* spp. na bile, vesícula biliar, fígado, pâncreas e intestino de pacientes com doenças hepatobiliares, pancreáticas e doença inflamatória intestinal”

Pesquisador Responsável: *Dulciene Maria de Magalhães Queiroz*

Introdução: Antes de aceitar participar desta pesquisa, é necessário que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Esta declaração esclarece o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos desconfortos e precauções do estudo. Também descreve os procedimentos alternativos que estão disponíveis para você e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre os resultados do estudo. Se você não for honesto com o seu médico com relação ao seu histórico, você poderá prejudicar a você mesmo ao participar deste estudo.

Objetivo: Investigar a presença de um grupo de bactérias chamadas *Helicobacter* na bile, vesícula biliar, fígado e pâncreas de pacientes com doenças da vesícula, do fígado e do pâncreas. A pesquisa também será realizada no intestino e nas fezes de pacientes com doenças inflamatórias do intestino para saber se estas bactérias podem participar na causa destas doenças.

Resumo: Recentemente foi descoberta uma bactéria chamada *Helicobacter pylori* que é causadora de gastrite e de úlcera péptica nas pessoas. Outras bactérias “parecidas” foram encontradas no intestino de pacientes com diarreia. Estudos feitos em animais mostraram que bactérias deste tipo podem participar no desenvolvimento de doenças da vesícula, do fígado e do intestino de camundongos ou de macacos. É provável que bactérias semelhantes possam causar doenças em outros locais do organismo do homem, além do estômago no caso da infecção pelo *H. pylori*.

Procedimento: Se você tem indicação para realizar exame em que precise ser retirado um certo volume de bile ou de fragmentos de tecidos do fígado ou da vesícula biliar ou do intestino para diagnóstico da sua doença ou de cirurgia para retirada do órgão ou de parte deste e, além disso, concorda em realizar o estudo, você pode ser selecionado. Crianças e mulheres grávidas não serão selecionadas. Caso você concorde em participar, além do procedimento básico do exame que você fará, indicado pelo seu médico, 02 fragmentos a mais serão retirados do órgão examinado. Uma amostra de sangue de 7,5 ml também será colhida antes do exame. Se a sua lesão estiver localizada no intestino, você deverá coletar ainda uma amostra de fezes. Todos os resultados de exames que estiverem prontos estarão a sua disposição a qualquer momento da pesquisa. Não haverá nenhum custo por sua parte com a sua inclusão no estudo da mesma forma que você não receberá qualquer remuneração pela sua participação.

Desconfortos: A retirada de sangue poderá causar sensação de tontura em alguns indivíduos, às vezes vermelhidão local e raramente infecção.

Benefícios: A sua participação será muito importante para a descoberta da etiologia de doenças cuja causa permanece desconhecida e poderá contribuir no futuro para a melhoria do controle e tratamento destas doenças.

Confidencialidade: O seus resultados serão mantidos em sigilo até onde é permitido pela lei. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG poderá verifica-los e ter acesso aos dados que identificam seu nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o órgão patrocinador, para a instituição e para o Comitê de Ética em Pesquisa-COEP/UFMG.

Desligamento: Você poderá se afastar a qualquer momento sem prejuízo para o seu acompanhamento médico.

Novas descobertas: Todos os novos dados desta pesquisa serão fornecidos à você.

Contato com o pesquisador pode ser feito pelo telefone (31) 3248-9784. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente da pesquisa, você deverá ligar para o Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa – COEPE/UFMG no número (31) 3239-7120 ou 3239-7130.

Consentimento:

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento para que eu próprio participe do estudo, até que eu decida o contrário.

Nome do paciente selecionado e idade	Data
--------------------------------------	------

Assinatura do paciente	Data
------------------------	------

Assinatura da testemunha	Data
--------------------------	------

Assinatura da testemunha	Data
--------------------------	------

