

ELIZABETH MARIA AFONSO RABELO GONÇALVES

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL
MURINO PARA A INFECÇÃO PELO *Helicobacter pylori*:
ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas, da aluna
ELIZABETH MARIA AFONSO RABELO GONÇALVES.
29/05/02

Prof(a). Dr(a). José Murilo Robilotta Zeitune
Orientador



CAMPINAS

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ELIZABETH MARIA AFONSO RABELO GONÇALVES

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL
MURINO PARA A INFECÇÃO PELO *Helicobacter pylori*:
ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS**

*Dissertação apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Clínica
Médica, área de Ciências Básicas*

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ MURILO ROBILOTTA ZEITUNE

CAMPINAS

2002

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TIUNICAMP
	G586e
V	EX
TOMBO BC	56648
PROC.	16-129703
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/22/03
Nº CPD	

CM00192157-4

Bibid 307216

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

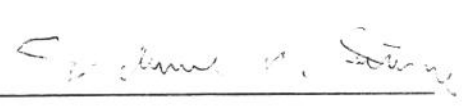
G586e Gonçalves, Elizabeth Maria Afonso Rabelo
Estabelecimento de um modelo experimental murino para a
infecção pelo *Helicobacter pylori*: aspectos histopatológicos /
Elizabeth Maria Afonso Rabelo Gonçalves. Campinas, SP : [s.n.],
2002.

Orientador : José Murilo Robilotta Zeitune
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Infecção. 3. Camundongo. I. José
Murilo Robilotta Zeitune. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Aluno: *ELIZABETH MARIA AFONSO RABELO GONÇALVES*

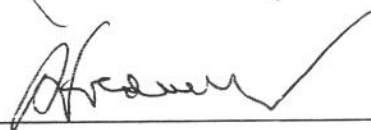
Orientador(a): *José Murilo Robilotta Zeitune* 

Membros:

Professor Doutor Ricardo Brandt de Oliveira



Professor Doutor Antonio Frederico Novaes Magalhães



**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 29/05/02

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Américo e Sônia**, pela dedicação e amor infinitos; seus ensinamentos sempre iluminarão meus caminhos;*

*Ao meu esposo **Fernando**, pela compreensão durante as ausências, pelo amor, confiança e carinho dedicados em várias etapas de minha vida;*

*Aos meus filhos **Henrique e Mariana**, que são a força impulsionadora de todos os meus projetos de vida;*

*A minha irmã **Marília**, pelo incentivo constante, amizade e experiência;*

*Aos meus avós paternos **Mário** (in memorian) e **Elisabeth** (in memorian) e maternos **José e Odete** (in memorian), que sempre me dedicaram muito afeto e confiança, sem os quais não teria concluído mais essa etapa.*

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

Ao prof. Dr. José Murilo Robilotta Zeitune pela orientação, confiança, amizade e os agradáveis anos de convivência.

À Dra. Nancy Fusae Nishimura, pelo auxílio inestimável na realização deste trabalho. Seu altruísmo e disponibilidade para ajudar foram importantes tanto na vida acadêmica quanto na pessoal.

Aos professores e residentes da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, em especial ao Dr. Leonardo Trevisan Monici, pelo empenho na coleta das biópsias gástricas.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, pelos ensinamentos transmitidos.

Às biólogas Natalícia e Derci do Laboratório de Bacteriologia do Gastrocentro/UNICAMP, pelo apoio e pela torcida.

Ao prof. Dr. José Geraldo P. Ferraz pela gentil cessão do espaço no Biotério do Laboratório do Gastroenterologia Experimental do Gastrocentro/UNICAMP, onde foram mantidos os animais utilizados no estudo.

Ao biólogo Gerson do Laboratório do Gastroenterologia Experimental do Gastrocentro/UNICAMP, pelo auxílio na manutenção dos camundongos.

Ao Dr. José Augusto Gatto Stedile e Profa. Dra. Mirian Trevisan do Laboratório de Anatomia Patológica do Gastrocentro/UNICAMP, pela oportunidade de usufruir dos recursos do laboratório e pelo auxílio na análise dos resultados histopatológicos.

Às biólogas Neusa, Ana e Lídia do Laboratório de Anatomia Patológica do Gastrocentro/UNICAMP pelo apoio e carinho.

Ao prof. Dr. Nelson Adami Andreollo pelas orientações na coleta do material histológico.

À Andreia, Cleide e Helimar da Comissão de Pesquisa e Estatística da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP.

À Renata pela convivência agradável e auxílio na secretaria.

Às outras pessoas que me ajudaram durante a realização deste estudo, que involuntariamente possa ter esquecido de mencionar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Fundação de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP)/UNICAMP pelo apoio financeiro concedido, que permitiu a realização deste trabalho.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Bacteriologia e Hepatologia do Gastrocentro-UNICAMP e foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº 99/07821-0)

“Uma grande característica do homem é sua capacidade de autodesenvolvimento - uma faculdade que, com a ajuda das circunstâncias, progressivamente desenvolve todas as outras faculdades”

(Jean Jacques Rousseau)

	<i>Pág</i>
RESUMO.....	<i>xxi</i>
1. INTRODUÇÃO.....	35
1.1. Características gerais do <i>Helicobacter pylori</i>	37
1.2. Epidemiologia da infecção causada pelo <i>H. pylori</i>	43
1.3. Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo <i>H. pylori</i>	49
1.4. Modelos experimentais para a infecção pelo <i>H. pylori</i>	60
2. OBJETIVOS.....	71
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	75
3.1. Obtenção da cepa bacteriana.....	77
3.2. Preparo da suspensão de inóculo.....	78
3.3. Infecção experimental.....	80
3.4. Sacrifício dos animais e coleta do material.....	81
3.5. Pesquisa de <i>H. pylori</i> na mucosa gástrica e duodenal.....	81
3.6. Análise histopatológica.....	82
3.7. Análise estatística.....	82
3.8. Comitê de Ética.....	83

4. RESULTADOS.....	85
4.1. Resultados macroscópicos.....	87
4.2. PCR.....	87
4.3. Pesquisa de <i>H. pylori</i> na mucosa gástrica e duodenal.....	87
4.4. Resultados histopatológicos.....	88
5. DISCUSSÃO.....	101
6. CONCLUSÕES.....	113
7. SUMMARY.....	117
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	Infusão Cérebro-Coração
BHMm	Meio Belo Horizonte Modificado
[¹³ C]	Carbono 13 radiomarcado
[¹⁴ C]	Carbono 14 radiomarcado
<i>cagA</i>	Gene que codifica a proteína CagA
<i>CagA</i>	Proteína da superfície celular do <i>H. pylori</i>
CEMIB	Centro Multi-Institucional de Biotecnologia
CO ₂	Gás carbônico
DNA	Ácido deoxirribonucleico
ELISA	Técnica Imunoenzimática
H&E	Coloração Hematoxilina-Eosina
HpSA	Pesquisa de antígeno de <i>H. pylori</i> em fezes
<i>IceA</i>	Gene que codifica a proteína iceA
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
INF- γ	Interferon gama
LPS	Lipopolissacarídeo

N ₂	Nitrogênio
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>PicA</i>	Gene que codifica a proteína PicA do <i>H. pylori</i>
<i>PicB</i>	Gene que codifica a proteína PicB do <i>H. pylori</i>
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
TE	Tampão de Extração
Th0	Resposta imunológica do tipo T-helper 0
Th1	Resposta imunológica do tipo T-helper 1
Th2	Resposta imunológica do tipo T-helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônia
<i>UreA</i>	Gene que codifica a subunidade A da enzima urease
<i>VacA</i>	Citotoxina vacuolizante produzida pelo <i>H. pylori</i>
<i>VacA</i>	Gene que codifica a citotoxina vacuolizante

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Percentual de animais com infiltrado inflamatório no antro.....	89
TABELA 2 : Percentual de animais com infiltrado inflamatório no corpo.....	90
TABELA 3 : Percentual de animais com infiltrado inflamatório no piloro.....	91
TABELA 4 : Percentual de animais com infiltrado inflamatório no duodeno.....	92

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
FIGURA 1 : Eletroforese em gel de agarose a 2% da amplificação dos genes <i>cagA</i> , <i>vacA</i> e <i>ureA</i>	87
FIGURA 2 : Aspecto histopatológico do duodeno de um animal do grupo GB aos 7 dias pi. Coloração Hematoxilina-Eosina, (400X).....	95
FIGURA 3 : Aspecto geral do estômago de um animal do grupo controle (GC) exibindo todas as camadas teciduais sem alterações histopatológicas. Coloração Hematoxilina-Eosina, (100X).....	96
FIGURA 4 : Aspecto histopatológico do corpo gástrico de um animal do grupo GA no 28º dia pi. Coloração Hematoxilina-Eosina, (400X).....	97
FIGURA 5 : Aspecto do infiltrado linfoplasmocitário nas vilosidades e mucosa intestinal de um animal do GA aos 35 dias pi. Coloração Hematoxilina-Eosina, (400X).....	98
FIGURA 6 : Visualização do <i>H. pylori</i> na camada de muco do corpo gástrico de um animal do grupo GA no 7º dia pi. Coloração Giemsa modificado, (1000X).....	99

LISTA DE GRÁFICOS

	<i>Pág</i>
GRÁFICO 1 : Representação gráfica do percentual de animais com infiltrado inflamatório no antro.....	93
GRÁFICO 2 : Representação gráfica do percentual de animais com infiltrado inflamatório no corpo.....	93
GRÁFICO 3 : Representação gráfica do percentual de animais com infiltrado inflamatório no piloro.....	94
GRÁFICO 4 : Representação gráfica do percentual de animais com infiltrado inflamatório no duodeno.....	94



RESUMO

O *H. pylori* é uma bactéria espiralada, gram-negativa e microaerofílica que coloniza a mucosa gástrica humana. A infecção crônica causada pelo organismo é associada ao desenvolvimento de gastrite, úlcera péptica e câncer gástrico. Considerando que os mecanismos patogênicos da infecção não estão totalmente esclarecidos e os estudos utilizando modelos experimentais para o estudo da infecção são escassos no Brasil, o objetivo do presente estudo foi estabelecer um modelo experimental murino para a infecção pelo *H. pylori*, utilizando uma cepa patogênica da bactéria. Foram utilizados 126 camundongos BALB/c machos, com 6 a 8 semanas de idade, divididos em três grupos: **GA**: onde 42 animais foram inoculados com 1ml de suspensão preparada com bactérias frescas contendo 10^8 UFC/ml; **GB**: onde 42 animais foram inoculados com 1ml de suspensão preparada com bactérias congeladas contendo 10^8 UFC/ml e **GC**: onde 42 animais foram inoculados com 1 ml de caldo brucella, constituindo o grupo controle. Os animais foram inoculados por via oral durante dois dias consecutivos. Lotes de 6 a 7 animais de cada grupo foram sacrificados aos 7, 14, 21, 28, 35 e 60 dias pi e fragmentos do estômago e duodeno foram coletados. Metade dos fragmentos foi submetida à cultura. Os fragmentos restantes foram submetidos aos procedimentos rotineiros para inclusão em parafina, microtomia e colorações H&E e Giemsa modificado. Os resultados obtidos demonstraram que, embora o *H. pylori* não tenha sido isolado do trato gastrointestinal murino, os animais inoculados exibiram duodenite e infiltrado inflamatório no estômago. A presença da bactéria foi confirmada nos fragmentos corados pelo Giemsa na maioria dos animais infectados; o número de organismos diminuiu durante a infecção.

No duodeno, independentemente da condição da cepa utilizada, a infiltração exibiu-se discreta a moderada nas vilosidades e mucosa. Nos animais do grupo GA, o infiltrado foi

linfoplasmocitário até o 35º dia pi; entretanto, no grupo GB, o infiltrado demonstrou-se linfomonocitário durante os 60 dias pi. No estômago, o *H. pylori* induziu o desenvolvimento de infiltrado linfomonocitário no antro e corpo dos animais infectados. Embora não foram observadas diferenças quanto à intensidade e a natureza do infiltrado nos grupos GA e GB, verificou-se que a cepa fresca foi capaz de induzir a inflamação gástrica desde os períodos iniciais da infecção. No grupo GA, observou-se ainda que o

infiltrado inflamatório foi mais persistente, permeando o estômago durante os 60 dias pi. Tanto no estômago quanto no duodeno, o pico da infecção foi visualizado aos 21 dias pi. Os dados observados no grupo GB sugeriram ainda que o processo de congelamento provavelmente inibiu a expressão de antígenos bacterianos, suprimindo a resposta plasmocitária observada no duodeno dos animais do grupo GA. Embora o congelamento não tenha interferido na natureza da infiltração gástrica, constatou-se a alteração no potencial patogênico da cepa e, conseqüentemente, no estabelecimento e manutenção da infecção. Em conjunto, os dados aqui descritos demonstraram que o camundongo BALB/c, apesar de ter desenvolvido duodenite e infiltrado inflamatório no estômago, demonstrou-se uma linhagem pouco suscetível à gastrite e ulcerogênese induzidas pela inoculação experimental do *H. pylori*.



1. INTRODUÇÃO

1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO *Helicobacter pylori*

1.1.1. Morfologia

Há mais de um século, microrganismos curvos e espiralados vêm sendo observados no estômago de vários mamíferos, incluindo o homem (TAYLOR & BLASER, 1991). Mais recentemente, WARREN & MARSHALL (1983) isolaram uma bactéria espiralada a partir de fragmentos da mucosa gástrica de pacientes com gastrite. Desde então, admitiu-se que estes organismos poderiam estar relacionados à etiopatogenia dos distúrbios gastrointestinais (WARREN & MARSHALL, 1983; FOX et al., 1990; SHIMOYAMA & CRABTREE, 1998).

Empregando métodos específicos para o diagnóstico do gênero *Campylobacter*, WARREN & MARSHALL (1983) obtiveram amostras do microrganismo, inicialmente denominado *Campylobacter pyloridis*. Embora as amostras tenham apresentado características típicas do gênero *Campylobacter*, diferentes características morfológicas, estruturais, bioquímicas e genômicas levaram os pesquisadores a incluí-las em um novo gênero, atualmente conhecido como *Helicobacter* (GOODWIN et al., 1989). Desde então, a bactéria foi denominada *Helicobacter pylori*.

O *H. pylori* é um organismo gram-negativo, com aproximadamente 0,5µm de largura e 2,0 a 3,0µm de comprimento. É móvel, apresenta superfície lisa e quatro a seis flagelos unipolares embainhados e com bulbos terminais nas extremidades distais (GOODWIN et al., 1985). Produz várias enzimas como oxidase, catalase, fosfatase alcalina, superóxido dismutase, aminopeptidase, desoxirribonuclease e urease (McNULTY & DENT, 1987).

Trata-se de uma bactéria microaerofílica, cujas tensões de gases ideais para o seu crescimento são: O₂ a 5%, CO₂ a 10% e N₂ a 85%. A temperatura de seu cultivo é 37°C e o organismo necessita de um período de incubação de três a sete dias. (McNULTY & DENT, 1987; TOMINAGA et al. 1999). Em geral, são utilizados meios de cultura contendo poucos agentes seletivos para o seu isolamento (STEVENSON, LUCIA, ACUFF, 2000). Todavia, o *H. pylori* é considerado um organismo de crescimento fastidioso (ANDERSEN et al., 1997; SIU, LEUNG, CHENG, 1998).

Assim como as bactérias do gênero *Vibrio*, o *H. pylori* apresenta dois tipos de morfologia celular: a forma espiral e cocóide, sendo esta última observada *in vivo* e induzida sob condições de stress *in vitro* (DONELLI et al., 1998). Durante a infecção, a maioria das bactérias existentes na mucosa gástrica apresenta-se na forma espiral; entretanto, as formas cocóides também podem ser encontradas no estômago e duodeno humano (COLE et al., 1997; KUSTERS et al., 1997).

A conversão da forma espiral para cocóide tem sido descrita nas culturas de *H. pylori* submetidas à condições consideradas desfavoráveis ao seu cultivo, tais como: aerobiose, pH alcalino, altas temperaturas, incubação prolongada, tratamento dos pacientes com inibidores de bomba protônica e/ou antibióticos, exposição das colônias à substâncias doadoras de óxido nítrico (NO) e ligação da bactéria ao epitélio gástrico (MIZOGUCHI et al., 1998; COLE et al., 1999; ANDERSEN et al., 2000).

Adicionalmente, a tensão de oxigênio e o pH podem variar no microambiente gástrico, de acordo com o tipo de alimento ou com os componentes químicos da dieta, contribuindo para a conversão das formas espirais. Os metabólitos oxidativos dos fagócitos também podem induzir a conversão para a forma cocóide em pacientes não tratados (ANDERSEN et al., 2000).

Embora vários pesquisadores têm sugerido que a forma cocóide do *H. pylori* representa uma forma degenerativa, incapaz de infectar o hospedeiro, outros relatam que ela mantém fraca atividade metabólica, importantes componentes estruturais e até mesmo patogenicidade (MIZOGUCHI et al., 1998). De fato, COLE et al. (1997) ressaltaram que as bactérias cocóides podem estar ligadas a células do epitélio gástrico danificadas. Além disso, os autores descrevem a prevalência destas formas nas bordas dos tumores gástricos, podendo ser identificadas em 93% das biópsias de pacientes com adenocarcinoma associado ao *H. pylori*. Adicionalmente, BENAÏSSA et al., (1996) sugerem que as formas cocóides exibem alguns componentes antigênicos ausentes nas bactérias espiraladas e reconhecidos no soro de pacientes infectados.

Deste modo, a viabilidade e patogenicidade das formas cocóides do *H. pylori* têm sido amplamente discutidas. CAVE (1997) relatou que elas também apresentam flagelo e o processo de sua conversão está associado à produção de novas proteínas e à perda de outras. Além disso, bactérias cocóides apresentam DNA cromossômico e polifosfato e suas enzimas oxidativas permanecem ativas por longos períodos; todavia apenas as formas espirais são capazes de induzir a liberação de IL-8 pelas células epiteliais (COLE et al., 1999).

Baseando-se nesses achados, estudiosos salientam que a conversão das formas espirais compreende um processo ativo e provavelmente indispensável à sobrevivência do organismo em condições adversas. Sendo assim, as formas cocóides apresentam importante papel na sobrevivência do *H. pylori* tanto após o tratamento dos pacientes infectados quanto em ambientes externos ao organismo humano (CELLINI et al., 1994; ANDERSEN et al., 2000).

1.1.2. Fatores de virulência e patogenia da infecção causada pelo *H. pylori*

O *H. pylori* é reconhecido como o principal agente etiológico da gastrite crônica, sendo intimamente associado ao desenvolvimento de úlcera péptica e, em alguns casos, do câncer gástrico (MATYSIAK-BUDNIK & MEGRAUD 1998); o organismo é considerado carcinógeno tipo I pela OMS (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH IN CANCER, 1994).

Algumas doenças extradigestivas têm sido associadas à presença do *H. pylori*. Dentre elas destacam-se: doenças dermatológicas (rosáceas, urticária crônica e alopecia areata), doenças vasculares (síndrome de Raynaud e enxaqueca), doenças auto-imunes (púrpura de Henoch-Schölein, síndrome de Sjögren e tireoidite) e até mesmo doença coronariana (ZEITUNE, *In press*).

Na infecção causada pelo *H. pylori*, tanto os fatores de virulência da bactéria quanto a resposta inflamatória do hospedeiro, contribuem para a instalação do processo infeccioso e o dano da mucosa gástrica. Nos indivíduos infectados, a inflamação local

caracteriza-se pela infiltração de neutrófilos e clones específicos de linfócitos na mucosa. Em determinados casos, a infiltração de células B e T pode induzir a formação de folículos linfóides. Além disso, estudos relatam que os níveis gástricos de citocinas pró-inflamatórias como IL1- β , IL-6, IL-8 e TNF- α estão aumentados nos indivíduos infectados (CRABTREE, 1998; LINDHOLM et al., 1998).

Vários produtos e/ou componentes microbianos como urease, fosfolipase, citotoxina vacuolizante, ilha de patogenicidade *cagA* e flagelos são considerados importantes fatores de virulência do *H. pylori* (DANIELSSON & JURSTRAND, 1998). Discorrendo sobre estes fatores, MACCHIA et al. (1993) mencionam que a produção de urease é indispensável para a colonização da mucosa gástrica, pois esta enzima hidrolisa a uréia em gás carbônico e amônia, culminando com a neutralização da acidez gástrica e a erosão da mucosa. Os autores ressaltam ainda que a urease induz à migração quimiotática de linfócitos ao sítio da infecção. Além disso, é sugerido que a atividade da enzima pode assegurar a sobrevivência do microrganismo, fornecendo uma fonte alternativa de nitrogênio à bactéria (McGOWAN, COVER, BLASER, 1996). Adicionalmente, estudos verificaram que a urease também é capaz de ativar fagócitos humanos, estimulando-os a produzir citocinas pró-inflamatórias (HARRIS et al., 1996).

Com relação aos flagelos, além de constituírem importantes estruturas antigênicas, são fundamentais para a migração das bactérias na camada de muco gástrico, onde permanecem protegidas da acidez; além disso, a forma espiralada do *H. pylori* também contribui para a sua motilidade (McGOWAN et al., 1996).

É importante ressaltar que o *H. pylori* possui adesinas tecido-específicas, além de proteínas que inibem a secreção ácida e degradam a mucina, favorecendo assim, sua colonização. (SAROSIEK, SLOMIANY, SLOMIANY, 1988; VARGAS, et al., 1991; DOIG et al., 1992; McGOWAN et al., 1996). O organismo produz ainda fosfolipases que degradam os fosfolipídeos, gerando precursores de componentes ulcerogênicos, além de outras enzimas como protease, neuraminidase, fucosidase e álcool desidrogenase, as quais contribuem para o dano epitelial, tanto pela destruição da camada de muco, quanto pela indução de peroxidação lipídica. Uma vez danificada a camada mucosa protetora, há exposição das células epiteliais à lesão acidopéptica, contribuindo assim para o processo inflamatório (FIGURA, 1997).

Outros fatores de virulência do *H. pylori* estão sendo estudados pelos pesquisadores. MACCHIA et al. (1993) verificaram que o microrganismo possui uma proteína membro da família de proteínas Hsp60, capaz de induzir resposta sorológica em 50% dos pacientes infectados; os anticorpos dirigidos contra a proteína bacteriana favorecem o aumento do dano tecidual durante a infecção, por reagirem cruzadamente com a proteína Hsp60 humana. Adicionalmente, as porinas encontradas na superfície do *H. pylori* são capazes de induzir a secreção de IL-4, INF- γ , IL-6, IL-3 e GM-CSF *in vitro*, além de reduzirem a quimioluminescência de polimorfonucleares (TUFANO et al., 1994). O *H. pylori* possui ainda um antígeno de baixo peso molecular, na faixa de 33-35K, associado ao aumento da secreção de IL-8 no corpo gástrico de pacientes infectados (YAMAOKA et al., 1998b).

Admite-se que o lipopolissacarídeo (LPS) do *H. pylori* apresenta importante papel na patogênese da infecção. A substância é capaz de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos leucócitos. Cabe ressaltar que o LPS do *H. pylori* exerce importante papel nas respostas auto-imunes da mucosa, por apresentar mimetismo molecular com os antígenos de Lewis expressos na mucosa gástrica (APPELMELK et al., 1996; SHIMOYAMA & CRABTREE, 1998). Todavia, MUOTIALA et al. (1992) relatam que o LPS do *H. pylori* apresenta fraca atividade imunológica.

O *H. pylori* também possui uma proteína ativadora de neutrófilos, que induz a produção de radicais de oxigênio por estas células (DUNDON, BERNARD, MONTECUCCO, 2001) e outra proteína, denominada proteína 1, relacionada à indução da carcinogênese *in vitro* (SUGANUMA et al., 2001).

É sabido que os indivíduos infectados pelo *H. pylori* geralmente apresentam resposta imune local e sistêmica contra os antígenos bacterianos. Entretanto, o padrão do reconhecimento antigênico é variável, pois a bactéria apresenta diferentes antígenos de superfície, o que reflete sua variabilidade genômica (NEWELL, 1987; PEREZ-PEREZ & BLASER, 1987).

Cabe, portanto, ressaltar que o polimorfismo das cepas de *H. pylori* é responsável pela variedade de padrões fenotípicos da bactéria, destacando-se entre eles a presença da proteína de alto peso molecular CagA e a citotoxina VacA. Autores relatam que as cepas de *H. pylori* portadoras de CagA e VacA estão relacionadas com a severidade do quadro patológico e a transdução de sinais nas células do hospedeiro (FIGURA et al., 1998; AUDIBERT et al., 2001; DUNDON et al., 2001; MEGRAUD, 2001).

A proteína CagA faz parte da ilha de patogenicidade cag, constituída por vários genes que codificam fatores envolvidos na indução de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias, destacando-se a IL-8 (AUDIBERT et al., 2001; DUNDON et al., 2001); a ilha é composta por aproximadamente 40 Estruturas de Leitura Aberta provavelmente originadas de outras espécies, que codificam um sistema de secreção do tipo IV utilizado para injetar CagA em vários tipos de fagócitos e nas células epiteliais (MEGRAUD, 2001; ODENBREIT et al., 2001).

A importância dos produtos dos genes da ilha de patogenicidade na produção de citocinas pelo epitélio gástrico tem sido verificada com a utilização de cepas isogênicas mutantes. Estudos revelam que a deleção do gene cagA não tem efeito sobre a secreção de IL-8; todavia, a deleção de outros genes da ilha inibe a secreção de citocinas. Sendo assim, CagA é considerada o marcador fenotípico das cepas virulentas, enquanto a produção de citocinas depende de múltiplos genes da ilha de patogenicidade (SHIMOYAMA & CRABTREE, 1998).

Segundo PEEK et al. (1995), cerca de 60 a 70% das cepas de *H. pylori* possuem e expressam o cagA, cujo produto é detectado por anticorpos séricos. A expressão deste gene *in vivo* e a presença de anticorpos contra a proteína por ele codificada, tanto nas secreções mucosas quanto no soro, é mais frequente nos pacientes que apresentam úlcera péptica do que nos indivíduos portadores de gastrite (PEEK et al., 1995; MEGRAUD, 1997).

Aproximadamente 60% das cepas de *H. pylori* isoladas de pacientes com úlcera péptica produzem VacA, relacionada com a vacuolização das células do epitélio gástrico e com a indução de apoptose nestas células. Autores sugerem que VacA altera o caminho

endocítico, culminando com a liberação de hidrolases ácidas e a redução da degradação de ligantes extracelulares e processamento antigênico (DUNDON et al., 2001; MEGRAUD 2001).

Atherton et al. (1995) descrevem que *vacA* apresenta duas regiões distintas. Uma delas localiza-se na segunda metade da sequência sinal (s1a/s1b e s2) e a outra está na região mediana do gene (m1 e m2). Estudos recentes descrevem a associação entre a diversidade neste gene e a inflamação gástrica. Verificou-se que as cepas portadoras do genótipo s1/m1 desenvolvem maior atividade de *VacA in vitro*; cepas m1 são relacionadas ao aumento do dano epitelial; cepas s1a estão relacionadas à maior infiltração de neutrófilos e linfócitos *in vivo*. Esses dados sugerem que cepas com genótipo s1a/m1 são os tipos alélicos mais virulentos (SHIMOYAMA & CRABTREE, 1998).

Os genes *iceA*, *picA* e *picB* também fazem parte da ilha de patogenicidade e são considerados importantes fatores de virulência do *H. pylori*. Pesquisas demonstraram que cepas portadoras destes genes são comumente encontradas em pacientes com úlcera péptica e estão associados ao aumento da produção de IL-8 (TUMMURU, SHARMA, BLASER, 1995; van DOORN et al. 1998; PEEK et al., 1998).

Além do papel da IL-8 na ulcerogênese, ANDO et al. (1996) descrevem que durante a infecção pela bactéria, ocorre um aumento na secreção de outras citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, promovendo assim a migração celular e a consolidação do processo inflamatório. As citocinas não só ativam neutrófilos e macrófagos, como também exercem funções regulatórias nas respostas antígeno-específicas que ocorrem no trato gastrointestinal (CRABTREE, 1998).

1.2. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO CAUSADA PELO *H. pylori*

A infecção causada pelo *H. pylori* é atualmente considerada endêmica (NABWERA & LOGAN, 1999). Admite-se que o organismo infecta cronicamente mais que a metade da população humana mundial (COVACCI et al., 1999). Estudos epidemiológicos sugerem que a contaminação pela bactéria ocorre normalmente no período da infância, dentro da própria família, com uma baixa taxa de aquisição durante a idade adulta (CAVE, 1997; LUZZA et al., 2000).

O *H. pylori* acomete todas as populações e, de modo geral, naquelas estudadas, sua prevalência aumenta na idade mais avançada (ZEITUNE, *In press*). Nos países em desenvolvimento, a bactéria afeta mais que 80% da população com idade superior a 20 anos; acredita-se que a maioria dos indivíduos adquire a infecção antes dos 10 anos de idade (OLIVEIRA et al., 1994; DUNN, COHEN, BLASER, 1997; NABWERA & LOGAN, 1999). Em algumas comunidades, aproximadamente metade das crianças com cinco anos já se encontram infectadas; essa taxa aumenta para 90% quando as crianças atingem a idade adulta (BARDHAN, 1997). De fato, um estudo comparativo entre populações pediátricas da Etiópia e Suécia demonstrou que a infecção pelo *H. pylori* é adquirida na primeira infância na Etiópia, ocorrendo mais tardiamente nas crianças suíças (LINDKVIST et al., 1996).

No Brasil, os dados confirmam que a infecção é adquirida na infância e a prevalência aumenta com a idade, havendo um baixo e contínuo risco de contaminação na população adulta. De modo geral, os estudos revelam que a prevalência da infecção é inversamente associada ao nível educacional e à renda familiar das populações estudadas (OLIVEIRA et al., 1994; SOUTO et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1999). Além disso, pesquisadores verificaram que não há diferença na prevalência da infecção entre os sexos (ROCHA et al., 1992).

Nos países desenvolvidos, a infecção está presente em 20% da população na faixa etária de 30 anos, aumentando para 50% nos indivíduos com 60 anos, sendo raramente observada nas crianças. Adultos com mais de 50 anos de idade ainda apresentam uma alta prevalência da infecção, mas indivíduos jovens apresentam baixa incidência (TAYLOR & BLASER, 1991; TELFORD et al., 1994; CAVE 1997). No Japão, assim, como nos outros países desenvolvidos, estima-se que cerca de 5 a 6% das crianças são infectadas pelo *H. pylori* (KITAGAWA et al., 2001). Na Finlândia, nota-se uma relação inversa e exponencial entre a taxa de aquisição e a idade (SIPPONEN et al., 1996).

A taxa de infecção pelo *H. pylori* tem sido associada a vários fatores como: região geográfica, condições sócio-econômicas da população, saneamento básico, raça, idade, sexo e estilo de vida dos indivíduos. Práticas sanitárias inadequadas, baixa condição social e convivência em locais com aglomeração ou alta densidade populacional, parecem

estar relacionadas ao aumento da prevalência da infecção (MURRAY et al., 1997; BROWN, 2000). Estudando a prevalência da infecção em crianças coreanas, MALATY et al. (1997) demonstraram que a taxa da infecção é inversamente proporcional às condições sócio-econômicas das famílias avaliadas.

1.2.1. Vias de transmissão

Embora o *H. pylori* tenha sido isolado do esgoto, fezes e saliva, o modo e a via de sua transmissão ainda não se encontram totalmente esclarecidos. Estudos epidemiológicos sugerem que o organismo pode ser transmitido pela via fecal-oral, oral-oral, gástrica-oral, iatrogênica, pelo uso de equipamentos endoscópicos contaminados ou ainda por vetores (CAVE 1997; LUZZA et al., 1998; COVACCI et al., 1999).

Deste modo, o estabelecimento do modo e via de transmissão é de grande importância para a implementação de medidas profiláticas adequadas ao controle da infecção, bem como para a identificação de populações de alto risco, especialmente nas áreas que apresentam altas taxas de adenocarcinoma e linfoma gástricos e úlcera péptica gastroduodenal (SASAKI et al., 1999; BROWN 2000).

1.2.1.1. Via oral-oral

O *H. pylori* é uma bactéria não invasiva que habita o estômago humano. Entretanto, a cavidade oral é considerada o seu principal reservatório extragástrico. (NABWERA & LOGAN, 1999). Inicialmente, foi relatado um caso em que uma mulher africana contaminou seus filhos com o organismo, ao oferecê-los alimentos pré-mastigados (MEGRAUD, 1995).

Pesquisadores sugerem que a colonização da boca pelo *H. pylori* pode ocorrer em indivíduos com refluxo gastro-esofágico ou pacientes que foram submetidos à endoscopia (CAVE 1997). Outros estudos detectaram o *H. pylori* na saliva e placa dentária (BANATVALA et al., 1993; FERGUSON et al. 1993; LAMBERT, CLYNE, DRUMM,

1993; NYGUEN et al., 1993; LI et al., 1996). Estudando a prevalência da infecção em indivíduos com ulceração oral, autores isolaram a bactéria da cavidade bucal de pacientes com ulceração causada pelo herpes vírus (SHIMOYAMA et al., 2000).

Verificando a prevalência do *H. pylori* na cavidade oral de 20 pacientes adultos, SONG et al. (2000) observaram que 100% dos indivíduos estudados apresentavam a bactéria, identificada através do nested PCR. O estudo demonstrou ainda que, dentre as cepas pesquisadas, seqüências do DNA divergiam em amostras orais de diferentes pacientes, bem como em diferentes locais da cavidade oral de um mesmo paciente.

Reforçando a importância da transmissão oral-oral na infecção pelo *H. pylori*, outros autores observaram uma alta prevalência da infecção em crianças quenianas de 3 a 15 anos de idade, sobretudo naquelas que compartilhavam pratos com outros membros da família durante as refeições (NABWERA et al., 2000).

1.2.1.2. Via fecal-oral

A possibilidade de transmissão do *H. pylori* pela via fecal-oral tem sido amplamente discutida. Pesquisadores relatam que esta provavelmente seja a via de transmissão mais importante (DUNN et al. 1997). De fato, THOMAS et al. (1992) isolaram a bactéria das fezes de nove entre vinte e sete crianças de 3 a 27 meses de idade no Gambia. Estudos mais recentes isolaram o organismo a partir de fezes de adultos e crianças (FOX, 1995). Entretanto, a detecção e o isolamento do *H. pylori* a partir das fezes são dificultados por vários fatores, tais como acloridria, presença de sais da bile nas fezes e no caso do PCR, presença de polissacarídeos ácidos nas amostras fecais (MONTEIRO et al., 1996; CAVE 1997).

O isolamento do *H. pylori* a partir de amostras fecais não só reforça a teoria da transmissão fecal-oral, como também salienta a importância da contaminação de alimentos e água com material fecal (FOX, 1995). Em 1996, um estudo realizado no Peru confirmou a contaminação de amostras de água pela bactéria através da PCR (HULTEN et al., 1996). Sendo assim, estudiosos ressaltam uma importante associação entre o consumo de vegetais

crus e o aumento do risco da infecção, principalmente quando se observa o uso de água provavelmente contaminada pelo esgoto no cultivo vegetal (HOPKINS et al., 1993; CAVE et al., 1997). Todavia é importante salientar que a PCR apenas indica a possibilidade de contaminação da água e alimentos pela bactéria, mas não assegura que o *H. pylori* detectado esteja na sua forma viável, apresentando potencial para transmitir a infecção.

Adicionalmente, pesquisadores confirmaram a transmissão da bactéria pela via fecal-oral empregando um modelo experimental murino para a infecção. Os autores verificaram que o *H. pylori* foi transmitido de animais inoculados para não inoculados mantidos em um mesmo ambiente durante o ensaio experimental (CELLINI et al., 1999).

1.2.1.3. Via iatrogênica

Dados epidemiológicos sugerem que a transmissão da infecção é possível quando os aparelhos de endoscopia e eletrodos de medida de pH intragástrico são esterilizados inadequadamente. Entretanto admite-se que os riscos de contaminação são mínimos quando os equipamentos são esterilizados mecanicamente (FANTRY, ZHENG, JAMES, 1995). Todavia, o contato dos endoscopistas com secreções de pacientes infectados pelo *H. pylori* é considerado um risco para a aquisição da infecção (TAYLOR & BLASER, 1991). De fato, MITCHELL, LEE, CARRICK, (1989) descrevem a alta prevalência da bactéria nos endoscopistas que não utilizavam luvas durante os procedimentos médicos.

Outros estudos realizados em países industrializados revelam o aumento do risco da infecção entre endoscopistas. Na Polônia, os profissionais da área de saúde apresentam baixa prevalência da infecção; entretanto, esta prevalência é aumentada na população de endoscopistas (MATYSIAK-BUDNIK & MEGRAUD, 1997). Pesquisadores japoneses demonstraram ainda uma alta taxa de infecção entre os dentistas (HONDA et al., 2001).

1.2.1.4. Via gástrica-oral

Vários estudos consideram a hipótese de que o *H. pylori* pode ser transmitido ainda durante a infância pela via gástrica-oral, através do vômito. Pesquisadores italianos demonstraram que os episódios de vômito entre irmãos na infância são considerados importante fator de risco para a aquisição da infecção. Os autores sugerem ainda que, na população avaliada, a transmissão do *H. pylori* entre crianças urbanas ocorre predominantemente através da via gástrica-oral (LUZZA et al., 2000). Outros estudiosos também demonstraram que o *H. pylori* pode ser cultivado a partir de amostras de vômitos e, ocasionalmente, da saliva e fezes catárticas de adultos sadios infectados (PARSONNET, SHMUELY, HAGGERTY, 1999). Adicionalmente, um caso de infecção aguda foi relatado em um pesquisador que processava rotineiramente suco gástrico (SOBALA et al., 1991). A possível transmissão gástrica oral do *H. pylori* também foi descrita após a ressucitação boca a boca de uma pessoa infectada que havia vomitado (FIGURA, 1996).

1.2.1.5. Transmissão através de vetores

Estudos recentes demonstraram o isolamento do *H. pylori* a partir de gatos domésticos, sugerindo que estes animais podem ser possíveis reservatórios da bactéria (HANDT et al., 1994; HANDT et al., 1995; ESTEVES et al., 2001; SIMPSON et al., 2001). Entretanto, os dados epidemiológicos disponíveis reforçam a hipótese de que a transmissão é realizada através do contato pessoal restrito, considerando o homem como o principal reservatório da infecção (VAIRA et al., 1998).

Moscas domésticas também têm sido relatadas como possíveis vetores para a transmissão do *H. pylori* (CAVE 1997; SASAKI et al., 1999). GRUBEL et al. (1997) acreditam que as moscas devem ser contaminadas pela bactéria pousando em fezes humanas, transportá-la e então depositar suas excretas contaminadas em alimentos ou até mesmo diretamente na mucosa oral de crianças, completando assim, o ciclo da infecção. Os autores ressaltam que essa hipótese é mais aplicada em áreas onde as condições de saneamento são precárias.

1.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO *H. pylori*

O diagnóstico laboratorial da infecção causada pelo *H. pylori* é realizado através de métodos invasivos e não-invasivos. Estes últimos incluem o teste respiratório, vários testes sorológicos para mensuração dos níveis séricos dos anticorpos IgG e IgA contra antígenos celulares da bactéria, a detecção de antígeno de *H. pylori* em fezes e outros métodos menos utilizados. Dentre os métodos invasivos, que necessitam da endoscopia digestiva alta para obtenção de biópsias gástricas, destacam-se a histologia, o teste da urease, o PCR e a cultura (ANDERSEN et al., 1997; ROCHA et al., 1998; ZEITUNE et al., 1999; VAIRA et al., 2000). A escolha do método a ser utilizado no diagnóstico da infecção dependerá, na maioria dos casos, da informação clínica, da disponibilidade dos laboratórios e do custo dos testes (DUNN et al., 1997). Entretanto, muitos profissionais têm empregado pelo menos dois métodos paralelos para assegurar o diagnóstico (WYATT & GRAY, 1992; MEGRAUD et al., 2000; VAIRA et al., 2000).

1.3.1. Métodos Invasivos

1.3.1.1. Cultura

A cultura e a histologia são consideradas “padrão-ouro” para o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* (van der HULST et al., 1996). Embora o exame histológico de amostras da mucosa gástrica seja importante não só para confirmar a presença da bactéria, como para avaliar o processo inflamatório e sua atividade, a cultura é mais específica para o diagnóstico, pois avalia tanto a morfologia quanto as características bioquímicas do organismo (ZEITUNE, *In press*).

Deste modo, o cultivo do *H. pylori* permite caracterizar detalhadamente as cepas isoladas, verificar sua susceptibilidade antimicrobiana e indicar o melhor tratamento para as cepas resistentes aos antibióticos convencionais, especialmente nos países onde há grande resistência à terapia de erradicação (MARSHALL, 1994; DUNN et al., 1997). Além disso, a cultura permite investigar os fatores requeridos para o crescimento e metabolismo do *H. pylori*, estudar as interações entre as células do hospedeiro e a bactéria e identificar seus fatores de virulência (PEREZ-PEREZ, 2000). Por esse motivo, a cultura é amplamente utilizada nos protocolos de pesquisa sobre o organismo.

O *H. pylori* é uma bactéria microaerofílica, cujas tensões de gases ideais para o seu crescimento são: O₂ a 5%, CO₂ a 10% e N₂ a 85%. A temperatura de seu cultivo é 37°C e o organismo necessita de um período de incubação de três a sete dias. (McNULTY & DENT, 1987; TOMINAGA et al., 1999). As culturas positivas são geralmente identificadas com base na morfologia das colônias, na presença de bactérias espiraladas Gram-negativas e na positividade dos testes de catalase, urease e oxidase. A adição do cloreto de trifeniltetrazólio facilita a visualização das colônias em meio de cultura sólido (QUEIROZ, MENDES, ROCHA, 1987).

Em geral, o *H. pylori* é isolado do estômago humano empregando-se meios de crescimento contendo poucos agentes seletivos (STEVENSON, LUCIA, ACUFF, 2000). Existe uma grande variedade de meios seletivos e não-seletivos disponíveis comercialmente para o isolamento da bactéria (HACHEM et al., 1995). Além disso, seu cultivo requer a suplementação do meio com fatores sanguíneos (ALBERTSON, WENNGREN, SJOSTROM, 1998).

Admite-se que a cultura apresenta alta especificidade (próxima a 100%); entretanto, a sensibilidade do método varia de 77 a 97% (CHODOS et al., 1988; van ZWET et al., 1993). Por se tratar de um organismo fastidioso, o isolamento do *H. pylori* depende de vários fatores como: condições de transporte das biópsias gástricas, seletividade do meio de cultura e manutenção da atmosfera microaerofílica. O sucesso da cultura também resulta da precisão da coleta e da quantidade de bactérias viáveis nos fragmentos de biópsia gástrica (ANDERSEN et al., 1997; SIU, LEUNG, CHENG, 1998).

Além disso, deve-se considerar ainda que alguns medicamentos como: sais de bismuto, agentes antibacterianos ou inibidores de bomba protônica interferem no crescimento do *H. pylori*. Deste modo, recomenda-se que a endoscopia seja realizada cerca de uma a duas semanas após o término do tratamento com esses fármacos (DAW et al., 1991).

1.3.1.2. Histologia

O *H. pylori* pode ser visualizado muito próximo à superfície epitelial e na camada de muco que recobre o epitélio gástrico. O organismo em geral exibe-se na forma espiralada e coloniza tanto a superfície como a região foveolar da mucosa do antro e corpo, apresentando-se em maior número no antro (WYATT & GRAY, 1992). Entretanto, o *H. pylori* é geralmente identificado nos fragmentos de biópsia corados por hematoxilina-eosina (H&E), quando existe um número considerável de bactérias; a identificação do organismo é facilitada com o emprego de colorações especiais como Warthin-Starry e Giemsa modificado (GENTA & GRAHAM, 1994; el-ZIMAITY et al., 1996).

A coloração Warthin-Starry demonstra claramente o *H. pylori* nos tecidos através da deposição de prata na superfície bacteriana. Todavia, é considerada uma técnica dispendiosa, com custo elevado, podendo apresentar artefatos que mimetizam as bactérias na mucosa gástrica (WYATT & GRAY, 1992).

GENTA, ROBASON, GRAHAM (1994) desenvolveram uma coloração bastante sensível para a identificação do *H. pylori*, baseada na combinação das técnicas de H&E, coloração pela prata e alcian blue. Embora a coloração permite avaliar simultaneamente a presença da bactéria e do infiltrado inflamatório, sua utilização pelos patologistas não é amplamente difundida (LAINE et al., 1997).

Colorações imunohistoquímicas também são empregadas na detecção do *H. pylori* quando a interpretação das colorações tintoriais é dificultada (ASHTON-KEY, DISS, ISAACSON, 1996; DUNN et al., 1997). Estudiosos produziram um anticorpo monoclonal murino para a detecção de formas cocóides e espirais da bactéria em biópsias gástricas destinadas à histologia (CAO et al., 1997).

O método da imunofluorescência indireta também é utilizado na detecção do *H. pylori* em biópsias embebidas em parafina, apresentando 93% de sensibilidade e 95% de especificidade (RIVERA et al., 1991). Adicionalmente, pesquisadores empregaram a técnica de hibridização do DNA *in situ* para detectar o organismo nos fragmentos de biópsia (van der BERG et al., 1989). RUSSMANN et al. (2001) utilizaram a hibridização *in*

situ fluorescente para o diagnóstico da infecção. Quando comparada à cultura, a técnica é mais sensível e rápida para o diagnóstico, podendo ser realizada para verificar a resistência antimicrobiana do *H. pylori*.

A sensibilidade e a especificidade do diagnóstico histológico do *H. pylori* são dependentes da habilidade e experiência do patologista. Entretanto, a histologia oferece algumas vantagens para o diagnóstico da infecção, como: facilidade de obtenção das biópsias (em geral, a endoscopia é realizada rotineiramente), baixo custo, manutenção permanente do material coletado, informações específicas sobre a relação entre a presença do *H. pylori* e a natureza da inflamação gástrica e realização de um diagnóstico retrospectivo (WYATT & GRAY, 1992).

1.3.1.3. Teste da Urease Pré-Formada

O *H. pylori* produz *in vivo* e *in vitro* grandes quantidades de urease, que converte a uréia em amônio, permitindo a neutralização do ácido gástrico (BAUERFEIND et al., 1997). Baseados na produção dessa enzima, pesquisadores desenvolveram métodos para a identificação indireta do organismo em fragmentos de biópsia gástrica.

Estudos comparando a sensibilidade e a especificidade dos testes da urease disponíveis comercialmente revelaram que todos possuem sensibilidade de 88 a 93% e especificidade de 99 a 100% (LAINE et al., 1996). Sendo assim, a escolha do teste a ser utilizado dependerá do custo, da preferência do médico responsável, da disponibilidade dos testes, entre outros fatores. (DUNN et al., 1997). Em alguns centros diagnósticos, o teste da urease é produzido através da modificação de sua fórmula inicial, descrita por McNULTY & WISE (1985), obtendo-se assim, maior sensibilidade no diagnóstico da infecção (McNULTY, 1992).

As principais vantagens da utilização do teste da urease no diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* são a facilidade de sua execução e a rapidez na obtenção do resultado. Além disso, o custo do teste é considerado muito baixo quando comparado à cultura e à histologia (McNULTY, 1992).

Entretanto, a sensibilidade do teste da urease no diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* depende da quantidade de organismos viáveis nos fragmentos de biópsia coletados. Sendo assim, a principal desvantagem do uso do teste é a sua indicação nos casos em que os pacientes utilizam antimicrobianos, sais de bismuto ou inibidores de bomba protônica. De fato, autores observaram que a sensibilidade do teste é menor após o tratamento dos pacientes (LIN et al., 1997; NISHIKAWA et al., 2000). Além disso, o resultado do teste também depende da precisão da coleta das biópsias, uma vez que a distribuição do *H. pylori* no estômago não é uniforme.

Alguns pesquisadores utilizaram o teste da urease líquido para a detecção da bactéria. Quando o resultado do teste era positivo, as biópsias eram submetidas à cultura para identificação do organismo e verificação da sua susceptibilidade antimicrobiana (JAUP, STENQUIST, BRANDBERG, 2000).

Existe ainda o teste da urease baseado na detecção da enzima por anticorpos monoclonais anti-urease em amostras de muco gástrico. Autores salientam que o teste pode ser empregado no diagnóstico da infecção em situações onde as cepas bacterianas possuem fraca atividade da enzima (SATO et al., 2000).

1.3.1.4. PCR

O PCR é um método diagnóstico para a infecção pelo *H. pylori* altamente sensível e específico. Através do PCR, diferentes genes da bactéria podem ser pesquisados, em especial aqueles pertencentes à ilha de patogenicidade *cag*. Sendo assim, o método permite não só identificar a presença da bactéria, como realizar a genotipagem das cepas estudadas, o que pode determinar relação com sua patogenicidade (GZYL et al., 1999; MONICI et al., 1999).

Vários autores desenvolveram protocolos de PCR com excelente sensibilidade e especificidade para a detecção do organismo a partir de fragmentos de biópsia frescos, congelados ou embebidos em parafina (HO et al., 1991; LAGE et al., 1995; LI et al., 1996; CHISHOLM et al., 2001). Entretanto, alguns fatores podem afetar a acurácia do método,

tais como: escolha dos primers, escolha do fragmento de DNA a ser amplificado, isolamento do DNA bacteriano, quantidade de organismos nos fragmentos e outros procedimentos relacionados ao método (DUNN et al., 1997).

É importante ressaltar que o método de PCR é utilizado principalmente em protocolos de pesquisas sobre o *H. pylori*, sendo uma importante ferramenta para o estudo das diferenças genéticas entre as cepas existentes nas diversas populações e dentro de uma mesma população.

1.3.1.5. Teste respiratório endoscópico

Alguns autores desenvolveram o teste respiratório endoscópico com [^{13}C] para o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*. Inicialmente, uma amostra de ar expirado foi coletada antes da realização da endoscopia. Durante o procedimento endoscópico, adiciona-se em toda extensão da mucosa gástrica uma solução contendo uréia marcada com [^{13}C]. Em seguida, outra amostra de ar expirado é coletada, verificando-se assim, o conteúdo de $^{13}\text{CO}_2$ exalado. Os autores descreveram que a sensibilidade e a especificidade do teste foram 98.2% e indicaram a sua utilização tanto para o diagnóstico inicial da infecção quanto para verificar a sua erradicação (SUTO et al., 1999). Os autores descrevem ainda que a adição de vermelho de fenol na solução contendo uréia marcada apresenta correlação positiva com a quantidade de bactérias viáveis na mucosa gástrica e negativa em situações de atrofia gástrica e metaplasia intestinal (SUTO et al., 2000).

1.3.2. Métodos Não-Invasivos

1.3.2.1. Sorologia

Considerando que a infecção pelo *H. pylori* induz resposta imunológica local e sistêmica contra diferentes antígenos bacterianos, o desenvolvimento de testes sorológicos para o diagnóstico da infecção se fez necessário, especialmente para serem utilizados nos estudos epidemiológicos (PEREZ-PEREZ et al., 1988).

Os testes sorológicos são geralmente utilizados em áreas onde a prevalência da infecção é alta; sendo assim, a sorologia é importante para excluir a presença da bactéria, podendo ser utilizada em conjunto com outros métodos na confirmação do diagnóstico (HO & MARSHALL, 2000).

Os anticorpos séricos anti-*H. pylori* podem ser detectados por vários ensaios sorológicos, tais como: teste de fixação de complemento, hemaglutinação, aglutinação bacteriana, imunofluorescência, ELISA, western blotting (immunoblotting) e RIPA (MARSHALL et al., 1984; KALDOR et al., 1986, NEWELL & STACEY, 1992; ROCHA et al., 1993; KALDOR et al., 1995). Dentre os ensaios descritos, a ELISA é a técnica mais utilizada no diagnóstico da infecção, pois é relativamente rápida, fácil de ser realizada e reproduzida, além de apresentar baixo custo. Todavia, o western blotting e a RIPA compreendem métodos diagnósticos mais sensíveis. (NEWELL & STACEY, 1992).

Estudos comparativos demonstraram que a sensibilidade e a especificidade da ELISA e immunoblotting são semelhantes quando comparadas à cultura e à histologia. (NEWELL & STACEY, 1992). Entretanto, o immunoblotting apresenta vantagens adicionais em relação à ELISA, pois é uma técnica mais sensível, detectando os anticorpos mesmo quando seus níveis séricos são baixos. Adicionalmente, o método permite avaliar a resposta sorológica a diferentes antígenos, incluindo *CagA* e *VacA*, além de demonstrar a presença de reação cruzada com outros anticorpos (MAEDA et al., 1997; NILSSON et al., 1997; AUCHER et al., 1998; YAMAOKA et al., 1998b); todavia, pesquisadores também verificaram a resposta sorológica à proteína *CagA* e à urease utilizando a ELISA (CAMORLINGA-PONCE et al., 1998). Contudo, o immunoblotting é um método dispendioso e caro, favorecendo o emprego da ELISA no diagnóstico sorológico da infecção (NEWELL & STACEY, 1992).

Existem vários kits disponíveis comercialmente para a detecção de anticorpos anti-*H. pylori* no soro dos pacientes infectados. Em 1996, foi realizada uma meta-análise de 11 kits baseados nas técnicas de ELISA ou aglutinação pelo látex e verificou-se que a média da sensibilidade e especificidade foi, respectivamente, 85% e 79% (LOY et al., 1996). Pesquisadores brasileiros empregaram o método de ELISA Cobas Core com sucesso no diagnóstico da infecção, obtendo especificidade de 100% e sensibilidade de 95,4% (ROCHA et al., 1998).

Utilizando o teste rápido de aglutinação em látex no diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*, WESTBLOM et al. (1992) verificaram que o método pode ser empregado como uma alternativa quando se quer rapidez na obtenção do diagnóstico não invasivo na população adulta; entretanto, o teste demonstrou-se inadequado ao diagnóstico da infecção em crianças.

Outros testes sorológicos utilizam amostras de sangue coletadas pela perfuração da ponta do dedo dos pacientes. Compreendem métodos diagnóstico mais rápidos, baratos e fáceis de usar, com a vantagem adicional de evitar a punção venosa para obtenção do sangue. Entretanto, além de apresentarem menor acurácia que os testes sorológicos tradicionais, pode haver a coleta de volume insuficiente de sangue, inviabilizando a sua utilização (COHEN et al., 1996; SADOWSKI et al., 1996).

Existem ainda métodos sorológicos que detectam anticorpo IgA no soro (CUTLER et al., 1995) e anticorpo IgG na saliva (PATEL et al., 1994; FALLONE et al., 1996; SIMOR et al., 1996) e urina (ALEMOHAMMAD, FOLEY, COHEN, 1993; MIWA et al., 1999; KATO et al., 2000; FUJISAWA et al., 2001; WU et al., 2001). KATO et al. (2000) sugerem que a utilização de amostras de urina facilita o diagnóstico da infecção pois a urina é obtida de maneira não-invasiva, sendo mais fácil de transportar e manusear do que o sangue. Entretanto, todos esses métodos ainda se encontram em estudo (DUNN et al., 1997).

Em geral, os testes sorológicos utilizados no diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* constituem métodos relativamente rápidos e simples de serem realizados, apresentando menor custo quando comparados aos métodos que requerem endoscopia para sua realização. Além disso, ao contrário do teste da urease e da cultura, cujos resultados dependem do número de bactérias viáveis nos fragmentos de biópsia, a sorologia pode ser realizada em amostras de sangue de pacientes que utilizaram sais de bismuto, inibidores de bomba protônica ou antibióticos (DUNN et al., 1997).

Outra vantagem é que os testes sorológicos podem ser positivos nos indivíduos com atrofia gástrica, onde a quantidade de organismos é muito pequena, chegando a ser indetectável através das biópsias ou do teste respiratório (KARNES et al., 1991). Todavia, a

principal desvantagem da utilização da sorologia no diagnóstico da infecção reside no fato de que os níveis sorológicos de IgG tendem a persistir por vários meses após a erradicação do *H. pylori*, podendo fornecer resultados falso-positivos (DUNN et al., 1997).

Entretanto, a confiabilidade dos resultados obtidos na sorologia é discutível. Em geral, os testes sorológicos apresentam variação nos valores de sensibilidade e especificidade, o que tem limitado seu uso. Cabe considerar ainda que existem vários kits sorológicos disponíveis comercialmente e os testes realizados com um mesmo kit em diferentes populações apresentam, com frequência, resultados discordantes (MONICI et al., 1999).

1.3.2.2. Teste respiratório

O diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* empregando o teste respiratório baseia-se na propriedade que a bactéria apresenta em produzir urease. Durante o teste, o paciente ingere uréia marcada com [^{13}C] ou [^{14}C]. Se houver colonização gástrica pelo organismo, a uréia será metabolizada pela urease bacteriana, resultando na eliminação de certa quantidade de carbono marcado no CO_2 expirado. O isótopo [^{14}C] é detectado através de um contador de cintilação, enquanto o isótopo [^{13}C] é detectado pelo espectrofotômetro de massa ou outros métodos analíticos (KOLETZKO et al., 1995; SCHUMAN et al., 1995).

Em geral, a escolha pelo teste respiratório a ser utilizado (^{13}C ou ^{14}C) dependerá da disponibilidade dos testes, do custo e dos procedimentos utilizados, considerando que a sensibilidade e a especificidade de ambos os testes é semelhante (BROOKES et al., 1990). Contudo, o teste respiratório com [^{13}C] tem a vantagem de empregar um isótopo de carbono não radioativo. Sendo assim, recomenda-se que o teste respiratório com [^{14}C] não seja utilizado por crianças ou gestantes (BELL & WEIL, 1992; DUNN et al., 1997). Por outro lado, o $^{13}\text{CO}_2$ expirado pelos pacientes requer o uso de um espectrômetro de massa para sua mensuração, aparelho com maior custo quando comparado ao contador de cintilação beta (BELL & WEIL, 1992).

O teste respiratório é utilizado no diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* quando não há indicação para o exame endoscópico. Sendo assim, o teste é particularmente empregado na verificação da eficácia do tratamento e nos estudos de follow-up após a erradicação da infecção (BELL & WEIL, 1992; LOGAN, 1992). De fato, YOSHIMURA et al. (2001) empregaram o teste respiratório com [^{13}C], obtendo resultados satisfatórios na detecção da infecção, na verificação da eficácia do tratamento e na avaliação follow-up dos pacientes pós-tratamento, em uma população pediátrica.

Comparando a acurácia do teste respiratório com [^{13}C] e da sorologia no diagnóstico da infecção em crianças, estudiosos verificaram que o teste mostrou-se mais sensível na detecção da bactéria nos pacientes com menos de dez anos de idade; sendo assim, a sorologia apresentou maior quantidade de resultados falso-negativos, sobretudo nas crianças com menos de cinco anos de idade (CORVAGLIA et al., 1999).

1.3.2.3. PCR

Alguns pesquisadores utilizaram o PCR no diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* em amostras de fluidos não gástricos, como a saliva (LI et al., 1996; PARSONNET et al., 1999). Esse método apresenta vantagens adicionais por ser altamente específico e ao mesmo tempo, não-invasivo. LI et al. (1996) demonstraram que a sensibilidade da detecção do organismo na saliva foi 84%. Por observarem que a saliva de alguns indivíduos era positiva, mesmo na ausência de bactérias detectáveis no estômago, os autores sugerem que a cavidade oral provavelmente seja o sítio inicial da infecção.

Em outros estudos, a detecção do *H. pylori* em material fecal também foi realizada pelo PCR. As substâncias que inibiam a realização do método presentes nas fezes foram removidas empregando-se diferentes técnicas como: filtração em membrana de polipropileno, separação bioquímica por cromatografia e isolamento do *H. pylori* através de esferas imunomagnéticas, obtendo-se assim, resultados com alta sensibilidade e especificidade (KABIR, 2001).

1.3.2.4. Pesquisa de antígenos de *H. pylori* em fezes

Mais recentemente, um estudo multicêntrico europeu realizou o diagnóstico da infecção através da pesquisa de antígeno de *H. pylori* em fezes (HpSA) (VAIRA et al., 1999). Os dados obtidos revelaram que o método apresentou sensibilidade e especificidade satisfatórias (94,1% e 91,8%, respectivamente), além de demonstrar bons resultados nas amostras de pacientes submetidos a um curto período de tratamento (4 semanas). Contrariando esses achados, outros autores demonstraram que, apesar do HpSA constituir um método não-invasivo adequado para o diagnóstico primário do *H. pylori*, o método necessita de um longo período de follow-up para alcançar a confiabilidade do diagnóstico oferecido pelo teste respiratório (FORNE et al., 2000; COSTA et al., 2001; MANES et al., 2001).

Posteriormente, outros estudos empregaram a pesquisa de antígeno de *H. pylori* nas fezes com sucesso no diagnóstico da infecção, tanto na população adulta quanto pediátrica (FANTY et al., 1999; PUSPOK, BAKOS, OBERHUBER, 1999; METZ, 2000; NI et al., 2000; ZEITUNE et al., 2000; van DOORN et al., 2001; KONSTANTOPOULOS et al., 2001).

Por constituir um método de fácil realização e custo reduzido quando comparado ao teste respiratório, o HpSA é considerado uma técnica promissora para os estudos epidemiológicos, o diagnóstico da infecção após o tratamento e em especial, para a identificação do *H. pylori* na população pediátrica.

1.3.2.5. Outros métodos

Estudiosos desenvolveram um método diagnóstico para a infecção pelo *H. pylori* baseado na mensuração de bicarbonato marcado no soro de pacientes após a ingestão de [¹³C] (MOULTON-BARRET et al., 1993). De maneira semelhante, a mensuração do [¹⁴C] na urina também foi utilizada no diagnóstico da infecção (PATHAK et al., 1994). Os níveis de [¹⁵N]amônia na urina de indivíduos infectados e não infectados pelo organismo também foram mensurados e utilizados na detecção da infecção (WU et al., 1992).

Entretanto, nenhum desses métodos encontra-se totalmente padronizado e não fornecem vantagens significantes em relação aos procedimentos rotineiramente empregados no diagnóstico da infecção (DUNN et al., 1997).

1.4. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA A INFECÇÃO PELO *H. pylori*

O *H. pylori* já foi isolado do trato gastrointestinal de diferentes espécies de macacos, gatos, porcos e furões, sugerindo que estes animais são naturalmente suscetíveis à infecção experimental com a bactéria (KRAKOWKA et al., 1987; LAMBERT et al., 1987; DUBOIS et al., 1994). Adicionalmente, outras espécies de *Helicobacter* foram isoladas do estômago de vários mamíferos, incluindo cão, gato, furão, porco, macaco e leopardo; todos esses animais apresentavam gastrite (FOX, 1997). Duas dessas espécies (*H. cinaedi* e *H. fennelliae*) estão relacionadas ao desenvolvimento de proctite e colite em indivíduos imunocomprometidos (FOX & LEE, 1997).

Durante a última década, outras espécies de *Helicobacter* foram cultivadas de fragmentos de mucosa gástrica humana, além de amostras fecais, biópsias hepáticas e conteúdo da vesícula biliar. Espécies intestinais de *Helicobacter* como: *H. cinaedi*, *H. fennelliae*, *H. cinaedi*, *H. westmeadii* e *H. rappini* foram isoladas de indivíduos com septicemia. As espécies de *Helicobacter* diferentes do *H. pylori* são geralmente difíceis de cultivar e podem estar frequentemente associadas com o desenvolvimento das doenças humanas (ANDERSEN, 2001).

Os primeiros estudos envolvendo a infecção experimental pelo *H. pylori* não forneceram resultados satisfatórios, sendo que os postulados de Koch foram concretizados em dois voluntários humanos. Estes indivíduos haviam ingerido a bactéria e dentro de poucos dias apresentaram sintomas de gastrite aguda; em um deles, a infecção crônica foi estabelecida (MARSHALL et al., 1984; MORRIS & NICHOLSON, 1987).

Estudos posteriores empregaram modelos animais não convencionais como porcos gnotobióticos, furões e primatas não humanos infectados por via oral. Apesar destes modelos terem possibilitado o desenvolvimento de gastrite histologicamente semelhante às

lesões humanas, a manutenção desses animais em cativeiro é dispendiosa, pois exige alto custo técnico e dificulta a avaliação macroscópica das lesões induzidas (KRAKOWKA et al., 1987; BASKERVILLE & NEWEL, 1988; BRONDSOON & SCHOENKNECHT, 1988; FOX et al., 1990; DUBOIS et al., 1991).

Tendo em vista essas dificuldades, pesquisadores têm se empenhado em estabelecer modelos para a infecção pelo *H. pylori* utilizando pequenos roedores, particularmente o camundongo, considerando o baixo custo desses animais e a facilidade de sua manutenção e manipulação (RABELO-GONÇALVES, NISHIMURA, ZEITUNE, 2000). O desenvolvimento de modelos adequados ao estudo da infecção induzida pelo *H. pylori* é importante não apenas para esclarecer os mecanismos patogênicos da infecção humana, como para a produção de vacinas e fármacos utilizados respectivamente na profilaxia e tratamento das doenças humanas.

1.4.1. Porco

O *H. pylori* é incapaz de colonizar a mucosa gástrica de porcos convencionais, devido à inibição ou competição exercida pela flora bacteriana normal do trato gastrointestinal suíno. Deste modo, os estudos da infecção experimental com *H. pylori* em porcos utilizam animais gnotobióticos (CANTORNA & BALISH, 1989).

Em geral, os animais infectados exibem gastrite progressiva caracterizada pela presença de folículos linfóides e bactérias na camada de muco. O padrão histológico das lesões induzidas em leitões gnotobióticos é semelhante ao padrão observado nas lesões humanas (LAMBERT et al., 1987; KODAMA et al., 1996). Alguns animais inoculados desenvolvem úlcera gástrica (KRAKOWKA et al., 1996).

Segundo EATON et al. (1991), a inoculação de cepas de *H. pylori* deficientes na produção de urease induz o desenvolvimento de gastrite linfocítica na maioria dos leitões infectados, embora seja impossível recuperar as bactérias dos fragmentos de mucosa gástrica (EATON et al., 1991). A colonização por cepas deficientes na produção de urease é confirmada quando da sua inoculação em explantes do epitélio gástrico de leitões *ex vivo* (EATON & KRAKOWKA, 1995). Contudo, animais inoculados com a forma cocóide do *H. pylori* não desenvolvem gastrite (EATON, CATRENICH, MAKIN, 1995).

Os leitões gnotobióticos também são utilizados em outros estudos sobre a colonização do *H. pylori* na mucosa gástrica (ENGSTRAND et al., 1992; RUDMANN, EATON, KRAKOWKA, 2000), na verificação do papel da citotoxina e outros fatores de virulência na ontogênese das lesões (EATON et al., 1991; EATON, MORGAN, KRAKOWKA, 1992; EATON et al., 1996b; EATON et al., 1997; EATON, MEFFORD, THEVENOT, 2001a), na avaliação de terapias para a cura da infecção (KRAKOWKA, EATON, LEUNK, 1998), na produção de vacinas (EATON, RINGLER, KRAKOWKA, 1998) e no estudo da imunidade à infecção pela bactéria (KRAKOWKA et al., 1996).

É sugerido que os porcos são reservatórios naturais de outras espécies de *Helicobacter*, particularmente o *H. heilmanni* (SVEC et al., 2000). Recentemente, pesquisadores isolaram o microrganismo de animais com lesões esofágicas, ressaltando a importância desta espécie na patogênese das lesões (QUEIROZ et al., 1996).

1.4.2. Macaco

O *H. pylori* já foi isolado da mucosa gástrica de várias espécies de macacos (GHIARA et al., 1995; HANDT et al., 1997). Em geral, os animais colonizados apresentam gastrite crônica, caracterizada por intensa infiltração da mucosa e lâmina própria por linfócitos, plasmócitos e macrófagos; alguns animais desenvolvem até mesmo folículos linfóides.

Posteriormente, estudos utilizaram diferentes espécies de macaco como modelo de primata não-humano para o estudo da infecção pelo *H. pylori*, obtendo resultados semelhantes à patologia humana (EULER et al., 1990; DUBOIS, FIALA, WEICHBROD, 1995; DUBOIS et al., 1996; HANDT et al., 1997; STADTLANDER et al., 1998; DUBOIS et al., 1999; REINDEL et al., 1999; SOLNICK et al., 1999; HARRIS et al., 2000; MATTAPALLIL et al., 2000; MATZ-RENSING et al., 2001). Em dois desses estudos, os autores verificaram que os animais são infectados com sucesso quando são utilizadas cepas de *H. pylori* obtidas de outros macacos (DUBOIS et al., 1991; DUBOIS et al., 1996). Outros autores observaram ainda que, durante a fase aguda da infecção, a resposta imunológica do macaco rhesus (*Macaca mulatta*) é predominantemente do tipo Th1 (MATTAPALLIL et al., 2000).

Outros trabalhos empregaram testes sorológicos para o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* nos macacos (DUBOIS et al., 1995; HANDT et al., 1997). Pesquisadores japoneses utilizaram o macaco rhesus para avaliar o papel da bactéria no retardo da cicatrização de úlceras pré-induzidas (KODAMA et al., 1996; OKUI et al., 1998). Além disso, os macacos são empregados na verificação de terapias para a cura da infecção (DUBOIS et al., 1998a; MYSORE et al., 1999) e nos estudos para a produção de vacinas contra o *H. pylori* (STADTLANDER et al., 1996; DUBOIS et al., 1998a; LEE et al., 1999a; LEE et al., 1999b; LEE, 2001).

Cabe ainda salientar que outras espécies de *Helicobacter* foram isoladas dos macacos (FOX et al., 2001a; FOX et al., 2001b). Dentre elas, *H. cinaedi* foi identificado em amostras do cólon, fígado e linfonodos mesentéricos de macacos rhesus com diarreia crônica (FOX et al., 1995b). Estudiosos também verificaram que outras bactérias como *Ochrobactrum anthropi*, *Aeromonas salmonicida* e *Pseudomonas vesiculares* foram isoladas de macacos-esquilo (*Saimiri* spp) portadores de gastrite (KHANOLKAR-GAINTONDE et al., 2000).

1.4.3. Cão

O *H. pylori* não foi isolado da mucosa gástrica de cães. Entretanto, outras espécies de *Helicobacter*, entre elas *H. canis*, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* e *H. bilis* podem colonizar o estômago desses animais (EATON et al., 1996a; HAPPONEN et al., 1998; CATOLLI et al., 1999; STRAUSS-AYALI, SIMPSOM, SCHEIN, 1999). Além disso, organismos pertencentes ao gênero *Campylobacter* foram cultivados de amostras fecais de cães saudáveis e com diarreia (BURNENS et al., 1993).

Os modelos de infecção experimental com *H. pylori* em cães foram realizados em animais gnotobióticos da raça Beagle, inoculados com suspensão concentrada da bactéria. Os achados histopatológicos demonstraram que as lesões obtidas foram semelhantes às lesões humanas, sendo inclusive visualizadas macroscopicamente. Os animais permaneceram colonizados por pelo menos um mês e os autores constataram que o *H. pylori* foi transmitido de animais infectados para não-infectados (RADIN et al., 1990).

Outros pesquisadores empregaram uma cepa de *H. pylori* adaptada ao camundongo, observando que os cães apresentaram sintomas agudos da infecção humana. Na fase crônica da infecção, os animais exibiram gastrite, alterações epiteliais e linfoma MALT (ROSSI et al., 1999). Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que os cães Beagle são animais suscetíveis à infecção induzida pelo *H. pylori*.

Os cães também foram utilizados como modelo para estudo da população de linfócitos durante a infecção. Os autores demonstraram que, nos estágios iniciais da infecção, os neutrófilos foram as células predominantes no infiltrado inflamatório. Posteriormente, na fase crônica, as células mononucleares predominaram e tenderam a se organizar em folículos linfóides. Além disso, a expressão de IL-8 durante a infecção foi concomitante ao afluxo neutrofílico, enquanto a expressão de IL-6 tendeu a persistir cronicamente (ROSSI et al., 2000).

Modelos experimentais utilizando células G isoladas do estômago canino foram realizados para verificar o efeito dos produtos do *H. pylori* e citocinas na liberação de gastrina (BEALES et al., 1996; BEALES et al., 1997; LEHMANN et al., 1999).

Os cães também foram empregados para avaliar esquemas terapêuticos usados na erradicação de espécies de *Helicobacter* caninas (HAPPONEN, LINDEN, WESTMARCK, 2000) e na verificação da eficácia do teste respiratório para a detecção de espécies gástricas de *Helicobacter* (CORNETTA et al., 1998).

1.4.4. Gato

Recentemente, vários estudos demonstraram a presença do *H. pylori* no estômago de gatos naturalmente infectados pela bactéria (HANDT et al., 1994; HANDT et al., 1995; ESTEVES et al., 2001; SIMPSON et al., 2001). Estes estudos apresentam grande implicação na saúde pública, sugerindo que os gatos podem ser possíveis reservatórios do *H. pylori*. Além disso, demonstram que o gato é uma espécie suscetível à colonização pelo organismo.

Baseando-se nesses achados, pesquisadores realizaram a infecção experimental de gatos com isolados clínicos de *H. pylori*, obtendo resultados que reproduzem várias características da infecção humana (FOX, 1995a; FOX et al., 1996; PERKINS et al., 1998).

Cabe ressaltar ainda que outras espécies de *Helicobacter*, tais como *H. felis* e *H. heilmannii*, são isoladas com maior frequência da mucosa gástrica desses animais (el-ZAATARI et al., 1997; NEIGER et al., 1998; STRAUSS-AYALI et al., 2001). Animais sadios e com diarreia podem ainda ser colonizados com *H. canis* (FOLEY et al., 1999); pesquisadores também relataram a coinfeção de gatos com espécies de *Helicobacter* e *Campylobacter* (SHEN et al., 2001).

1.4.5. Roedores

1.4.5.1. Rato

Os modelos de infecção experimental com *H. pylori* em rato foram inicialmente estabelecidos em animais previamente ulcerados pela inoculação de ácido acético no estômago. Nestes animais, a inoculação oral de *H. pylori* resultou no retardo da cicatrização das lesões pré-formadas. Todavia, a infecção de animais não-ulcerados foi incapaz de induzir a formação de lesões gástricas (ROSS et al., 1992; LI et al., 1998). Posteriormente, novos estudos foram realizados utilizando extratos aquosos das culturas de *H. pylori*; os resultados revelaram que, nos animais previamente ulcerados, a administração dos extratos ocasionou o retardo da cicatrização das lesões (BRZOZWSKI et al., 1999; WATANABE et al., 1999; MINE et al., 2000); em um desses estudos, os autores constataram o aumento na proliferação e apoptose das células epiteliais (MINE et al., 2000).

Os extratos contendo produtos do *H. pylori* também foram utilizados para verificar o papel da infecção na microcirculação da mucosa gástrica (ATUMA, ENGSTRAND, HOLM, 1999; KALIA et al., 2000), na redução da produção de histamina em ratos (KONTUREK et al., 2000a) e na avaliação da secreção duodenal alcalina em animais anestesiados (FANDRIKS et al., 1997).

Culturas de células epiteliais do trato gastrointestinal de ratos foram realizadas para avaliar o papel do *H. pylori* na secreção de pepsinogênio (JIANG et al., 2001) e o papel citotóxico do LPS às células epiteliais (LAMARQUE et al., 2000).

Os ratos também foram empregados na verificação do papel da NO-sintase na ontogênese das lesões induzidas pelo *H. pylori* no epitélio duodenal (LAMARQUE et al., 1998), no estudo do retardo do esvaziamento gástrico induzido pela inoculação de LPS (OKUMURA et al., 1998), no estudo do papel do LPS na microcirculação gastrointestinal (KISS et al., 2000), em outros estudos sobre a microcirculação *in vivo* (KHALIA et al., 2000) e nas pesquisas sobre o desenvolvimento de esquemas terapêuticos e drogas para a cura da infecção (ISHIKAWA et al., 1999; SLOMIANY, PIOTROWSKI, SLOMIANY, 2000).

1.4.5.2. Cobaio

Os cobaios foram utilizados com sucesso no estudo da carcinogênese induzida pela inoculação experimental de *H. pylori*. Por não produzirem a enzima gulonolactona oxidase, esses animais são incapazes de sintetizar vitamina C, um importante antioxidante (SHOMER et al., 1998b).

Animais infectados com *H. pylori* desenvolvem gastrite no antro; as lesões caracterizam-se por infiltrado inflamatório contendo polimorfonucleares e linfócitos, que promovem a erosão do epitélio gástrico (STUREGARD et al., 1998). Alguns animais inoculados exibem o tecido linfóide associado à mucosa (MALT), sendo as estruturas foliculares semelhantes à gastrite crônica humana. Por esse motivo, os autores sugerem que a perda da gulonolactona oxidase nos cobaios pode estar relacionada à formação do tecido linfóide nesses animais, favorecendo assim, sua utilização no estudo da carcinogênese experimental induzida pelo *H. pylori* (SHOMER et al., 1998b).

Estudos realizados *in vitro* com células gástricas isoladas do cobaio demonstram que o LPS do *H. pylori* induz apoptose nestas células e estimula a síntese de pepsinogênio (YOUNG et al., 1992; KAWAHARA et al., 2001). Além disso, as células gástricas isoladas são utilizadas na verificação do papel das citocinas na infecção (TANI et al., 1999) e da citotoxina do *H. pylori* na secreção ácida (KOBAYASHI et al., 1996).

Um estudo comparativo utilizando cobaios e camundongos inoculados com *H. pylori* demonstrou que tanto a resposta sorológica quanto a indução de gastrite foram significativamente mais pronunciadas nos cobaios. Além disso, os níveis séricos da proteína C3 exibiram-se elevados nestes animais, indicando a presença de uma resposta inflamatória sistêmica (SJUNNESSON et al., 2001).

1.4.5.3. Gerbil

A inoculação experimental do gerbil Mongoliano com cepas humanas de *H. pylori* tem demonstrado resultados promissores para o estudo da infecção induzida pela bactéria. Em geral, todos os animais inoculados exibem gastrite severa na mucosa antral; alguns desenvolvem úlcera gástrica (MATSUMOTO et al., 1997; SAWADA et al., 1998; WATANABE et al., 1998; KETO et al., 1999; MIYATA et al., 1999; TAKAHASHI, OKABE, 1999). Além disso, estudiosos obtiveram resultados satisfatórios quanto à carcinogênese experimental induzida pela inoculação do *H. pylori* nestes animais (WATANABE et al., 1998; IKENO et al., 1999; SHIMIZU et al., 1999a; SHIMIZU et al., 1999b). Estudos verificando a influência da infecção em lesões cancerígenas previamente induzidas também foram realizados (SUGIYAMA et al., 1998; TATEMATSU et al., 1998; SHIMIZU et al., 1999a; TOKIEDA et al., 1999; MARUTA et al., 2000; SHIMIZU et al., 2000; KATAOKA et al., 2001; MARUTA et al., 2001).

Considerando o sucesso no estabelecimento da infecção experimental pelo *H. pylori* no gerbil, pesquisadores têm empregado este modelo animal no estudo de esquemas terapêuticos e drogas desenvolvidas para a cura da infecção (KUSUHARA et al., 1998; STUREGARD et al., 1998; SUZUKI et al., 1998; IKENO et al., 1999; KETO et al., 1999; MABE et al., 1999; KATAOKA et al., 2001; TAKAHASHI et al., 2001). Os modelos induzidos no gerbil permitiram verificar ainda as alterações epiteliais e da secreção de gastrina nos animais infectados pela bactéria (PEEK et al., 2000; TAKASHIMA et al., 2001). Além disso, o gerbil é amplamente utilizado em estudos que visam compreender os mecanismos patogênicos da infecção, salientando os eventos imunológicos e inflamatórios que modulam o seu desenvolvimento (IGUCHI, SHIOTANI, NISHIOKA, 2000; MATSUI et al., 2000; OGURA et al., 2000; TAKAHASHI, FUJITA, YAMAMOTO, 2000; KUMAGAI et al., 2001; OSAWA et al., 2001).

Acredita-se que o gerbil mongoliano é uma espécie suscetível à colonização pelo *H. pylori*, devido à presença de células CTMC no jejuno desses animais. Estas células são responsáveis pela regulação da resposta imune contra parasitas no trato gastrointestinal. Os ratos e os camundongos apresentam células MMC no intestino, que realizam papel semelhante. Entretanto, é sugerido que as CTMC são menos efetivas que as MMC na eliminação dos parasitas, favorecendo assim, a multiplicação bacteriana e o estabelecimento das lesões no gerbil. Adicionalmente, estudiosos sugerem que outros fatores, como produção de citocinas ou moléculas de adesão também podem estar envolvidos na ontogênese das lesões gástricas induzidas pelo *H. pylori* nestes animais (MATSUMOTO et al., 1997; WATANABE et al., 1999).

Na tentativa de verificar a importância de fatores do hospedeiro na colonização pelo *H. pylori*, OSAWA et al. (2001) infectaram gerbils e camundongos com a bactéria. Os resultados revelaram que o estômago do gerbil apresenta maior quantidade de receptores de adesão para a bactéria, quando comparado ao estômago do camundongo, explicando assim, o maior número de organismos isolados no gerbil.

Apesar de ser considerado um modelo experimental adequado ao estudo da infecção induzida pelo *H. pylori*, o gerbil ainda é pouco utilizado pelos pesquisadores (RABELO-GONÇALVES et al., 2000). Entretanto, por apresentar maior sobrevida que os camundongos e possuir maior quantidade de tecido gástrico disponível para os estudos histopatológicos, compreende um modelo animal com vantagens adicionais ao estudo da infecção induzida pelo *H. pylori* (WIRTH et al., 1998).

Cabe ainda ressaltar que pesquisadores isolaram colônias de *H. hepaticus* de gerbil mantidos em laboratório (GOTO et al., 2000).

1.4.5.4. Camundongo

O camundongo é a espécie de animal de laboratório mais utilizada nos estudos sobre a infecção experimental induzida pelo *H. pylori*. Trata-se de um animal de fácil manutenção, manipulação e baixo custo, que quando inoculado, reproduz muitas características da infecção humana (RABELO-GONÇALVES et al., 2000).

O primeiro estudo sobre a infecção experimental pelo *H. pylori* em camundongos foi estabelecido com sucesso em 1991. Os autores infectaram animais da linhagem BALB/c atímicos (nude) e eutímicos com cepas de *H. pylori* isoladas de pacientes. Os resultados revelaram que, embora a colonização foi mais persistente nos animais atímicos, todos os animais inoculados com cepas frescas desenvolveram gastrite e duodenite (KARITA et al., 1991).

Posteriormente, pesquisadores empregaram outras linhagens de camundongo no estudo da infecção. Dentre elas, a linhagem C57Bl/6 demonstrou-se bastante suscetível à inoculação oral tanto de *H. pylori* quanto de *H. felis*; nestes animais, a colonização é mais persistente e alguns camundongos desenvolvem gastrite atrófica (KIM et al., 2001; FOX et al., 2000; SAKAGAMI et al., 1998).

O camundongo tem sido amplamente utilizado nos estudos sobre a imunidade da infecção pelo *H. pylori* (AEBISCHER et al., 2001; BURICH et al., 2001; CHEN, SHU, CHADWICK, 2001; EATON & MEFFORD, 2001; EATON et al., 2001b; EATON et al., 2001c; SOMMER et al., 2001; SURESH et al., 2001; CHEN, SHU, CHADWICK, 1999; MOHAMMADI et al., 1996).

Outros pesquisadores utilizaram o camundongo para verificar o papel da citotoxina e do *cagA* do *H. pylori* na ontogênese das lesões gástricas (SALAMA et al., 2001; STUREGARD et al., 2001; KAMRADT et al., 2000; SHEU et al., 1999; GHIARA et al., 1995; TELFORD et al., 1994). Além disso, os camundongos foram empregados na produção de vacinas anti-*H. pylori* (CORTHÉSY-THEULAZ et al., 1995; MARCHETTI et al., 1995; GUY et al., 1999; RUIZ-BUSTOS et al., 2000; SUTTON, WILSON, LEE, 2000; TODOROKI et al., 2000; WELTZIN et al., 2000; LEE et al., 2001; RADCLIFF & FERRERO, 2001; SANCHEZ et al., 2001), na avaliação de terapias e drogas para a sua erradicação (KARITA, LI, OKITA, 1993; MAKINO et al., 1998; YOSHIDA et al., 1999; DIAL et al., 2000; JENKS et al., 2000; WANG et al., 2000b; WANG et al., 2001), na verificação da patogenicidade das formas cocóides da bactéria (CELLINI et al., 1994; WANG et al., 1997) e em estudos sobre o papel protetor dos lactobacilos na infecção induzida pelo *H. pylori* (KARITA et al., 1994; KABIR et al., 1997).

Dentre outras espécies, o *Helicobacter bilis* é um patógeno que está associado à hepatite e distúrbios intestinais em algumas linhagens de camundongo (FOX et al., 1995; RILEY et al., 1996; HAINES et al., 1998; SHOMER et al., 1998a; WHARY et al., 2000; GE, DOIG, FOX, 2001a). Animais portadores de *H. bilis* podem estar coinfetados com *H. rodentium* e apresentar diarreia (SHOMER et al., 1998b). Os camundongos podem ser colonizados ainda com *H. hepaticus*, *H. rodentium*, *H. typhonicus* e *H. trogontum* (SHEN et al., 1997; MOURA et al., 1998; FRANKLIN et al., 1999; WHARY et al., 2000; GE et al., 2001b).



2. OBJETIVOS

Foram objetivos do presente estudo:

- Estabelecer a infecção experimental de camundongos BALB/c com uma cepa patogênica (*cagA*⁺ e *vacA*⁺) de *H. pylori*;
- Realizar a inoculação da cepa em dois grupos de animais, sendo um deles infectado com a cepa fresca e o outro, inoculado com a mesma cepa estocada a -80°C por 30 dias;
- Avaliar histologicamente a intensidade e a natureza do infiltrado inflamatório induzido pela inoculação da cepa nos dois grupos, considerando o período de evolução da infecção.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DA CEPA BACTERIANA

3.1.1. Coleta dos fragmentos de mucosa gástrica para a cultura: durante a endoscopia digestiva alta realizada no Centro de Diagnóstico de Doenças do Aparelho Digestivo da Universidade Estadual de Campinas (Gastrocentro-UNICAMP), foram coletados três fragmentos antrais de um paciente do sexo masculino, portador de múltiplas úlceras gástricas. Os fragmentos foram adicionados em solução de BHI acrescido de glicerol a 15% (KITSOS & STADTLANDER, 1998) e mantidos em banho de gelo, até serem processados para a cultura. Outras biópsias adicionais, sendo duas do antro e duas do corpo, também foram coletadas do mesmo paciente e submetidas aos processos rotineiros para inclusão em parafina e coloração hematoxilina-eosina, visando análise histopatológica posterior.

3.1.2. Análise dos fragmentos de mucosa gástrica destinados à histopatologia: o exame histopatológico dos fragmentos de biópsia coletados demonstrou gastrite crônica moderada (borda de úlcera péptica crônica) associada à infecção pelo *H. pylori*.

3.1.3. Teste da urease pré-formada: outro fragmento antral do mesmo paciente foi coletado e introduzido em um frasco contendo meio de Christensen modificado. Em seguida, foi incubado a 37°C por 24 horas, quando foi realizada a leitura da reação. A mudança de cor do meio de âmbar para rosa confirmou a presença de uma cepa de *H. pylori* urease positiva.

3.1.4. Cultura: os fragmentos antrais em meio BHI e mantidos em banho de gelo foram homogeneizados e inoculados em meio Belo Horizonte modificado (BHMm) (QUEIROZ, MENDES, ROCHA, 1987 - com modificações). Este meio é composto por ágar-infusão de cérebro-coração (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), suplementado com hemáceas desfibrinadas de carneiro a

10%, 10mg/l de vancomicina, 5mg/l de lactato de trimetoprima, 2500UI/l de polimixina B (Skirrow's supplement, Oxoid, Basingstoke, France), 2mg/l de anfotericina B e 40mg/ml de cloreto trifeniltetrazólio. As placas foram incubadas em atmosfera de microaerofilia, obtida com o emprego de Microaerobac (Probac, São Paulo, SP, Brasil) e mantidas a 37°C, durante cinco dias. As placas geradoras de microaerofilia foram trocadas a cada 2 dias.

3.2. PREPARO DA SUSPENSÃO DE INÓCULO

3.2.1. Extração do DNA genômico do *H. pylori*: o DNA genômico da cepa de *H. pylori* empregada neste estudo foi extraído a partir de amostras das colônias obtidas em meio BHMm. As amostras foram coletadas com alça estéril e homogeneizadas em tampão TE. A extração foi realizada segundo a metodologia descrita por ZHU, QU, ZHU (1993), que utiliza o cloreto de benzila para obtenção do material genômico.

3.2.2. PCR para a amplificação dos genes *cagA*, *vacA* e *ureA*: a amplificação dos genes *cagA*, *vacA* e *ureA* da cepa de *H. pylori* isolada neste estudo foi realizada segundo a metodologia descrita por ATHERTON et al. (1995). O PCR foi realizado com 2µl da amostra contendo o DNA genômico da cepa em estudo e 2µl de cada par de primer. Para amplificação do gene *cagA* foram empregados os primers: CAG-1(S): 5'-gataacaggcaagcttttgagg-3'(22) e CAG-2(A): 5'-ctgcaaaagattgtttggcaga-3' (22). Para amplificação do gene *vacA* foram utilizados os primers: VAC-1(S): 5'-atggaaatacaacaaacaca-3'(20) e VAC-2(A): 5'-ctccagaacccacacgatt-3'(19). Para amplificação do gene *ureA* foram utilizados os primers: URA-1(S): 5'-gccaatggttaaattagtt-3'(18) e URA-2(A): 5'-ctccttaattgtttttac-3' (18). A amostra e os primers foram adicionados em tubos especiais para PCR contendo esfera constituída por enzima taq polimerase e deoxinucleotídeos (Ready to go, PCR Beads, Pharmacia Biotech), sendo o

volume final obtido 24µl. A amplificação foi realizada em um termociclador com desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Em seguida, o produto da amplificação permaneceu a 72°C por mais 5 minutos e foi estocado a 4°C; a análise do produto de PCR foi realizada pela eletroforese em gel de agarose a 2%. As bandas foram visualizadas usando luz ultravioleta.

3.2.3. Multiplicação da biomassa bacteriana: no 5º dia de incubação da placa semeada, verificou-se o crescimento de colônias morfológicamente semelhantes ao *H. pylori*. Os testes de catalase, urease e oxidase foram positivos para as amostras das colônias. Esfregaços das colônias corados por Gram revelaram a presença de bacilos gram-negativos com aspecto morfológico semelhante ao *H. pylori*.

Visando multiplicar a biomassa bacteriana, uma parte das colônias foi transferida para um frasco contendo cerca de 150ml de caldo Brucella suplementado com soro fetal bovino a 2% (KARITA et al., 1991). O frasco foi mantido em microaerofilia, a 37°C, sob agitação constante (36 r.p.m.) por 24 horas, quando 100ml de caldo fresco e suplementado foram adicionados à suspensão inicial. O frasco foi mantido sob as mesmas condições por mais 24 horas. Outra amostra das colônias isoladas foi armazenada em meio BHI com glicerol a 15% (KISTOS & STADTLANDER, 1998) e mantida a -80°C por 30 dias.

3.2.4 Preparo da suspensão de inóculo: no 2º dia de incubação das colônias em caldo brucella, foram centrifugadas alíquotas de 40ml da suspensão, a 3600r.p.m., durante 20 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em 5ml de caldo fresco e suplementado. Uma alíquota de 500µl foi misturada com 1000µl de caldo fresco e a concentração final de bactérias foi ajustada segundo a metodologia descrita

por SHOMER et al. (1998). Assim, na absorbância de 600nm, o valor da suspensão igual a 1.0, corresponde à concentração de 10^8 UFC/ml. Uma parte da suspensão foi utilizada imediatamente para a infecção de um grupo de animais. A quantidade restante foi mantida, sob agitação frequente, em atmosfera microaerofílica, a 37°C, por mais 24 horas, quando o cálculo da concentração bacteriana foi novamente realizado. Após 30 dias mantida a -80°C, a amostra das colônias foi semeada em BHMm para o preparo de nova suspensão de inóculo.

3.3. INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Foram empregados neste estudo 126 camundongos BALB/c machos, com 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Centro Multi-Institucional de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura e luminosidade controladas (estante Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), recebendo água e alimento esterilizados. No momento da infecção experimental, estes foram divididos em três grupos:

3.3.1. Grupo A (GA) - Animais inoculados com suspensão preparada com bactérias frescas: 42 camundongos foram mantidos em jejum por 24 horas. Em seguida, foram inoculados intragastricamente com 1ml da suspensão bacteriana preparada segundo item 3.2.2. Para todas as inoculações foi utilizada sonda uretral pediátrica nº 4 (Embramed, São Paulo, SP, Brasil). Logo após a inoculação, morreram três animais deste grupo, permanecendo assim, 39 camundongos inoculados. Cerca de 24 horas após a primo-infecção, todos os animais foram reinoculados com a mesma quantidade da suspensão bacteriana.

3.3.2. Grupo B (GB) - Animais inoculados com suspensão preparada com bactérias congeladas: 42 camundongos foram mantidos em jejum por 24 horas. Em seguida, foram inoculados intragastricamente com 1ml de suspensão preparada com a amostra das colônias congelada por 30 dias. Todos os animais foram reinoculados com a mesma quantidade da suspensão, 24 horas após a primo-infecção.

3.3.3. Grupo C (GC) - Animais inoculados com caldo brucella: 42 camundongos foram mantidos em jejum por 24 horas. Em seguida, foram inoculados intragastricamente com 1ml de caldo *Brucella* suplementado com soro fetal bovino a 2%. Cerca de 24 horas após a primeira inoculação, os animais foram reinoculados com a mesma quantidade de caldo, constituindo o grupo controle.

3.4. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E COLETA DO MATERIAL

Lotes de 6 a 7 animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical aos 7, 14, 21, 28, 35 e 60 dias após a reinoculação. Após o sacrifício, o estômago e o duodeno foram coletados e lavados em solução salina estéril. O estômago foi dividido ao meio, no sentido da grande curvatura; o intestino, não foi separado do estômago e sofreu corte longitudinal, sendo também dividido em duas metades. Uma parte dos órgãos foi aberta em papel de filtro e presa nas extremidades com alfinetes para a fixação em formol 12%. A metade restante foi fragmentada em corpo, junção piloro+antro e duodeno, sendo destinada aos procedimentos para a pesquisa de *H. pylori* na mucosa gástrica e duodenal. Todos os fragmentos submetidos à cultura foram adicionados em solução de BHI e estocados em banho de gelo até o momento da semeadura em BHMm.

3.5. PESQUISA DE *H. pylori* NA MUCOSA GÁSTRICA E DUODENAL

3.5.1. Cultura: os fragmentos do corpo, da junção antro+piloro e duodeno foram homogeneizados em solução de BHI e inoculados em BHMm. As placas foram incubadas em atmosfera de microaerofilia, obtida com o emprego de Microaerobac e mantidas a 37°C, por 3 a 7 dias. A identificação do microrganismo foi baseada na presença de colônias típicas, na morfologia da bactéria à coloração Gram e na positividade dos testes de urease, catalase e oxidase.

3.5.2. Coloração Giemsa: a metade restante dos fragmentos de estômago e duodeno foi fixada em formaldeído a 12%, por pelo menos 24 horas, quando sofreram os processos rotineiros para inclusão em parafina. Cortes histológicos de 5µm de espessura foram corados pelo método de Giemsa modificado, para pesquisa do *H. pylori*. As lâminas foram visualizadas em objetiva de imersão (1000X). O resultado foi considerado positivo ou negativo, independente da região do trato gastrintestinal murino observada.

3.6. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Todos os fragmentos de estômago e duodeno corados por hematoxilina-eosina foram analisados histologicamente para verificação da presença de infiltrado inflamatório. Quando presente, o infiltrado foi classificado de acordo com a escala descrita por Cellini et al. (1994), com algumas modificações, quanto à: A) intensidade (normal; discreta; moderada e intensa); B) natureza (linfomonocitária; linfoplasmocitária); C) camadas atingidas, sendo esta variável dividida em: mucosa+lâmina própria (ausência do infiltrado; presença do infiltrado), submucosa (ausência do infiltrado; presença do infiltrado) e serosa (ausência do infiltrado; presença do infiltrado); D) Presença de erosões ou ulcerações (ausente, presente); E) Presença de gastrite (ausente, presente) e F) Presença de duodenite (ausente; presente). Os resultados foram expressos em tabelas contendo o percentual de animais relativo a cada variável estudada. Os números entre parêntesis correspondem à relação do número de animais em cada variável sobre o n total de animais estudados.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar se houve diferença entre os grupos com relação às variáveis descritas, foi utilizado o teste exato de Fisher, sendo considerada significativa a diferença quando o p-valor ≤ 0.05 (AGRESTI & FINLAY, 1986).

3.8. COMITÊ DE ÉTICA

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (CEE/IB/UNICAMP-protocolo nº 80-2), sendo realizados segundo as normas estabelecidas pelo Comitê.



4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS MACROSCÓPICOS

Não foram observadas alterações macroscópicas no trato gastrointestinal dos animais utilizados no estudo, considerando os períodos de evolução da infecção. Entretanto, aos 28 dias pi, um dos animais do grupo GB exibiu material amorfo e acúmulo atípico de urina na bexiga. Amostras de tecido do órgão foram coletadas e coradas por hematoxilina-eosina e Giemsa, apresentando-se histologicamente normais e negativas quanto à pesquisa da bactéria.

4.2. PCR

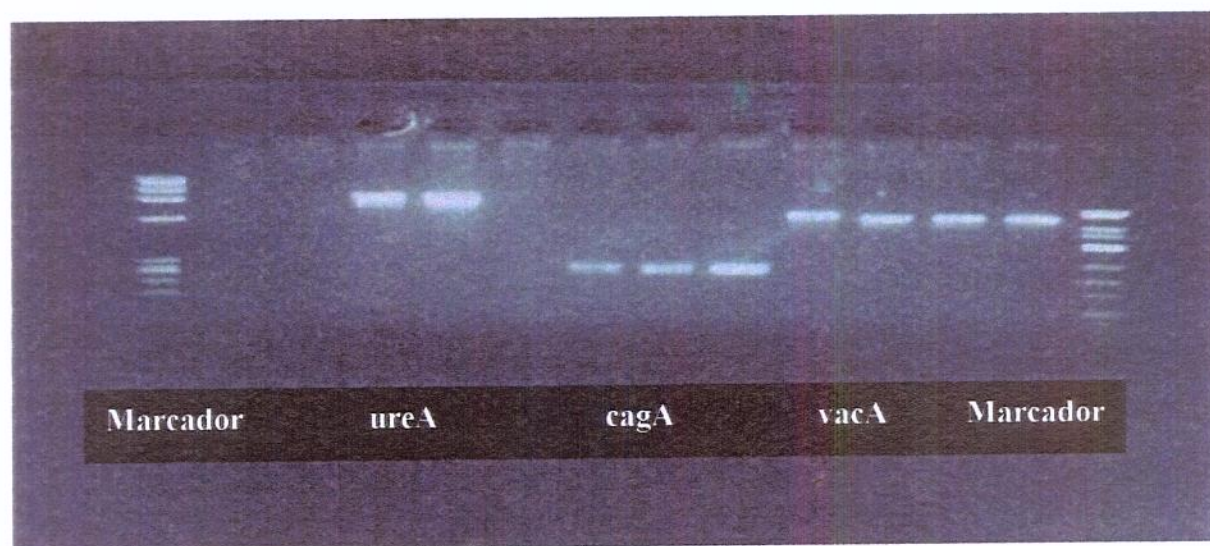


FIGURA 1. Gel de Eletroforese da amplificação dos genes *cagA*, *vacA* e *ureA*

4.3. PESQUISA DE *H. pylori* NA MUCOSA GÁSTRICA E DUODENAL

4.3.1. Cultura:

Não foi observado crescimento de microrganismos em nenhum dos grupos realizados no estudo.

4.3.2. Coloração Giemsa:

O *H. pylori* foi observado na camada de muco do corpo gástrico em todos os períodos de evolução da infecção na maioria dos animais inoculados. A quantidade de bactérias diminuiu significativamente durante a evolução da infecção (observações pessoais).

4.4. RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS

A análise histológica do estômago dos animais inoculados revelou que o *H. pylori* foi capaz de induzir uma resposta inflamatória discreta no antro aos 21 dias pi (p-valor = 0.0261/tabela 1). O infiltrado era predominantemente linfomonocitário e permeava a lâmina própria, submucosa e serosa dos animais do GA. No GB, os animais exibiram infiltrado composto pelos mesmos tipos celulares, porém visualizado na submucosa e serosa antral. Além disso, notou-se um maior percentual de animais acometidos pelo infiltrado no GA.

No corpo gástrico, o infiltrado inflamatório foi significativamente observado aos 14 e 21 dias da infecção (p-valor = 0.0166 e 0.0332, respectivamente), apresentando-se tipicamente linfomonocitário nos dois grupos de animais inoculados. Além disso, os animais do grupo GA foram mais acometidos pelo infiltrado aos 14 dias; no 21º dia, 17% dos animais nesse grupo exibiram infiltrado moderado em todas as regiões do corpo gástrico (tabela 2).

A análise dos dados histopatológicos do piloro demonstrou que, embora alguns animais inoculados com o *H. pylori* tenham apresentado discreto infiltrado linfomonocitário, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos estudados (tabela 3).

No duodeno, o infiltrado inflamatório esteve presente nos dois grupos infectados desde o 7º dia da inoculação experimental, ocasionando duodenite discreta à moderada na maioria dos animais. Embora as células inflamatórias foram visualizadas nas vilosidades e mucosa duodenal nos dois grupos, nos animais inoculados com a cepa fresca (GA), o infiltrado exibiu-se tipicamente linfoplasmocitário até o 35º dia. Além disso, tanto no grupo GA como no grupo GB, notou-se edema nas vilosidades preenchidas pelo infiltrado, bem como congestão vascular (tabela 4).

Tabela 1. Percentual de animais com infiltrado inflamatório no antro

Evolução	Grupo	Intensidade			Natureza		Regiões			p-valor
		N	D	M	LM	LP	M/L	SB	SE	
7 dias	GA	100% (6/6)	-	-	-	-	-	-	-	
	GB	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
14 dias	GA	83% (5/6)	17% (1/6)	-	100% (1/1)	-	100% (1/1)	-	-	P=0.3
	GB	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
21 dias	GA	25% (1/4)	75% (3/4)	-	100% (3/3)	-	100% (3/3)	67% (2/3)	100% (3/3)	P=0.0261
	GB	71% (5/7)	29% (2/7)	-	100% (2/2)	-	-	100% (2/2)	100% (2/2)	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
28 dias	GA	57% (4/7)	43% (3/7)	-	100% (3/3)	-	-	100% (3/3)	-	P=0.1151
	GB	43% (3/7)	57% (4/7)	-	100% (4/4)	-	-	75% (3/4)	50% (2/4)	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
35 dias	GA	71% (5/7)	29% (2/7)	-	100% (2/2)	-	-	-	100% (2/2)	P=0.4842
	GB	71% (5/7)	29% (2/7)	-	100% (2/2)	-	-	50% (1/2)	50% (1/2)	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
60 dias	GA	71% (5/7)	29% (2/7)	-	100% (2/2)	-	50% (1/2)	-	50% (1/2)	P=0.3
	GB	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	

GA: cepa fresca; **GB:** cepa congelada; **GC:** animais controle; **Intensidade:** N-normal; D-discreta; M-moderada

Natureza:LM-linfomonocitária;LP-linfoplasmocitária; **Regiões:**M/L-mucosa + lâmina própria;

SB-submucosa;SE-serosa

Tabela 2. Percentual de animais com infiltrado inflamatório no corpo

Evolução	Grupo	Intensidade			Natureza		Regiões			p-valor
		N	D	M	LM	LP	M/L	SB	SE	
7 dias	GA	100% (6/6)	-	-	-	-	-	-	-	
	GB	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
14 dias	GA	33% (2/6)	67% (4/6)	-	100% (4/4)	-	75% (3/4)	-	25% (1/4)	P=0.0166
	GB	86% (6/7)	14% (1/7)	-	100% (1/1)	-	-	-	100% (1/1)	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
21 dias	GA	33% (2/6)	50% (3/6)	17% (1/6)	100% (4/4)	-	50% (2/4)	75% (3/4)	50% (2/4)	P=0.0332
	GB	43% (3/7)	57% (4/7)	-	100% (4/4)	-	100% (4/4)	-	100% (4/4)	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
28 dias	GA	57% (4/7)	29% (2/7)	14% (1/7)	100% (3/3)	-	33% (1/3)	100% (3/3)	-	P=0.1404
	GB	50% (3/6)	50% (3/6)	-	100% (3/3)	-	67% (2/3)	100% (3/3)	33% (1/3)	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
35 dias	GA	86% (6/7)	14% (1/7)	-	100% (1/1)	-	-	-	100% (1/1)	P=0.7421
	GB	86% (6/7)	14% (1/7)	-	100% (1/1)	-	-	-	100% (1/1)	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
60 dias	GA	86% (6/7)	14% (1/7)	-	100% (1/1)	-	-	-	100% (1/1)	P=1.0
	GB	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	

GA: cepa fresca; **GB:** cepa congelada; **GC:** animais controle; **Intensidade:** N-normal; D-discreta; M-moderada

Natureza: LM-linfomonocitária; LP-linfoplasmocitária; **Regiões:** M/L-mucosa + lâmina própria; SB-submucosa; SE-serosa

Tabela 3. Percentual de animais com infiltrado inflamatório no piloro

Evolução	Grupo	Intensidade			Natureza		Regiões			p-valor
		N	D	M	LM	LP	M/L	SB	SE	
7 dias	GA	100% (6/6)	-	-	-	-	-	-	-	
	GB	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
14 dias	GA	83% (5/6)	17% (1/6)	-	100% (1/1)	-	100% (1/1)	-	100% (1/1)	P=0.3
	GB	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
21 dias	GA	50% (2/4)	50% (2/4)	-	100% (2/2)	-	50% (1/2)	50% (1/2)	-	P=0.2270
	GB	86% (6/7)	14% (1/7)	-	100% (1/1)	-	-	100% (1/1)	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
28 dias	GA	72% (5/7)	28% (2/7)	-	100% (2/2)	-	100% (2/2)	-	100% (2/2)	P=0.4842
	GB	72% (5/7)	28% (2/7)	-	100% (2/2)	-	100% (2/2)	-	50% (1/2)	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
35 dias	GA	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	P=0.3
	GB	86% (6/7)	14% (1/7)	-	100% (1/1)	-	100% (1/1)	-	100% (1/1)	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
60 dias	GA	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
	GB	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	

GA: cepa fresca; GB: cepa congelada; GC: animais controle; **Intensidade:** N-normal; D-discreta; M-moderada

Natureza: LM-linfomonocitária; LP-linfoplasmocitária; **Regiões:** M/L-mucosa + lâmina própria; SB-submucosa; SE-serosa

Tabela 4. Percentual de animais com infiltrado inflamatório no duodeno

Evolução	Grupo	Intensidade			Natureza		Regiões			p-valor
		N	D	M	LM	LP	V/M	SB	SE	
7 dias	GA	80% (4/5)	20% (1/5)	-	-	100% (1/1)	100% (1/1)	-	-	P=0.021
	GB	29% (2/7)	57% (4/7)	14% (1/7)	60% (3/5)	100% (5/5)	100% (5/5)	-	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
14 dias	GA	17% (1/6)	33% (2/6)	50% (3/6)	20% (1/5)	80% (4/5)	100% (5/5)	-	-	P=0.014
	GB	43% (3/7)	14% (1/7)	43% (3/7)	75% (3/4)	25% (1/4)	100% (4/4)	-	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
21 dias	GA	0	60% (3/5)	40% (2/5)	40% (2/5)	60% (3/5)	100% (5/5)	-	-	P=0.0001
	GB	-	43% (3/7)	57% (4/7)	100% (7/7)	-	100% (7/7)	-	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
28 dias	GA	-	-	100% (7/7)	14% (1/7)	86% (6/7)	100% (7/7)	-	-	P=0.0004
	GB	14% (1/7)	29% (2/7)	57% (4/7)	83% (5/6)	17% (1/6)	100% (6/6)	-	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
35 dias	GA	-	57% (4/7)	43% (3/7)	14% (1/7)	86% (6/7)	100% (7/7)	-	-	P=0.0009
	GB	-	57% (4/7)	43% (3/7)	57% (4/7)	43% (3/7)	100% (7/7)	-	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	
60 dias	GA	29% (2/7)	71% (5/7)	-	80% (4/5)	20% (1/5)	100% (5/5)	-	-	P=0.0102
	GB	43% (3/7)	29% (2/7)	29% (2/7)	100% (4/4)	-	100% (4/4)	-	-	
	GC	100% (7/7)	-	-	-	-	-	-	-	

GA: cepa fresca; GB: cepa congelada; GC: animais controle; **Intensidade:** N-normal; D-discreta; M-moderada

Natureza: LM-linfomonocitária; LP-linfoplasmocitária; **Regiões:** M/L-mucosa + lâmina própria; SB-submucosa; SE-serosa

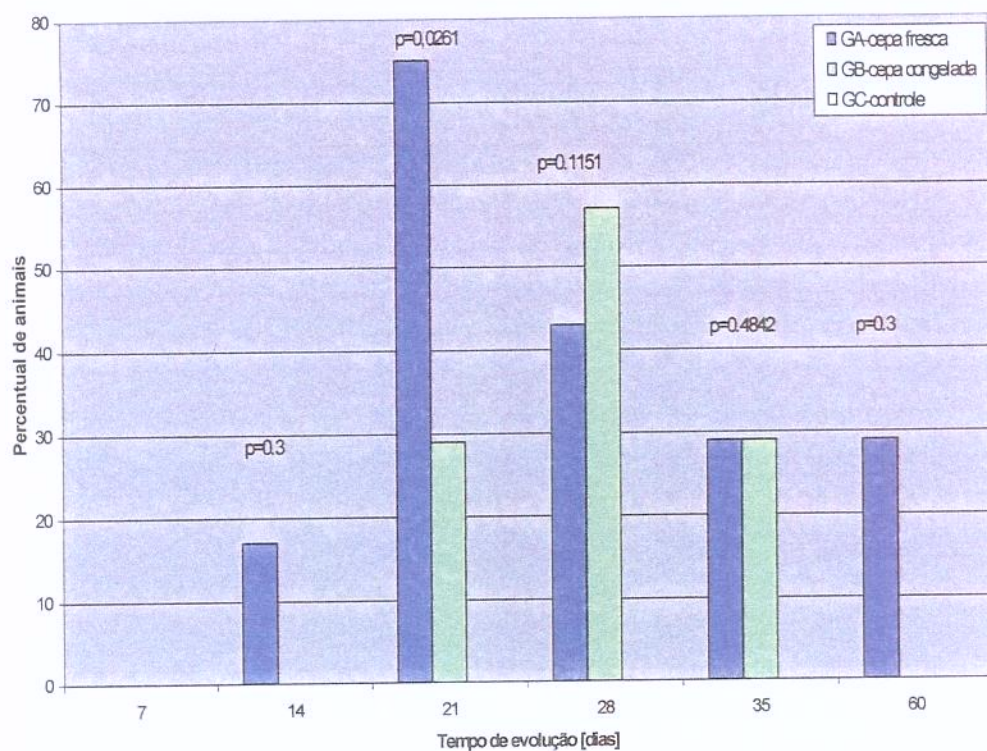


Gráfico 1. Percentual de animais com infiltrado inflamatório no antro

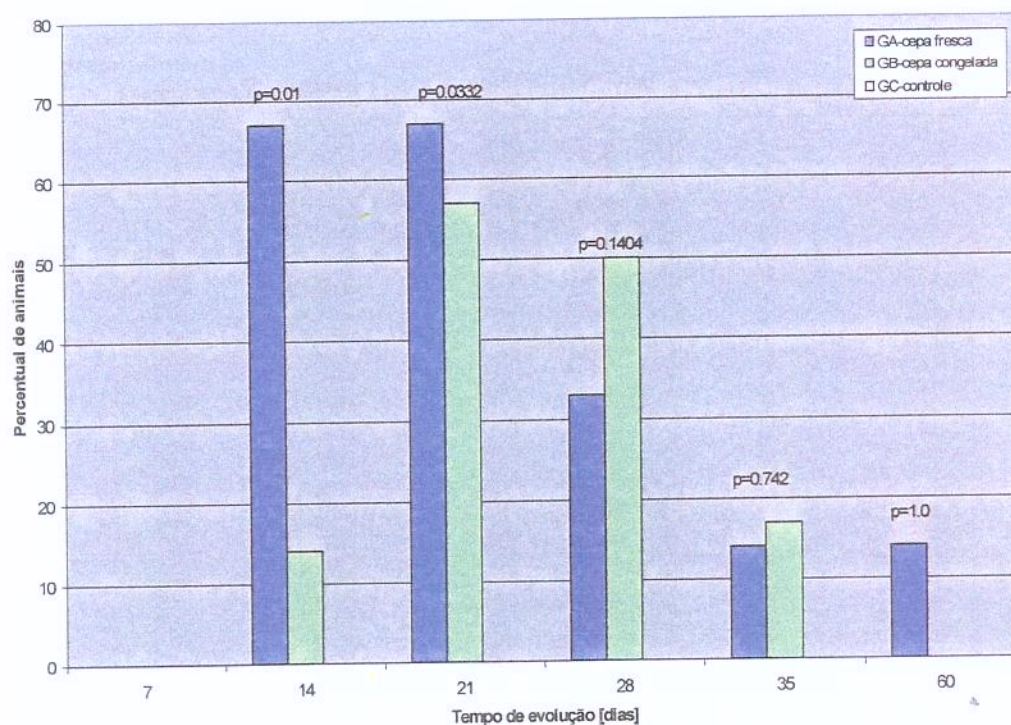


Gráfico 2. Percentual de animais com infiltrado inflamatório no corpo

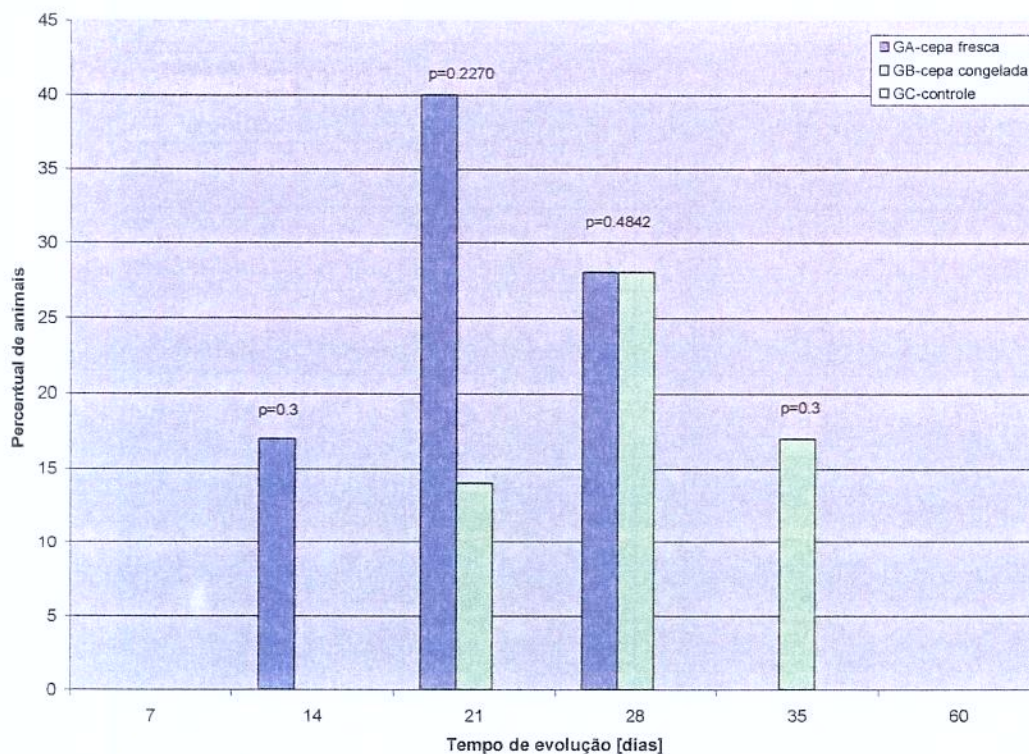


Gráfico 3. Percentual de animais com infiltrado inflamatório no piloro

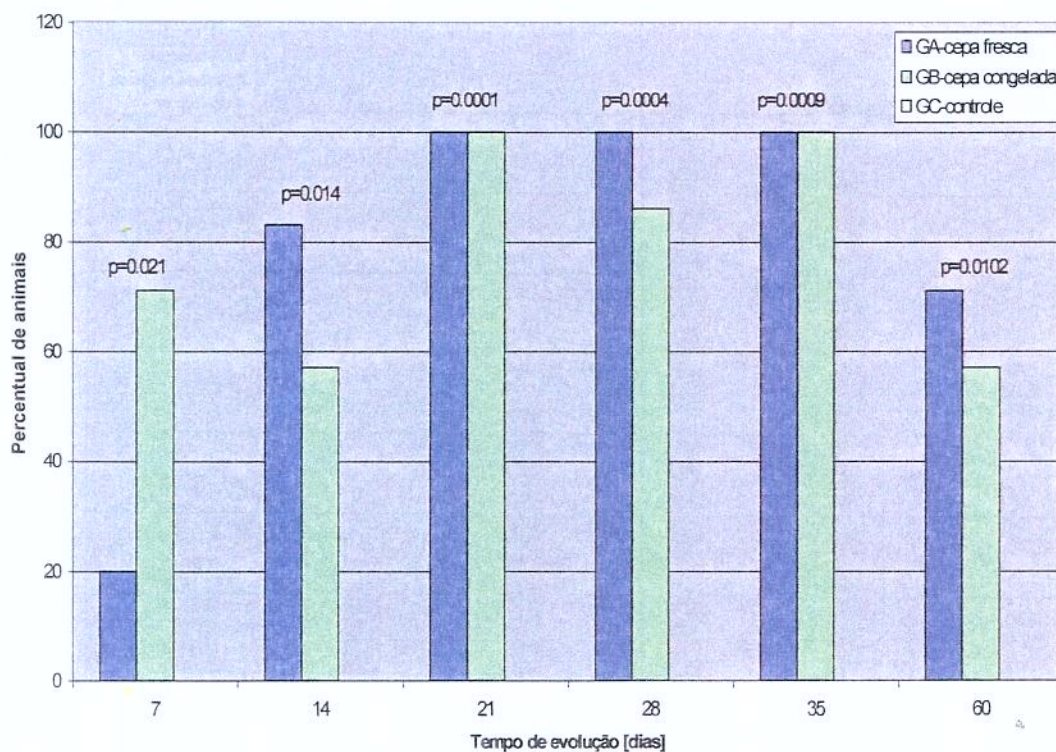


Gráfico 4. Percentual de animais com infiltrado inflamatório no duodeno



FIGURA 2. Vilosidades intestinais e mucosa duodenal preenchidas por discreto infiltrado linfomonocitário em um animal do grupo GB, aos 7 dias após a infecção. Nota-se discreto edema na vilosidade. Coloração Hematoxilina-Eosina, (400X).

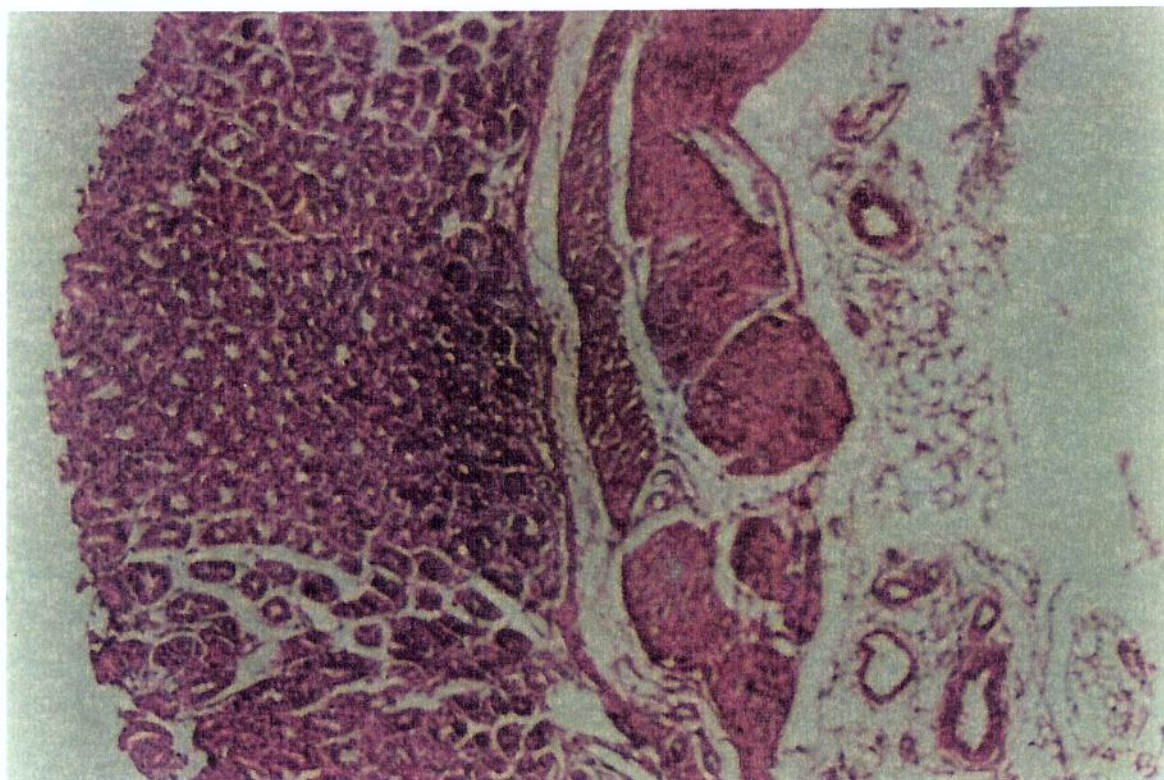


FIGURA 3. Aspecto geral do estômago de um animal controle exibindo todas as camadas teciduais sem alterações histopatológicas. Coloração Hematoxilina-Eosina, (100X).

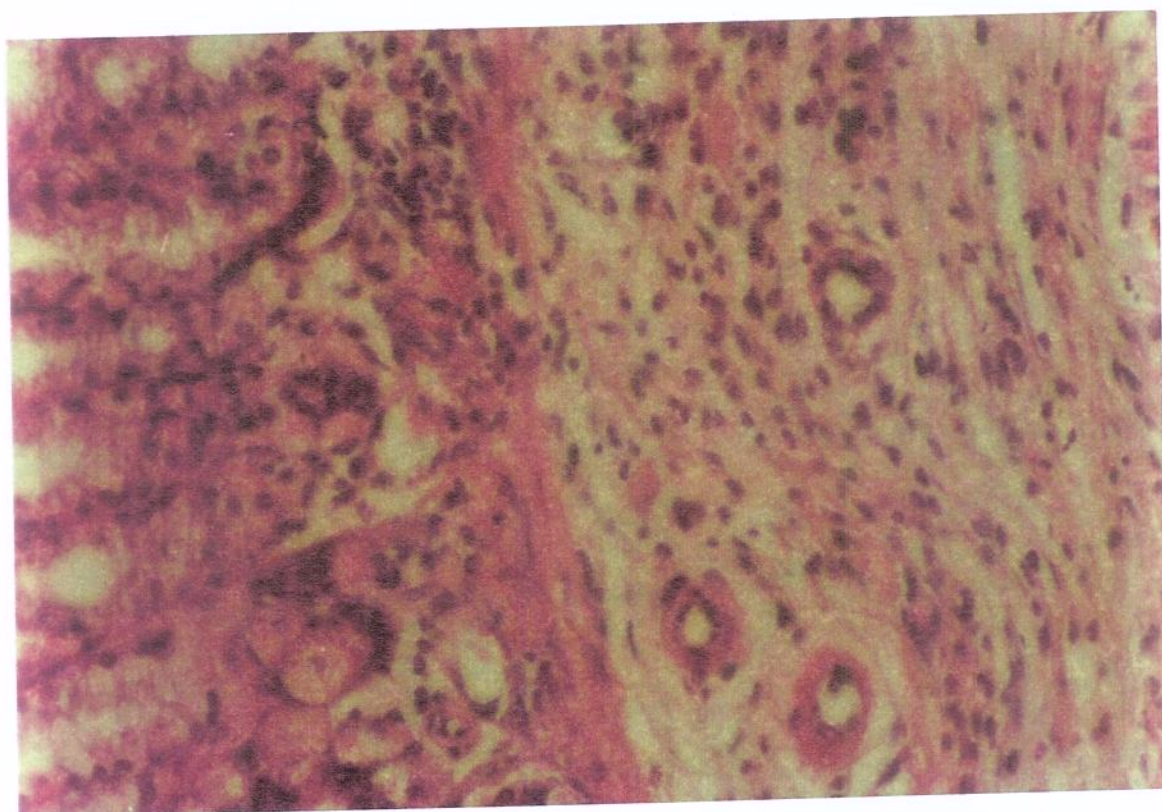


FIGURA 4. Presença de moderado infiltrado linfomonocitário na porção inferior da mucosa, lâmina própria e submucosa do corpo gástrico de um animal do grupo GA no 28º dia da inoculação. Coloração Hematoxilina-Eosina, (400X).

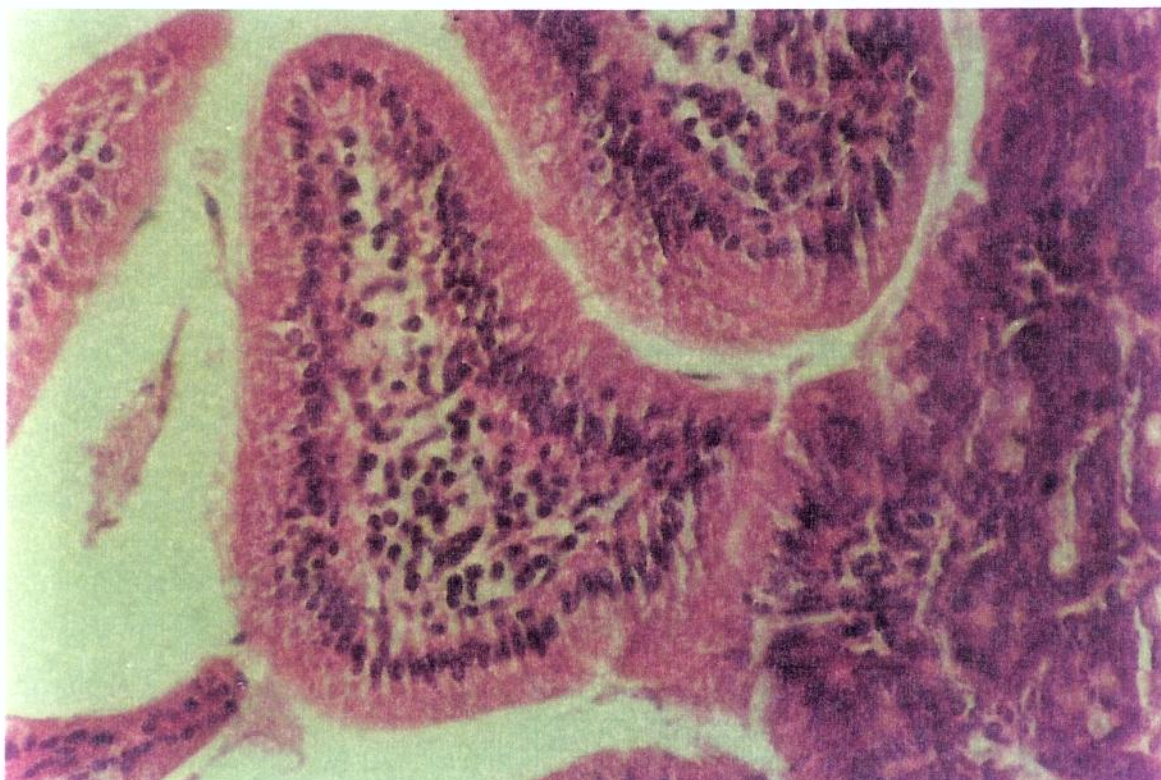


FIGURA 5. Presença de moderado infiltrado linfoplasmocitário nas vilosidades e mucosa intestinal de um animal do GA sacrificado aos 35 dias pi. Coloração Hematoxilina-Eosina, (400X).

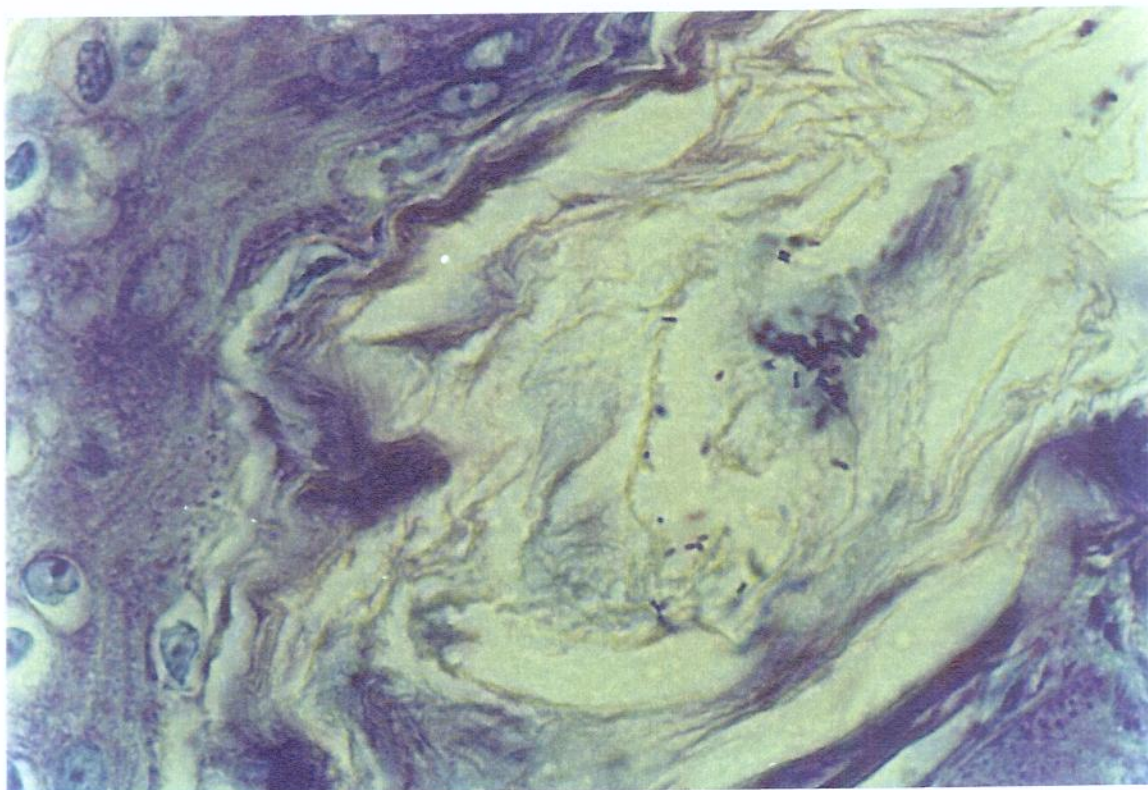


FIGURA 6. Visualização do *H. pylori* na camada de muco do corpo gástrico de um animal do grupo GA no 7º dia após a infecção. Coloração Giemsa modificado, (1000X-imersão).



5. DISCUSSÃO

A infecção pelo *H. pylori* é a principal doença infecciosa que acomete o homem (FOX et al., 2000). Entretanto, existe grande limitação do uso de voluntários humanos para o estudo da infecção. Por esse motivo, vários pesquisadores têm se empenhado no estabelecimento de modelos experimentais que reproduzam as características da infecção humana. Além disso, o desenvolvimento dos modelos experimentais permite avaliar detalhadamente os mecanismos patogênicos da infecção, bem como a produção de novos fármacos e vacinas contra a bactéria.

Deste modo, vários modelos animais de uso convencional e não-convencional nos laboratórios já foram utilizados no estabelecimento da infecção experimental pelo *H. pylori*. Dentre as espécies convencionalmente empregadas, destacam-se os pequenos roedores, particularmente o camundongo (RABELO-GONÇALVES et al., 2000). Baseando-se nesses achados, o presente estudo teve como principal objetivo estabelecer um modelo experimental murino para a infecção pelo *H. pylori*, utilizando o camundongo BALB/c e uma cepa patogênica da bactéria.

A escolha do camundongo BALB/c para o estudo da infecção foi realizada considerando que, dentre as diferentes linhagens de camundongo disponíveis, a BALB/c é geralmente a mais utilizada pelos pesquisadores sendo, portanto, de fácil obtenção, manipulação e baixo custo (RABELO-GONÇALVES et al., 2000). Entretanto, os resultados aqui obtidos demonstraram que esta linhagem é pouco suscetível à inoculação oral do *H. pylori*, embora os animais infectados tenham apresentado duodenite e infiltrado inflamatório no estômago.

Em 1991, KARITA et al. empregaram o camundongo BALB/c com sucesso no estudo da infecção pelo *H. pylori*. Os animais inoculados desenvolveram gastrite e duodenite; alguns exibiram erosões e/ou ulcerações no epitélio gástrico e o organismo foi isolado dos fragmentos de mucosa gástrica (KARITA et al., 1991). Posteriormente, outros pesquisadores utilizaram o camundongo BALB/c e obtiveram resultados semelhantes aos achados histopatológicos no homem. Entretanto, estudos comparando a infecção de diferentes linhagens de camundongos com *H. pylori* e *H. felis* demonstraram que o camundongo BALB/c é mais resistente à infecção, enquanto a linhagem C57Bl/6 é bastante suscetível à inoculação oral dessas espécies (SAKAGAMI et al., 1996; LEE et al., 1997; FOX et al., 2000; KIM et al., 2001).

Comparando a imunidade das linhagens C57Bl/6 e BALB/c inoculadas com *H. pylori*, FOX et al. (2000) relataram que o camundongo C57Bl/6 apresentou resposta imunológica do tipo Th1 durante a infecção, sendo considerado mais suscetível à bactéria. Nos camundongos BALB/c a resposta observada foi do tipo Th2. MOHAMMADI et al. (1997) verificaram que, durante a infecção pelo *H. felis* em camundongos BALB/c, as células do tipo Th2 podem reduzir a quantidade de bactérias no estômago. Adicionalmente, KIM et al. (2001) descreveram que a resposta sorológica da linhagem BALB/c é mais intensa quando comparada à resposta dos animais C57Bl/6, evidenciando a importância dos fatores do hospedeiro no estabelecimento e manutenção da infecção.

Resultados semelhantes foram visualizados por DEY et al. (1998) quando compararam a produção de citocinas em diferentes linhagens de camundongos infectados pelo *H. pylori*. Os autores também observaram discreta resposta inflamatória no estômago do camundongo BALB/c. Todavia, nas linhagens C57Bl/6 e C3H/He, a infiltração exibiu-se mais intensa e a produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-2, TNF- α e INF- γ estava aumentada. Contrariando esses resultados, a linhagem BALB/c exibiu-se inativa na produção destas citocinas, exceto para a IL-2.

Os resultados da cultura aqui descritos ressaltaram que a cepa utilizada foi incapaz de colonizar o trato gastrointestinal dos animais inoculados. Sabe-se que a positividade tanto da cultura quanto do teste da urease do *H. pylori* são dependentes do número e da distribuição das bactérias na mucosa gástrica (ANDERSEN et al., 1997; MENDES et al., 1998; SIU et al., 1998; van DOORN et al., 2000). Autores relataram que o isolamento do *H. pylori* é garantido quando duas biópsias são inoculadas em meios de cultura (ELIZALDE et al., 1998; HUA et al., 1998); GENTA & GRAHAM (1994) descreveram que o processamento de três ou mais fragmentos de biópsia coletados de qualquer região do estômago humano assegura o isolamento do organismo.

No presente estudo, foram coletados fragmentos do corpo, junção antro+piloro e duodeno dos animais; metade dos fragmentos foi destinada à histopatologia e a metade restante foi utilizada na cultura. Deste modo, acredita-se que um número pequeno de bactérias viáveis deveria estar presente nos fragmentos coletados, dificultando assim a

detecção e o isolamento do *H. pylori*. Considerando que a intensidade da inflamação provocada pelo organismo é correlacionada com a densidade bacteriana na mucosa gástrica (CRAIG et al., 1992), os dados referentes à cultura reforçaram as achados histopatológicos aqui descritos. Entretanto, apesar da quantidade de organismos viáveis não ser suficiente para o cultivo do *H. pylori* no presente estudo, a análise dos fragmentos corados pelo Giemsa confirma a presença da bactéria na maioria dos animais infectados (figura 6).

Nesse contexto, cabe ainda salientar que várias espécies de *Lactobacillus* foram isoladas do estômago de camundongos BALB/c (ROACH, SAVAGE, TANOCH, 1977; BROWN & BALISH, 1978). Tendo em vista que alguns estudiosos citaram o papel protetor dos lactobacilos na infecção causada pelo *H. pylori*, os resultados negativos obtidos na cultura podem ser decorrentes ainda da competição do *H. pylori* com estas bactérias da flora murina (BATHIA et al., 1989; CANTORNA & BALISH, 1989; KARITA et al., 1994; BERNET-CAMARD et al., 1997; KABIR et al., 1997; ISOGAI et al., 1997; ARIBA et al., 1998 e COCONNIER et al., 1998).

O papel dos lactobacilos na proteção da infecção pelo *H. pylori* tem sido estudado por muitos autores. Na tentativa de estabelecer um modelo experimental murino para a infecção, KABIR et al. (1997) observaram que apenas os animais germ-free foram colonizados com sucesso pela bactéria. Outros autores demonstraram que o sobrenadante da cultura de *L. acidophilus* LB foi capaz de induzir a conversão do *H. pylori* para a forma cocóide *in vitro*; adicionalmente, constatou-se a redução na atividade da urease do *H. pylori* nas colônias tratadas com o sobrenadante da cultura de *L. acidophilus* LB e ácido láctico, bem como a redução na atividade da urease do *H. felis* em camundongos infectados (COCCONIER et al., 1998). Resultados semelhantes foram descritos por ARIBA et al. (1998) quando da supressão da atividade da urease pela administração oral de *L. salivarius* em camundongos inoculados com *H. pylori*. Do mesmo modo, ensaios realizados *in vitro* demonstraram que a solução contendo ácido láctico a 1% foi capaz de anular a atividade da urease, culminando com a morte bacteriana. MIDOLO et al. (1995) demonstraram ainda que, além do ácido láctico, outros ácidos orgânicos são capazes de inibir o crescimento do *H. pylori in vitro*.

Acredita-se que os lactobacilos apresentam papel protetor na infecção pelo *H. pylori* não só por produzirem ácido láctico ou outros produtos extracelulares, como também pela capacidade de adesão ao epitélio gástrico, inibindo assim, a ligação de vários agentes patogênicos e facilitando a penetração do ácido láctico pela camada de muco. Adicionalmente, um estudo verificou ainda que o tratamento de camundongos com cepas de *L. acidophilus* e/ou *L. casei* resultou no aumento da resposta imune local e sistêmica contra *S. typhimurum*, salientando a importância dos lactobacilos como adjuvantes na estimulação do sistema imunológico do hospedeiro (PERDIGON, ALVAREZ, MEDICI, 1992). Diante desses achados, pesquisadores têm proposto o emprego dos lactobacilos como probiótico no tratamento da infecção (ARIBA et al. 1998; COCONNIER et al., 1998; MUKAI et al., 2002). Sendo assim, alguns estudos clínicos demonstraram que pacientes infectados pelo *H. pylori* e tratados concomitantemente com a tripla terapia e determinadas espécies de *Lactobacillus*, tiveram redução da ocorrência dos efeitos colaterais observados durante o tratamento, bem como da inflamação gástrica; além disso, notou-se diminuição da reincidência da infecção nesses pacientes (MICHETTI et al., 1995; SAKAMOTO et al., 2001; ARMUZZI et al., 2001a; ARMUZZI et al., 2001b).

A análise dos dados histopatológicos demonstrou que a cepa de *H. pylori* utilizada no presente estudo induziu duodenite nos animais infectados, independente de ser primo-isolada ou congelada (tabela 4/gráfico 4). Os animais exibiram infiltrado inflamatório nas vilosidades e mucosa duodenal durante toda a evolução da infecção. Todavia, na maioria dos animais inoculados com a cepa fresca (GA), o infiltrado apresentou-se linfoplasmocitário até o 35º dia (figura 3), enquanto nos animais infectados com a cepa congelada (GB), exibiu-se linfomonocitário nos 60 dias do estudo (figura 1). Esses resultados sugerem que a cepa de *H. pylori* administrada logo após seu isolamento parece induzir resposta humoral contra determinados antígenos bacterianos, caracterizada pelo acúmulo de plasmócitos no infiltrado inflamatório. De fato, FERRERO et al., (1997) verificaram o aumento no alfluxo de plasmócitos e na secreção de IgA em camundongos inoculados com *H. felis*. Outros autores descreveram ainda o aumento na infiltração de plasmócitos IgE-positivos no antro de pacientes infectados pelo *H. pylori*.

Aos 60 dias da infecção, o infiltrado tornou-se linfomonocitário nos animais do grupo GA indicando a supressão da resposta sorológica aos antígenos do *H. pylori*. Concomitantemente, a partir do 35º dia pi, notou-se a diminuição do número de organismos nos fragmentos gástricos corados pelo Giemsa (observações pessoais), sugerindo que o clareamento bacilar culminou com a diminuição da resposta plasmocitária. Além disso, estudiosos descreveram que a perda do reconhecimento antigênico pelas células T pode ser um mecanismo adaptativo induzido pelo *H. pylori*, através do qual sua sobrevivência no estômago é assegurada por longos períodos (SHARMA et al., 1994). Nesse contexto, RAMARAO & MEYER (2001) ressaltaram ainda que a persistência da infecção pelo *H. pylori* pode ser decorrente da capacidade do organismo em inibir a atividade fagocítica de macrófagos e neutrófilos *in vitro*, constituindo um mecanismo central na evasão da bactéria ao sistema imunológico do hospedeiro.

A capacidade de evasão do *H. pylori* ao sistema imune do hospedeiro é indispensável à manutenção e à severidade da infecção, promovendo o desenvolvimento de gastrite crônica na maioria dos indivíduos infectados. Embora grande parte desses indivíduos permaneça assintomática, uma pequena porcentagem de pacientes desenvolve ulceração péptica e em certos casos, câncer gástrico. Além da resposta inflamatória não-específica, a imunidade local e sistêmica em resposta ao *H. pylori* parece ser inadequada para eliminar o organismo da mucosa gástrica (CONLAM et al., 1999). Deste modo, a permanência do organismo no estômago por longos períodos é crucial para a evolução clínica do quadro infeccioso.

Os resultados histológicos observados no estômago demonstraram que o *H. pylori* foi incapaz de provocar gastrite nos animais inoculados; entretanto, promoveu o desenvolvimento de infiltrado linfomonocitário no antro (figura 4) e corpo (figura 3) dos animais, tanto no GA quanto no GB (tabelas 1 e 3; gráficos 1 e 3). Comparando os resultados obtidos nesses grupos, constatou-se que, embora não existam diferenças significantes quanto à intensidade e à natureza do infiltrado, a cepa fresca foi capaz de induzir a inflamação gástrica em períodos mais iniciais da infecção. Além disso, o infiltrado inflamatório induzido pela inoculação da cepa fresca foi mais persistente, permeando o antro e o corpo durante os 60 dias pi (gráficos 1 e 3). Sendo assim, verificou-

se que a cepa congelada necessitou de um maior período de adaptação ao estômago murino para o estabelecimento e a manutenção da infecção.

A avaliação dos resultados histológicos no estômago (tabelas 1 a 3) permitiu visualizar ainda que, independente da condição da cepa utilizada, o pico da infecção induzida pelo *H. pylori* foi alcançado aos 21 dias pi. Além disso, observou-se que a região mais acometida pelo infiltrado inflamatório foi a lâmina própria e a porção inferior da mucosa, seguidas pela submucosa e em alguns casos, a serosa. FIOCCA et al. (1994) relataram a existência de intensa resposta imunológica na lâmina própria de pacientes infectados, decorrente da apresentação de epítomos luminais do *H. pylori* para os linfócitos que circundam o epitélio. Segundo NOACH et al. (1994), a lâmina própria é permeada por vários plasmócitos secretores de IgA e IgG, incrementando a resposta imune humoral ao *H. pylori*. Outros autores discorreram que a resposta inflamatória observada nas camadas mais internas do estômago, incluindo a lâmina própria, pode também ser decorrente da produção da urease pela bactéria, que está presente nessas camadas (GHIARA et al., 1995).

O estabelecimento da infecção experimental utilizando isolados clínicos frescos de *H. pylori* depende de alguns fatores tais como: disponibilidade de um serviço especializado em Endoscopia Digestiva Alta, triagem de pacientes adequados ao isolamento da bactéria, sucesso no isolamento primário do *H. pylori* e obtenção de animais com idade adequada à inoculação. Baseando-se nessas dificuldades, o emprego de cepas previamente estabelecidas seria vantajoso para os pesquisadores, facilitando os procedimentos técnicos necessários ao isolamento e inoculação do *H. pylori*.

Todavia, o presente estudo demonstrou que o processo de congelamento interferiu no potencial patogênico da cepa utilizada, e consequentemente, no estabelecimento e manutenção da infecção gástrica. Resultados semelhantes foram descritos por autores que infectaram camundongos com cepas estabelecidas de *H. pylori* (KARITA et al., 1991; WANG et al., 1997). Acredita-se ainda que o congelamento pode inibir a expressão de antígenos bacterianos, culminando com a menor quantidade de plasmócitos no infiltrado duodenal dos animais no GB.

Em 1994, pesquisadores demonstraram que a inoculação de *H. pylori* no trato urinário de camundongos ocasionou intensa infiltração neutrofílica na mucosa da bexiga e rim. Além disso, os animais apresentaram elevação no pH urinário durante a infecção e a bactéria foi isolada da bexiga, do rim e da urina (ISOGAI et al., 1994). No presente estudo, foram descritas alterações macroscópicas na bexiga urinária de um animal do grupo GB, aos 28 dias pi. Contudo, a análise histológica dos fragmentos da bexiga não demonstrou alterações inflamatórias no órgão, assim como amostras de urina semeadas em BHMm foram negativas. Adicionalmente, fragmentos de bexiga corados pelo Giemsa não evidenciaram a presença da bactéria. Sendo assim, admitiu-se que as alterações visualizadas na bexiga desse camundongo não devem ser atribuídas à infecção pelo *H. pylori*.

Admite-se que durante a infecção, tanto os fatores de virulência do *H. pylori* quanto a resposta inflamatória do hospedeiro contribuem para o processo inflamatório e o dano da mucosa gástrica (CRABTREE, 1998). Com relação aos fatores de virulência, estudiosos descreveram que cepas portadoras da ilha de patogenicidade *cag* e produtoras de *VacA* são mais patogênicas e estão relacionadas com a severidade do quadro patológico no homem (FIGURA et al., 1998; TELFORD et al., 1999; AUDIBERT et al., 2001; DUNDON et al., 2001) e no camundongo (SMYTHIES et al., 2000).

Contrariando esses estudos, outros trabalhos demonstraram que as manifestações clínicas da infecção pelo *H. pylori* independem da expressão do *cagA* e *vacA* (YAMAOKA et al., 1999; AUDIBERT et al., 2001) e embora a ilha de patogenicidade esteja implicada na indução da secreção de interleucina-8 (IL-8), cepas *cagA*-negativas retêm sua capacidade inflamatória (HANSEN et al., 1999). Entretanto, autores demonstraram que as cepas portadoras da ilha podem inibir a capacidade fagocítica de macrófagos e neutrófilos, através de um mecanismo de secreção tipo IV, assegurando a sobrevivência do *H. pylori* por longos períodos no estômago (RAMARAO et al. 2000). Além disso, considera-se que a proteína CagA é apenas o marcador fenotípico da ilha de patogenicidade, sendo necessária a coexpressão de outros genes da ilha para induzir a secreção de citocinas (SHIMOYAMA & CRABTREE, 1998; YAMAOKA et al., 1998a).

O papel da IL-8 na ontogênese da infecção induzida pelo *H. pylori* tem sido demonstrado por vários estudiosos. Além do seu potencial quimiotático, a IL-8 ativa a degranulação dos leucócitos polimorfonucleares (PMN), incrementando o dano tissular da mucosa gástrica (FAN et al., 1995). Admite-se que, em situações fisiológicas, existe um gradiente de concentração de IL-8 entre a mucosa do trato digestivo e o soro, sendo a citocina secretada por vários tipos celulares, incluindo macrófagos/monócitos, células endoteliais, fibroblastos, hepatócitos e PMN (CRABTREE & FARMEY, 1995; FAN et al., 1995). Entretanto, ensaios *in vitro* demonstraram que proteínas solúveis produzidas pela bactéria estimulam a produção de IL-8, culminando com o afluxo neutrofílico e a erosão epitelial (KIM et al., 1998).

Além da IL-8, outras citocinas como IL-6, TNF- α , INF- γ e IL-1 β participam da modulação da infecção (CRABTREE et al., 1993; GIONCHETTI et al., 1994; NOACH et al., 1994; CRABTREE & FARMEY, 1995; YAMAOKA et al., 1995; ISHIHARI, FUKUDA, FUKUMOTO, 1996). Dentre estas citocinas, o TNF- α e a IL-1 β ativam fatores de transcrição para a IL-8 *in vivo* e *in vitro* (SHERON & WILLIAMS, 1992; FAN et al., 1995; KIM et al., 1998). Adicionalmente, o INF- γ apresenta papel crucial na manutenção e severidade da inflamação gástrica, ativando as células mononucleares e induzindo a expressão de moléculas de histocompatibilidade tipo II nas células apresentadoras de antígeno, nos macrófagos ativados e nas células “natural killer” (SAWAI et al., 1999).

Considerando que existe importante correlação entre a densidade do *H. pylori* no estômago, a produção de IL-8 na mucosa gástrica e a severidade da gastrite nas biópsias antrais humanas (ANDO et al., 1996), os resultados descritos neste estudo sugerem que a cepa utilizada apresentou fraca capacidade de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias, apesar de ser caracterizada como *cagA* e *vacA* positiva. Sabendo que as manifestações clínicas da infecção são diretamente influenciadas pela carga genética da cepa infectante, estudos mais detalhados sobre o genótipo da cepa aqui utilizada deverão ser realizados, visando melhor compreensão da etiopatogenia da infecção.

A colonização pelo *H. pylori* pode ocasionar infecção com diferentes aspectos clínicos. Embora a bactéria sobreviva na camada de muco, sem sinais de adesão às células epiteliais, uma grande variedade de receptores epiteliais para as adesinas do *H. pylori* já foi descrita (COVER & BLASER, 1996). Todavia, cabe considerar que a habilidade do *H. pylori* em se ligar às células epiteliais altera significativamente o curso da infecção, influenciando a mucosa gástrica e a população de células do sistema imune. Acredita-se que a adesão do *H. pylori* às células do epitélio gástrico exerce papel crucial na indução da secreção de IL-8 (COLE et al., 1997). Estudiosos têm sugerido que as cepas que expressam adesinas para as quais existem receptores no epitélio gástrico do hospedeiro, e expressam ainda antígenos de superfície que mimetizam estruturas das células parietais humanas, são capazes de induzir autoimunidade no hospedeiro, caracterizada pela presença de gastrite atófica com perda de células parietais e até mesmo neoplasia (GURUGE et al., 1998).

Várias hipóteses têm sido propostas visando esclarecer os diferentes aspectos clínicos da infecção pelo *H. pylori*. Inicialmente, as diferenças genéticas entre as cepas da bactéria devem ser consideradas, pois embora suas características fenotípicas sejam bem conservadas, sabe-se que o organismo apresenta grande diversidade genotípica (PEEK et al., 1995). Todavia, os fatores do hospedeiro também apresentam importante papel na determinação do curso da infecção, especialmente os mecanismos de imunidade celular da mucosa gástrica.

Estudos realizados com biópsias gástricas humanas (KARTTUNEM, NIEMELA, KEROLA, 1995; D'ELIOS et al., 1997a; D'ELIOS et al., 1997b;) e murinas (FOX et al., 2000; KIM et al., 2001) evidenciaram que a resposta imune durante a infecção é, em geral, do tipo Th1, caracterizada pela secreção de INF- γ e TNF- α . Verificando a população de células T no epitélio gástrico humano durante a infecção, KARTTUNEM et al. (1995) observaram ainda que a produção de citocinas difere nos pacientes com ulceração péptica, quando comparados aos pacientes que apresentam apenas gastrite crônica. Nos pacientes com úlcera péptica, as células T demonstraram-se mais polarizadas ao perfil Th1. Todavia, nos pacientes com gastrite crônica, a maioria dos clones exibiu perfil Th0, produzindo IL-5 e IL-4 em adição ao INF- γ e TNF- α .

Outro estudo realizado em camundongos deficientes na expressão dos genes para secreção de IL-4 e INF- γ demonstrou que a inflamação gástrica é exacerbada nos animais que não secretam IL-4, salientando a importância da resposta Th2 na regulação da inflamação gástrica mediada pelo INF- γ (SMYTHIES et al., 2000).

Deste modo, além das características genéticas da cepa infectante, não se deve descartar a importância do modelo animal escolhido no estabelecimento da infecção pelo *H. pylori* no presente estudo. Sabendo que a resposta imunológica do camundongo BALB/c à inoculação do organismo é do tipo Th2 e considerando que não foram observadas condições patológicas severas em nenhum dos animais infectados, acredita-se que a linhagem BALB/c constitui um modelo experimental adequado ao estudo da resistência natural à indução de gastrite e úlcera péptica pelo *H. pylori*.



6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- Apesar do camundongo BALB/c ter desenvolvido duodenite e infiltrado inflamatório no estômago, esta linhagem pode ser considerada pouco suscetível à indução de gastrite e ulcerogênese durante a inoculação experimental pelo *H. pylori*;
- A cepa de *H. pylori* utilizada no presente estudo foi incapaz de induzir resultados histopatológicos severos nos animais inoculados, apesar de ser caracterizada como *cagA* e *vacA* positiva;
- O congelamento da cepa provavelmente interferiu no seu potencial patogênico, dificultando o estabelecimento e a manutenção da infecção no estômago;
- O processo de congelamento possivelmente inibiu a expressão de antígenos do *H. pylori*, culminando com a supressão da resposta plasmocitária desencadeada pela cepa fresca no duodeno.



7. SUMMARY

Helicobacter pylori is a gram-negative, spiral shaped and microaerophilic bacterium that colonizes human gastric mucosa. Chronic infection caused by *H. pylori* is associated with gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. Considering that pathogenic mechanisms of infection has not been fully clarified and studies employing experimental *H. pylori* infection are scarce in Brazil, the aim of present study was to establish an experimental murine model for *H. pylori* infection. One hundred twenty-six male BALB/c mice, 6-8 weeks old, were divided in three groups: **GA**: 42 animals were challenged with 1ml of suspension prepared with fresh clinical isolate adjusted to 10^8 CFU/ml; **GB**: 42 animals were challenged with 1 ml of suspension prepared with frozen bacteria adjusted to 10^8 CFU/ml and **GC**: 42 animals were inoculated with 1ml of brucella broth; they composed the control group. Mice were challenged by the oral route for two consecutive days. Six to seven animals from each group were killed at 7, 14, 21, 28, 35 and 60 days pi and fragments of stomach and duodenum were collected. One half of fragments was destined to culture. The other half was paraffin imbedded and stained by Hematoxylin-Eosin (HE) and Giemsa. The results showed that, although *H. pylori* has not been isolated from gastrointestinal murine tract, challenged mice exhibited duodenitis and inflammatory infiltration in the stomach. The presence of bacteria was confirmed by Giemsa in the majority of infected animals and the number of organisms decreased during infection. At duodenum, the infiltration was mild to moderate in the villi and mucosa in the groups GA and GB. In group GA, the infiltration was lymphoplasmacytic until 35th day; however, in the group GB, the infiltration was lymphomonocytic during 60 days pi. In the stomach, *H. pylori* induced lymphomonocytic infiltration in the antrum and corpus of infected animals. Although there were not differences in relation to intensity and nature of infiltration in the groups GA and GB, the fresh clinical isolate was able to induce gastric inflammation since initials periods of infection. In the group GA, the inflammatory infiltrate was persistent, permeating stomach during 60 days. In the stomach and duodenum, the peak of infection was visualized at 21th day. Data observed in the group GB suggest that freezing probably inhibited expression of bacterial antigens, suppressing the plasmacytic response observed at duodenum of mice in group GA. Although freezing did not interfere in the nature of gastric infiltration, it had altered pathogenic properties of *H. pylori* strain, and consequently, the establishment and maintenance of infection. In

conclusion, data described here demonstrated that, in spite of mice had developed duodenitis and gastric inflammatory infiltration, BALB/c mouse is not susceptible to development of gastritis and peptic ulcer during *H. pylori* experimental infection.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBISCHER, T.; LAFORSCH, S.; HURWITZ, R.; BROMBACHER, F.; MEYER, T.F. - Immunity against *Helicobacter pylori*: significance of interleukin-4 receptor alpha chain status and gender of infected mice. **Infect. Immun.** 69(1):556-558, 2001.
- AGRESTI, A. & FINLAY, B. - Statistical methods for the social sciences. 2 ed. San Francisco, Dellen Publishing Company, 1986. 556p.
- AIBA, Y.; SUZUKI, N.; KABIR, A.M.; TAKAGI, A.; KOGA, Y. - Lactic acid-mediated supression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. **Am. J. Gastroenterol.** 93(11):2097-2101, 1998.
- ALBERTSON, N.; WENNGREN, I.; SJÖSTRÖM, J.E. - Growth and survival of *Helicobacter pylori* in defined medium and susceptobility to Brij 78. **J. Clin. Microbiol.** 36(5):1232-1235, 1998.
- ALEMOHAMMAD, M.M.; FOLEY, T.J.; COHEN, H. - Detection of immunoglobulin G antibodies to *Helicobacter pylori* in urine by an enzyme immunoassay method. **J. Clin. Microbiol.** 31:2174-2177, 1993.
- ANDERSEN, A.P.; ELLIOT, D.A.; LAWSON, M.; BARLANDO, P.; HATCHER, V.B.; PUSZKIN, E.G. - Growth and morphological transformations of *Helicobacter pylori* in broth media. **J. Clin. Microbiol.** 35(11):2918-2922, 1997.
- ANDERSEN, L.P. - New *Helicobacter* species in humans. **Dig. Dis.** 19(2):112-115, 2001.
- ANDERSEN, L.P.; DORLAND, A.; KARACAN, H.; COLDING, H.; NILSSON, H.O.; WADSTROM, T.; BLOM, J. - Possible clinical importance of the transformation of *Helicobacter pylori* into coccoid forms. **Scand. J. Gastroenterol.** 35(9):897-903, 2000.
- ANDO, T.; KUSUGAMI, K.; OHSUGA, M.; IMADA, A.; SHINODA, M.; KONAGAYA, T.; INA, K.; KASUGA, N.; FUKATSU, A.; ICHIYAMA, S.; NADA, T.; OHTA, M. - Interleukin-8 activity correlates with histological severity in *Helicobacter pylori*-associated antral gastrits. **Am. J. Gastroenterol.** 91(6):1150-1156, 1996.

- APPELMELK, B.J.; SIMOONS-SMITH, I.; NEGRINI, R.; et al. - Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. **Infect. Immun.** **64(6)**:2031-2040, 1996.
- ARMUZZI, A.; CREMONINI, F.; BARTOLOZZI, F.; CANDUCCI, F.; CANDELLI, M.; OJETTI, V.; CAMMAROTA, G.; ANTI, M.; DE LORENZO, A.; POLA, P.; GASBARRINI, G.; GASBARRINI, A. - The effect of oral administration of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. **Aliment. Pharmacol. Ther.** **15(2)**:163-169, 2001a.
- ARMUZZI, A.; CREMONINI, F.; OJETTI, V.; BARTOLOZZI, F.; CANDUCCI, F.; CANDELLI, M.; SANTARELLI, L.; CAMMAROTA, G.; DE LORENZO, A.; POLA, P.; GASBARRINI, G.; GASBARRINI, A. - Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy: a pilot study. **Digestion** **63(1)**:1-7, 2001b.
- ASHTON-KEY, M.; DISS, T.C.; ISAACSON, P.G. - Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy and resection specimens. **J. Clin. Pathol.** **49**:107-111, 1996.
- ATHERTON, J.C.; CAO, P.; PEEK, R.M. Jr; TUMMURU, M.K.; BLASER, M.J.; COVER, T.L. - Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J. Biol. Chem.** **270(30)**:17771-17777, 1995.
- ATUMA, C.; ENGSTRAND, L.; HOLM, L. - *Helicobacter pylori* extracts reduce mucosal blood flow by a nitric oxide-independent but mast cell- and platelet-activating factor receptor-dependent pathway in rats. **Scand. J. Gastroenterol.** **34(12)**:1183-1189, 1999.
- AUCHER, P.; PETIT, M.L.; MANNANT, P.R.; PEZENNEC, L.; BABIN, P.; FAUCHERE, J.L. - Use of immunoblot assay to define serum antibody patterns associated with *Helicobacter pylori* infection and with *H. pylori*-related ulcers. **J. Clin. Microbiol.** **36(4)**:931-936, 1998.

- AUDIBERT, C.; BURUCOA, C.; JANVIER, B.; FAUCHERE, J.L. - Implication of the structure of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island in induction of interleukin-8 secretion. **Infect. Immun.** **69(3)**:1625-1629, 2001.
- BANATVALA, N.; LOPEZ, C.R.; OWEN, R.; ABDI, Y.; DAVIES, G.; HARDIE, J.; FELDMAN, R. - *Helicobacter pylori* in dental plaque. **Lancet** **341**:380, 1993.
- BARDHAN, P.K. - Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. **Clin. Infect. Dis.** **25(5)**:973-978, 1997.
- BASKERVILLE, A. & NEWELL, D.G. - Naturally occurring chronic gastritis and *C. pylori* infection in the Rhesus monkey: a potential model for gastritis in man. **Gut** **29**:465-472, 1988.
- BATHIA, S.J.; KOCHAR, N.; ABRAHAM, P.; et al. - *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. **J. Clin. Microbiol.** **27(10)**:2328-2330, 1989.
- BAUERFEIND, P.; GARNER, R.; DUNN, B.E.; MOBLEY, H.L.T - Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. **Gut** **40**:25-30, 1997.
- BEALES, I.; BLASER, M.J.; SRINIVASAN, S.; CALAM, J.; PEREZ-PEREZ, G.I.; YAMADA, T.; SCHEIMAN, J.; POST, L.; DEL VALLE, J. - Effect of *Helicobacter pylori* products and recombinant cytokines on gastrin release from cultured canine G cells. **Gastroenterol.** **113(2)**:465-471, 1997.
- BEALES, I.L.; POST, L.; CALAM, J.; et al. - Tumor necrosis factor alpha stimulates gastrin release from canine and human antral G cells: possible mechanism of the *Helicobacter pylori*-gastrin link. **Eur. J. Clin. Invest.** **26(7)**:609-611, 1996.
- BELL, G.D. & WEIL, J - Detection of *Helicobacter pylori* by the ¹⁴C-urea Breath Test. In: RATHBONE, B.J. & HEATLEY, R.V. - *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease. Londres, Blackweel Scientific Publications, 1992, p.75-87.

- BENAISSA, M.; BABIN, P.; QUELLARD, N.; PEZENNEC, L.; CENATIEMPO, Y.; FAUCHERE, J.L. - Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. **Infect. Immun** **64(6)**:2331-2335, 1996.
- BERNET-CAMARD, M.F.; LIÉVIN, V.; BRASSART, D.; NEESER, J.R.; SERVIN, A.L.; HUDAULT, S. - The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes nonbacteriocin antibacterial substance(s) active and *in vivo*. **Appl. Environ. Microbiol.** **63(7)**:2747-2753, 1997.
- van den BERG, F.M.; ZIJLMANS, H.; LANGERBERG, W. RAUWS, E.; SCHIPPER, M. - Detection of *Campylobacter pylori* in stomach tissue by DNA *in situ* hybridization. **J. Clin. Pathol.** **42**:995-1000, 1989.
- BLASER, M.J. - *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. **J. Infect. Dis.** **161**:626-633, 1990.
- BRONDSOON, M.A. & SCHOENKNECHT, F.D. - *C. pylori* isolated from the stomach of the monkey, *Macaca nemistrina*. **J. Clin. Microbiol.** **26**:1725-1728, 1988.
- BROOKES, S.T.; PROSSER, S.J.; HARRISSON, G. et al. - Rapid analysis of ¹³CO₂ for ¹³C-urea breath tests. European *Helicobacter pylori* Study Group. **Rev. Esp. Enf. Dig.** **78 (Suppl. 1)** : 30, 1990.
- BROWN, L.M. - *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. **Epidemiol. Rev.** **22(2)**:283-297, 2000.
- BROWN, J.F. & BALISH, E. - Gastrointestinal Microecology of BALB/c nude mice. **Appl. Environ. Microbiol.** **36(1)**:144-159, 1978.
- BRZOZWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; PAJDO, R.; KARCZEWSKA, E.; STACHURA, J.; HAHN, E.G. - Water extracts of *Helicobacter pylori* delay healing of chronic gastric ulcers in rats: role of cytokines and gastrin-somatostatins link. **Digestion** **60(1)**:22-33, 1999.

- BURICH, A.; HERSHBERG, R.; WAGGIE, K.; ZENG, W.; BRABB, T.; WESTRICH, G.; VINEY, J.L.; MAGGIO-PRICE, L. - *Helicobacter*-induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T-cell-deficient mice. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** **281(3)**:G764-778, 2001.
- BURNENS, A.P.; STANLEY, J.; SCHAAD, U.B.; NICOLET, J. - Novel *Campylobacter*-like organism resembling *Helicobacter fennelliae* isolated from a with gastroenteritis and from dogs. **J. Clin. Microbiol.** **31(7)**:1916-1917, 1993.
- CAMORLINGA-PONCE, M.; TORRES, J.; PEREZ-PEREZ, G.; LEAL-HERRERA, Y.; GONZALEZ-ORTIZ, B.; MADRAZO de la GARZA, A.; GOMEZ, A.; MUÑOS, O. - Validation of a serologic test for the diagnostic of *Helicobacter pylori* infection and the immune response to urease and CagA in children. **Am. J. Gastroenterol.** **93(8)**:1264-1270, 1998.
- CANTORNA, M. & BALISH, E. - Inability of human clinical strains of *Helicobacter pylori* to colonize the alimentary tract of germfree rodents. **Can. J. Microbiol.** **36**:237-241, 1989.
- CAO, J.; LI, Z.Q.; BORCH, K.; PETERSSON, F.; MARDH, S. - Detection of spiral and coccoid forms of *Helicobacter pylori* using a murine monoclonal antibody. **Clin. Chim. Acta** **267(2)**:183-196, 1997.
- CATTOLI, G.; van VUGT, R.; ZANONI, R.G.; SANGUINETTI, V.; CHIOCCHETTI, R.; GUALTERI, M.; VANDENBROUCHE -GRAULS, C.M.; GAASTRA, W.; KUSTERS, J.G. - Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter* spp. in naturally infected dogs. **Vet. Microbiol.** **71(3-4)**:295-296, 1999.
- CAVE, D.R. - How is *Helicobacter pylori* transmitted? **Gastroenterol.** **113**:S9-S14, 1997.
- CELLINI, L.; ALLOCATI, N.; ANGELUCCI, D.; IEZZI, T.; DI CAMPLI, E.; MARZIO, L.; DAINELLI, B. - Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable *in vitro* reverts in mice. **Microbiol. Immunol.** **38(11)**:843-850, 1994.

- CELLINI, L.; DAINELLI, B.; ANGELUCCI, D.; GROSSI, L.; Di BARTOLOMEO, S.; Di CAMPLI, E.; MARZIO, L. - Evidence for an oral-faecal transmission of *Helicobacter pylori* infection in an experimental murine model. **APMIS** **107**(5):477-484, 1999.
- CELLINI, L.; ROBUFFO, I.; DI CAMPLI, E.; DI BARTOLOMEO, S.; TARABORELLI, T.; DAINELLI, B. - Recovery of *Helicobacter pylori* ATCC 43504 from a viable but not culturable state: regrowth or resuscitation? **APMIS** **106**:571-579, 1998.
- CHAN, W.Y.; HUI, P.K.; LEUNG, K.M.; CHOW, J.; KWOK, F.; NG, C.S. - Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. **Am. J. Clin. Pathol.** **102**:503-507, 1994.
- CHEN, W.; SHU, D.; CHADWICK, V.S. - *Helicobacter pylori* infection in interleukin-4-deficient and transgenic mice. **Scand. J. Gastroenterol.** **34**(10):987-992, 1999.
- CHEN, W.; SHU, D.; CHADWICK, V.S. - *Helicobacter pylori* infection: mechanism of colonization and functional dyspepsia reduced colonization of gastric mucosa by *Helicobacter pylori* in mice deficient in interleukin-10. **J. Gastroenterol. Hepatol.** **16**(4):377-383, 2001.
- CHISHOLM, S.A.; OWEN, R.J.; TEARE, E.L.; SAVERYMUTTU, S. - PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and real-time determination of clarithromycin resistance directly from human gastric biopsy samples. **J. Clin. Microbiol.** **39**(4):1217-1220, 2001.
- CHODOS, J.E.; DWORKIN, B.M.; SMITH, F.; van HORN, K.; WEISS, L.; ROSENTHAL, W.S. - *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease: a prospective endoscopic study and comparison of diagnostic tests. **Am. J. Gastroenterol.** **83**:1226-1230, 1988.
- COCCONIER, M.H.; LIEVIN, V.; HEMERY, E.; SERVIN, A.L. - Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. **Appl. Environ. Microbiol.** **64**(11):4573-4580, 1998.

- COHEN, H.; RETAMA, B.; JONSON, C.; ROSE, S.; PRONOVOST, A.; LAINE, L. - Evaluation of a rapid test to detect IgG antibodies to *Helicobacter pylori* user fingerstick whole blood samples. **Gastroenterology** 110:A83, 1996.
- COLE, S.P.; CIRILLO, D.; KAGNOFF, M.F.; GUINEY, D.G.; ECKMANN, L. - Coccoid and spiral *Helicobacter pylori* differ in their abilities to adhere to gastric epithelial cells and induce interleukin-8 secretion. **Infect. Immun.** 65(2):843-846, 1997.
- COLE, S.P.; KHARITNOV, V.F.; GUINEY, D.G. - Effect of nitric oxide on *Helicobacter pylori* morphology. **J. Infect. Dis.** 180:1713-1717, 1999.
- CONLAN, J.W.; KUOLEE, R.; WEBB, A.; PERRY, M.B. - Immunossupression by a corticosteroid fails to exacerbate *Helicobacter pylori* infection in a mouse model of gastric colonization. **Can. J. Microbiol.** 45(11):975-980, 1999.
- CORNETTA, A.M.; SIMPSON, K.W.; STRAUSS-AYALI, D.; McDONOUGH, P.L.; GLEED, R.D. - Use of a [13C] urea breath test for detection of gastric infection with *Helicobacter* spp in dogs. **Am. J. Vet. Res.** 59(11):1364-1369, 1998.
- CORTHÉSY-THEULAZ, I.; PORTA, N.; GLAUSER, M.; SARAGA, E.; VANEY, A.C.; HAAS, R.; KRAEHENBUHL, J.P.; BLUM, A.L.; MICHETTI, P. - Oral immunization with *Helicobacter pylori* urease B subunit as a treatment against *Helicobacter* infection in mice. **Gastroenterology** 109:115-121, 1995.
- CORVAGLIA, L.; BONTEMS, P.; DEVASTER, J.M.; HEIMANN, P.; GLUPCZYNSKI, Y.; KEPPENS, E.; CADRANEL, S. -Accuracy of serology and 13C-urea breath test for detection of *Helicobacter pylori* in children. **Pediatr. Infect. Dis.** 18(11):976-979, 1999.
- COSTA, F.; MUMOLO, M.G.; BELLINI, M.; ROMANO, M.R.; MANGHETTI, M.; PACI, A.; MALTINI, G.; MARCHI, S. - Post-treatment diagnostic accuracy of a new enzyme immunoassay to detect *Helicobacter pylori* in stools. **Aliment. Pharmacol. Ther.** 15(3):395-401, 2001.

- COVACCI, A.; TELFORD, J.L.; DEL GIUDICE, G.; PARSONNET, J.; RAPPUOLI, R. - *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. **Science** **284**:1328-1333, 1999.
- COVER, T.L.; LEHMANN, F.S.; SCHILLER, N.; COVER, T.; HATCH, R.; SEENSALV, R.; KATO, K.; WALSH, J.H.; SOLL A.H. - *H. pylori* stimulates gastrin release from canine antral cells in primary culture. **Am J. Physiol.** **274**(6Pt1):G992-996, 1998.
- COVER, T.L. & BLASER, M.J. - *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention. **Adv. Intern. Med.** **41**:85-117, 1996.
- CRABTREE, J.E. - Role of cytokines in pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced mucosal damage. **Dig. Dis. Sci.** **43**(9):46S-55S, 1998.
- CRABTREE, J.E.; FARMERY, S.M. - *Helicobacter pylori* and gastric mucosal cytokines: evidence that CagA-positive strains are more virulent. **Labor. Invest.** **73**(6):742-745, 1995.
- CRABTREE, J.E.; PEICHL, P.; WYATT, J.I.; et al. - Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection. **Scand. J. Immunol.** **37**:65-70, 1993.
- CRAIG, P.M.; TERRITO, M.C.; KARNES, W.E.; et al. - *Helicobacter pylori* secretes a chemotactic factor for monocytes and neutrophils. **Gut** **33**:1020-1023, 1992.
- CUTLER, A.F.; HAVSTAD, S.; MA, C.K.; BLASER, M.J.; PEREZ-PEREZ, G.I.; SCHUBERT, T.T. - Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology** **109**:136-141, 1995.
- DANIELSSON, D. & JURSTRAND, M. - Nonopsonic activation of neutrophils by *Helicobacter pylori* is inhibited by rebamipide. **Dig. Dis. Sci.** **43**(9):167S-173S, 1998.
- DAW, M.A.; DEEGAN, P.; LEEN, E.; O'MORAIN, C. - Short report: the effect of omeprazole on *Helicobacter pylori* and associated gastritis. **Aliment. Pharmacol. Ther.** **5**(4):435-439, 1991.

- D'ELIOS, M.M.; MANGHETTI, M.; ALMERIGOGNA, F.; AMEDIE, A.; COSTA, F.; BURRONI, D. - Different cytokines profiles and antigen-specificity repertoire in *Helicobacter pylori*-specific T cell clones from the antrum of chronic gastritis patients with or without peptic ulcer disease. **Eur. J. Immunol.** **27**:1751-1755, 1997a.
- D'ELIOS, M.M.; MANGHETTI, M.; DE CARLI, M.; COSTA, F.; BALDARI, C.T.; BURRONI, D.; TELFORD, J.L.; ROMAGNANI, S.; DEL PRETE, G. - T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. **J. Immunol.** **158**:962-967, 1997b.
- DEY, A.; YOKOTA, K.; KOBAYASHI, K.; OGUMA, K.; HIRAI, Y.; AKAGI, T. - Antibody and cytokine responses in *Helicobacter pylori*-infected various mouse strains. **Acta. Med. Okayama** **52**(1):41-48, 1998.
- DIAL, E.J.; ROMERO, J.J.; HEADON, D.R.; LICHTENBERGER, L.M. - Recombinant human lactoferrin is effective in the treatment of *Helicobacter felis*-infected mice. **J. Pharm. Pharmacol.** **52**(12):1541-1546, 2000.
- DIXON, M.F. - *Helicobacter pylori* and the peptic ulceration: histopathological aspects. **J. Gastroenterol. Hepatol.** **6**:125-130, 1991.
- DOIG, P.; AUSTIN, J.W.; KOSTRZYNSKA, M.; TRUST, T.J. - Production of a conserved adhesin by the human gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*. **J. Bacteriol.** **174**:2539-2547, 1992.
- DONELLI, G.; MATARRESE, P.; FIORENTINI, C.; et al. - Role of *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA and urease in a mouse model of disease. **Infect. Immun.** **63**(10):4154-4160, 1995.
- DONELLI, G.; MATARRESE, P.; FIORENTINI, C.; DAINELLI, B.; TARABORELLI, T.; DI CAMPLI, E.; DI BARTOLOMEO, S.; CELLINI, L. - The effect of oxygen on the growth and cell morphology of *Helicobacter pylori*. **FEMS Microbiol. Let.** **168**:9-15, 1998.

- van DOORN, L.J.; FIGUEIREDO, C.; SANNA, R.; PLAISIER, A.; SCHNEEBERGER, P.; DE BOER, W.; QUINT, W. - Clinical relevance of the *cagA* and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology** 115(1):58-66, 1998.
- van DOORN, L.J.; HENSKENS, Y.; NOUHAN, N.; VERSCHUREN, A.; VREEDE, R.; HERBRINK, P.; PONJEE, G.; van KRIMPEN, K.; BLANKEBURG, R.; SCHERPENISSE, J.; QUINT, W. - The efficacy of laboratory diagnosis of *Helicobacter pylori* infections in gastric biopsy specimens is related to bacterial density and *vacA*, *cagA* and *iceA* genotypes. **J. Clin. Microbiol.** 38(1):13-17, 2000.
- van DOORN, O.J.; BOSMAN, D.K.; van't HOFF, B.W.; TAMINIAU, J.A.; ten KATE, F.J.; van der ENDE, A. - *Helicobacter pylori* Stool Antigen test: a reliable non-invasive test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.** 13(9):1061-1065, 2001.
- DUBOIS, A.; BERG, D.E.; FIALA, N.; HEMAN-ACKAH, L.M.; PEREZ-PEREZ, G.I.; BLASER, M.J. - Cure of *Helicobacter pylori* infection by omeprazole-clarithromycin-based therapy in non-human primates. **J. Gastroenterol.** 33(1):18-22, 1998a.
- DUBOIS, A.; BERG, D.E.; INCECIK, E.T.; FIALA, N.; HEMAN-ACKAH, L.M.; DEL VALLE, J.; YANG, M.; WIRTH, H.P.; PEREZ-PEREZ, G.I.; BLASER, M.J. - Host specificity of *Helicobacter pylori* strains and host responses in experimentally challenged nonhuman primates. **Gastroenterology** 116(1):90-96, 1999.
- DUBOIS, A.; BERG, D.E.; INCECIK, E.T.; FIALA, N.; HEMAN-ACKAH, L.M.; PEREZ-PEREZ, G.I.; BLASER, M.J. - Transient and persistent experimental infection of nonhuman primates with *Helicobacter pylori*: implications for human disease. **Infect. Immun.** 64(8):2885-2891, 1996.
- DUBOIS, A.; FIALA, N.; HEMAN-ACKAH, L.M.; DRAZEK, E.S.; TARNAWSKI, A.; FISHBEIN, W.N.; PEREZ-PEREZ, G.I.; BLASER, M.J. - Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: a model for spiral bacteria infection in humans. **Gastroenterology** 106:1405-1417, 1994.

- DUBOIS, A.; FIALA, N.; WEICHBROD, R.H. - Seroepizootiology of *Helicobacter pylori* gastric infection in nonhuman primates housed in social environments. **J. Clin. Microbiol.** **33(6)**:1492-1495, 1995.
- DUBOIS, A.; LEE, C.K.; FIALA, N.; KLEANTHOUS, H.; MEHLMAN, P.T.; MONATH, T. - Immunization against natural *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates. **Infect. Immun.** **66(9)**:4340-4346, 1998b.
- DUBOIS, A.; TARNAWSKI, A.; NEWEL, D.; FIALA, N.; DABROS, W.; STACHURA, J.; KRIVAN, H.; HEMAN-ACKAH, L.M. - Gastric injury and invasion of parietal cells by spiral bacteria in Rhesus monkey. **Gastroenterology** **100(4)**:884-891, 1991.
- DUNDON, W.G.; de BERNARD, M.; MONTECUCCO, C. - Virulence factors of *Helicobacter pylori*. **Int. J. Med. Microbiol.** **290(8)**:647-658, 2001.
- DUNN, B.E.; COHEN, H.; BLASER, M. - *Helicobacter pylori*. **Clinic. Microbiol. Rev.** **10(4)**:720-741, 1997.
- EATON, K.A.; BROOKS, C.L.; MORGAN, D.R.; KRAKOWKA, S. - Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. **Infect. Immun.** **59(7)**:2470-2475, 1991.
- EATON, K.A.; CATRENICH, C.E.; MAKIN, K.M. - Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. **J. Infect. Dis.** **171**:459-462, 1995.
- EATON, K.A.; COVER, T.L.; TUMMURU, M.K.; BLASER, M.J.; KRAKOWKA, S. - Role of vacuolating cytotoxin in gastritis due to *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. **Infect. Immun.** **65(8)**:3462-3464, 1997.
- EATON, K.A.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; TZELLAS, N.; COLEMAN, B.E.; PAOLA, J.; SHERDING, R. - Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. **J. Clin. Microbiol.** **34(12)**:3165-3170, 1996.

- EATON, K.A.; KERSULYTE, D.; MEFFORD, M.; DANON, S.J.; KRAKOWKA, S.; BERG, D.E. - Role of *Helicobacter pylori* cag region genes in colonization and gastritis in two animal models. **Infect. Immun.** **69(5)**:2902-2908, 2001a.
- EATON, K.A.; KRAKOWKA, S. - Avirulent, urease-deficient *Helicobacter pylori* colonizes gastric epithelial explants *ex vivo*. **Scand. J. Gastroenterol.** **30(5)**:434-437, 1995.
- EATON, K.A.; MEFFORD, M.E. - Cure of *Helicobacter pylori* infection and resolution of gastritis by adoptive transfer of splenocytes in mice. **Infect. Immun.** **69(2)**:1025-1031, 2001b.
- EATON, K.A.; MEFFORD, M.; THEVENOT, T. - The role of T cells subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice. **J. Immunol.** **166(12)**:7456-7461, 2001c.
- EATON, K.A.; MORGAN, D.R.; KRAKOWKA, S. - Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. **J. Med. Microbiol.** **7(2)**:123-127, 1992.
- EATON, K.A.; RINGLER, S.S.; KRAKOWKA, S. - Vaccination of gnotobiotic piglets against *Helicobacter pylori*. **J. Infect. Dis.** **178**:1399-1405, 1998.
- EATON, K.A.; SUERBAUM, S.; JOSEHANS, C.; KRAKOWKA, S. - Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. **Infect. Immun.** **64(7)**:2445-2448, 1996.
- ELIZALDE, J.I.; GÓMEZ, J.; GINÉS, A.; LACH, J.; PIQUE, J.M.; BORDAS, J.M.; MARCO, F.; TERES, J. - Biopsy forceps disinfection technique does not influence *Helicobacter pylori* culture. **Am. J. Gastroenterol** **93(9)**:1450-1452, 1998.
- EL-ZAATARI, F.A.K.; WOO, J.S.; BADR, A.; OSATO, M.S.; SERNA, H.; LICHTEN BERGER, L.M.; GENTA, R.M.; GRAHAM, D.Y. - Failure to isolate *Helicobacter pylori* from stray cats indicates that *H. pylori* in cats may be an anthroponosis - an animal infection with an human pathogen. **J. Med Microbiol.** **46**:372-376, 1997.

- EL-ZIMAITY, H.M.; GRAHAM, D.Y.; al-ASSI, M.T.; MALATY, H.; KARTTUNEN, T.J.; GRAHAM, D.P.; HUBERMAN, R.M.; GENTA, R.M. - Interobserver variation in the histopathological assessment of *Helicobacter pylori* gastritis. **Hum. Pathol.** **27**:35-41, 1996.
- ENGSTRAND, L.; ROSBERG, K.; HUBINETTE, R.; BERGLINDH, T.; ROLFSEN, W.; GUSTAVSSON, S. - Topographic mapping of *Helicobacter pylori* colonization in long-term-infected pigs. **Infect. Immun.** **60**(2):653-656, 1992.
- ESTEVEES, M.I.; SCHRENZEL, M.D.; MARINI, R.P.; TAYLOR, N.S.; XU, S.; HAGEN, S.; FENG, Y.; SHEN, Z.; FOX, J.G. - *Helicobacter pylori* gastritis in cats with long term natural infection as a model of human disease. **Am. J. Pathol.** **156**(2):709-721, 2000.
- EULER, A.R.; ZURENKO, G.E.; MOE, J.B.; ULRICH, R.G.; YAGI, Y. - Evaluation of two monkey species (*Macaca mulatta* and *Macaca fascicularis*) as possible models for human *Helicobacter pylori* disease. **J. Clin. Microbiol.** **28**(10):2285-2290, 1990.
- FALLONE, C.A.; ELISOV, M.; CLELAND, J.A.; THOMPSON, J.A.; WILD, G.E.; LOUGH, J.; FARIA, J.; BARKUN, A.N. - Detection of *Helicobacter pylori* infection by saliva IgG testing. **Am. J. Gastroenterol.** **91**:1145-1149, 1996.
- FAN, X.G.; CHUA, A.; FAN, X.J.; KELLING, P.W.N. - Increased gastric production of interleukin-8 and tumor necrosis factor in patients with *Helicobacter pylori* infection. **J. Clin. Pathol.** **48**:133-136, 1995.
- FANDRIKS, L.; von BOTHMER, C.; JOHANSSON, B.; HOLM, M.; BOLIN, I.; PETTERSSON, A. - Water extracts of *Helicobacter pylori* inhibits duodenal mucosal alkaline secretion in anesthetized rats. **Gastroenterology** **113**(5):1570-1575, 1997.
- FANTY, L.; MEZZI, G.; CAVALLERO, A.; GESU, G.; BONATO, C.; MASCI, E. - A new simple immunoassay for detecting *Helicobacter pylori* infection: antigen in stool specimens. **Digest.** **60**(5):456-460, 1999.

- FANTRY, G.T.; ZHENG, Q.X.; JAMES, S.P. - Conventional cleaning and disinfection techniques eliminate the risk of endoscopic transmission of *Helicobacter pylori*. **Am. J. Gastroenterol.** 90:227-232, 1995.
- FIGURA, N. - Mouth-to-mouth resuscitation and *Helicobacter pylori* infection. **Lancet** 347:1342, 1996.
- FIGURA, N. - *Helicobacter pylori* factors involved in the development of gastroduodenal mucosa damage and ulceration. **J. Clin. Gastroenterol.** 25 (Suppl 1) : S149-163, 1997.
- FIGURA, N.; VINDIGNI, C.; PRESENTI, L; et al.- New acquisitions in *Helicobacter pylori* characteristics. **Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.** 30 (Suppl 3) : S254-258, 1998.
- FINEGOLD, S. M. & MARTIN, W.J. - **Diagnostic Microbiology**. 6^o edition. Toronto, The C. V. Mosby Company, 1982.
- FIOCCA, R.; LUINETTI, L.; VILLANI, A.M.; CHIARAVALLI, A.M.; CAPELLA, C.; SOLCIA, E - Epithelial cytotoxicity, immune responses and inflammatory components of *Helicobacter pylori* gastritis. **Scand. J. Gastroenterol.** 29 (Suppl. 205) : 11-21, 1994.
- FOLEY, J.E.; MARKS, S.L.; MUNSON, L.; MELLI, ^a; DEWHRIST, F.E.; YU, S.; SHEN, Z.; FOX, J.G. - Isolation of *Helicobacter canis* from a colony of bengal cats with endemic diarrhea. **J. Clin. Microbiol.** 37(10):3271-3275, 1999.
- FORNE, M.; DOMINGUEZ, J.; FERNANDEZ-BANARES, F.; LITE, J.; ESTEVE, M.; GALI, N.; ESPINOS, J.C.; QUINTANA, S.; VIVER, J.M. - Accuracy of an enzyme immunoassay for the detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens in the diagnosis of infection and posttreatment check-up. **Am. J. Gastroenterol.** 95(9):2200-2205, 2000.
- FOX, J.G. - Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. - **Aliment. Pharmacol. Ther.** 9 (Suppl 2) : 93-103, 1995.

- FOX, J.G. - The expanding genus of *Helicobacter*: pathogenic and zoonotic potential. **Semin. Gastrointest. Dis.** **8(3)**:124-141, 1997.
- FOX, J.G.; BATCHELDER, M.; MARINI, R.; YAN, L.; HANDT, L.; LI, X.; SHAMES, B.; HAYWARD, A.; CAMPBELL, J.; MURPHY, J.C. - *Helicobacter pylori*-induced gastritis in the domestic cat. **Infect. Immun.** **63(7)**:2674-2681, 1995a.
- FOX, J.G.; BECK, P.; DANGLER, C.A.; WHARRY, M.T.; WANG, T.C.; SHI, H.N.; NAGLER-ANDERSON, C. - Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. **Nat. Med.** **6(5)**:536-542, 2000.
- FOX, J.G.; CORREA, P.; TAYLOR, N.; LEE, A.; OTTO, G.; MURPHY, J.C.; ROSE, R. - *Helicobacter mustelae*-associated gastritis in ferrets: an animal model of *Helicobacter pylori* gastritis in humans. **Gastroenterology** **99**:352-361, 1990.
- FOX, J.G.; HANDT, L.; SHEPPARD, B.J.; XU, S.; DEWHRIST, F.E.; 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.** **39(4)**:1580-1585, 2001a.
- FOX, J.G.; HANDT, L.; XU, S.; SHEN, Z.; DEWHRIST, F.E.; PASTER, B.J.; DANGLER, C.A.; LODGE, K.; MOTZEL, S.; KLEIN, H. - Novel *Helicobacter* species isolated from rhesus monkeys with chronic idiopathic colitis. **J. Med. Microbiol.** **50(5)**:421-429, 2001b.
- FOX, J.G. & LEE, A. - The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals. **Lab. Anim. Sci.** **47(3)**:222-255, 1997.
- FOX, J.G.; PERKINS, S.; YAN, L.; SHEN, Z.; ATTARDO, L.; PAPPO, J. - Local immune response in *Helicobacter pylori*-infected cats and identification of *H. pylori* in saliva, gastric fluids and faeces. **Immunology** **88(3)**:400-406, 1996.

- FOX, J.G.; YAN, L.L.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; SHAMES, B.; MURPHY, J.C.; HAYWARD, A.; BELCHER, J.C.; MENDES, E.N. - *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. **J. Clin. Microbiol.** **33**(2):445-454, 1995b.
- FRANKLIN, C.L.; RILEY, L.K.; LIVINGSTON, R.S.; BECKWITH, C.S.; BESCH-WILIFORD, C.L.; HOOK, R.R. Jr - Enteric lesions in SCID mice infected with "*Helicobacter typhlonicus*", a novel urease-negative *Helicobacter* species. **Lab. Anim. Sci.** **49**(5):496-505, 1998.
- FUJIOKA, T.; KODAMA, R.; HONDA, S.; GUEI-HUA, G.; NISHIZONO, A.; NASU, M. - Long-term sequelae of experimental gastritis with *Helicobacter pylori*: a 5-year follow-up study. **J. Clin. Gastroenterol.** **25** (Suppl 1) : S8-12, 1997.
- FUJISAWA, T.; KANEKO, T.; KUMAGAI, T.; AKAMATSU, T.; KATSUYAMA, T.; KIYOSAWA, K.; TACHIKAWA, T.; KOSAKA, O.; MACHIKAWA, F. - Evaluation of urinary rapid test for *Helicobacter pylori* in general practice. **J. Clin. Lab. Anal.** **15**(3):154-159, 2001.
- GE, Z.; DOIG, P.; FOX, J.G. - Characterization of proteins in the outer membrane preparation of a murine pathogen, *Helicobacter bilis*. **Infect. Immun.** **69**(5):3502-3506, 2001.
- GE, Z.; WHITE, D.A.; WHARY, M.T.; FOX, J.G. - Fluorogenic PCR-based quantitative detection of a murine pathogen, *Helicobacter hepaticus*. **J. Clin. Microbiol.** **39**(7):2598-2602, 2001.
- GENTA, R.M. & GRAHAM, D.Y. - Comparison of biopsy sites for the histopathological diagnosis of *Helicobacter pylori*. A topographic study of *H. pylori* density and distribution. **Gastrointest. Endosc.** **40**:342-345, 1994.
- GENTA, R.M.; ROBASON, G.O.; GRAHAM, D.Y. - Simultaneous visualization of *Helicobacter pylori* and gastric morphology: a new stain. **Hum. Pathol.** **25**:221-226, 1994.

- GHIARA, P.; MARCHETTI, M.; BLASER, M.J.; TUMMURU, M.K.; COVER, T.L.; SEGAL, E.D.; TOMPKINS, L.S.; RAPPUOLI, R. - Role of *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, *cagA*, and urease in a mouse model of disease. **Infect. Immun.** **63(10)**:4154-4160, 1995.
- GIONCHETTI, P.; VAIRA, B.; CAMPIERI, M.; HOLTON, J.; MENEGATTI, M.; BELLUZZI, A.; BERTINELLI, E.; FERRETI, M.; BRIGNOLA, C.; MIGLIOLI, M. - Enhanced mucosal interleukin-6 and --8 in *Helicobacter pylori* -positive dyspeptic patients. **Am. J. Gastroenterol.** **89**:883-887, 1994.
- GOODWIN, C.S.; ARMSTRONG, J.A.; CHILVERS, T. P.; WEE, S.H. - 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.** **39**:397-405, 1989.
- GOODWIN, C.S.; McCULLOCH, R.K.; ARMSTRONG, J.A.; WEE, S.H. - Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a spiral bacterium (*C. pyloridis*). **J. Med. Microbiol.** **19**:257-267, 1985.
- GOTO, K.; OHASHI, H.; TAKAKURA, A.; ITOH, T. - Current status of *Helicobacter* contamination of laboratory mice, rats, gerbils, and house musk shrews in Japan. **Curr. Microbiol.** **41(3)**:161-166, 2000.
- GREEN, W.B.; EATON K., KRAKOWKA, S. - Porcine gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT): stimulation by colonization with the gastric bacterial pathogen, *Helicobacter pylori*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** **56(1-2)**:119-131, 1997.
- GRUBEL, P.; HOFFMAN, J.S.; CHONG, F.K.; BURSTEIN, N.A.; MEPANI, C.; CAVE, D.R. - Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. **J. Clin. Microbiol.** **35**:1300-1303, 1997.

- GUY, B.; HESSLER, C.; FOURAGE, S.; ROKBI, B.; MILLET, M.J. - Comparison between targeted and untargeted systemic immunization with adjuvant urease to cure *Helicobacter pylori* infection in mice. **Vaccine** 17(9-10):1130-1135, 1999.
- GURUGE, J.L.; FALK, P.G.; LORENZ, R.G.; DANS, M.; WIRTH, H.P.; BLASER, M.J.; BERG, D.E.; GORDON, J.I. - Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 95:3925-3930, 1998.
- GZYL, A.; DZIERZANOWSKA, D.; ROZYNEK, E.; CELINSKA-CEDRO, D.; DURA, W.; BERG, D.E. - PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Polish children and adults. **J. Med. Microbiol.** 48(4):349-356, 1999.
- HACHEN, C.Y.; CLARRIDGE, J.E.; EVANS, D.G.; EVANS, D.Y.; GRAHAM, D.Y. - Comparison of agar based media for primary isolation of *Helicobacter pylori*. **J. Clin. Pathol.** 48:714-716, 1995.
- HAINES, D.C.; GORELICK, P.L.; BATTLES, J.K.; PIKE, K.M.; ANDERSON, R.J.; FOX, J.G.; TAYLOR, N.S.; SHEN, Z.; DEWHRIST, F.E.; ANVER, M.R.; WARD, J.M. - Inflammatory large bowel disease in immunodeficient rats naturally and experimentally infected with *Helicobacter bilis*. **Vet. Pathol.** 35(3):202-208, 1998.
- HANDT, L.K.; FOX, J.G.; DEWHRIST, F.E.; FRASER, G.J.; PASTER, B.J.; YAN, L.L.; ROZMIAREK, H.; RUFO, R.; STALIS, I.H. - *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. **Infect. Immun.** 62(6):2367-2374, 1994.
- HANDT, L.K.; FOX, J.G.; STALIS, I.H.; RUFO, R.; LEE, G.; LINN, J.; LI, X.; KLEANTHOUS, H. - Characterization of feline *Helicobacter pylori* strains and associated gastritis in a colony of domestic cats. **J. Clin. Microbiol.** 33(9):2280-2289, 1995.
- HANDT, L.K.; FOX, J.G.; YAN, L.L.; SHEN, Z.; POUCH, W.J.; NGAI, D.; MOTZEL, S.L.; NOLAN, T.E.; KLEIN, H.J. - Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in a colony of rhesus monkeys. **J. Clin. Microbiol.** 35(1):165-168, 1997.

- HANSEN, P.S.; GO, M.F.; VARMINING, K.; ANDERSEN, L.P.; GRAHAM, D.Y.; NIELSEN, H. - Proinflammatory activation of neutrophils and monocytes by *Helicobacter pylori* is not associated with *cagA*, *vacA* or *picB* genotypes. **APMIS** **107(12)**:117-1123, 1999.
- HAPPONEN, I.; LINDEN, J.; SAARI, S.; KARJALAINEN, M.; HANNINEN, M.L.; JALAVA, K.; WESTERMARCK, E. - Detection and effects of helicobacters in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **313(12)**:1767-1774, 1998.
- HAPPONEN, I.; LINDEN, J.; WESTERMARCK, E. - Effect of triple therapy on eradication of canine gastric helicobacters and gastric disease. **J. Small. Anim. Pract.** **41(1)**:1-6, 2000.
- HARRIS, P.R.; MOBLEY, H.L.; PEREZ-PEREZ, G.I.; BLASER, M.J.; SMITH, F.D. - *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. **Gastroenterology** **111**:419-425, 1996.
- HARRIS, P.R.; SMYTHIES, L.E.; SMITH, P.D.; DUBOIS, A. - Inflammatory cytokine mRNA expression during early and persistent *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates. **J. Infect. Dis.** **181(2)**:783-786, 2000.
- HO, B. & MARSHALL, B.J. - Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Serologic testing. **Gastroenterol. Clin. North. Am.** **29(4)**:853-862, 2000.
- HO, S.A.; HOYLE, J.A.; LEWIS, F.A.; SECKER, A.D.; CROSS, D.; MEPSTONE, N.P.; DIXON, M.F.; WYATT, J.I.; TOMPKINS, D.S.; TAYLOR, GR, et al. - Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. **J. Clin. Microbiol.** **29(11)**:2543-2549, 1991.
- HONDA, K.; OHKUSA, T.; TAKASHIMIZU, I.; WATANABE, M.; AMAGASA, M. - High risk of *Helicobacter pylori* infection in young Japanese dentists. **J. Gastroenterol. Hepatol.** **16(8)**:862-865, 2001.

- HOPKINS, R.J.; VIAL, P.A.; FERRECCIO, C.; OVALLE, J.; PRADO, P.; SOTOMAYOR, V.; RUSSEL, R.G.; WASSERMAN, S.S.; MORRIS, J.G. Jr. - Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. **J. Infect. Dis.** **168**:222-226, 1993.
- HUA, J.; YEOH, K.G.; NG, H.C.; ZHENG, P.Y.; LIM, S.G.; HO, B. - Improving the success of culturing *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. **Microbios** **96(384)**:95-101, 1998.
- van der HULST, R.W.; VERHEUL, S.B.; WEEL, J.F.; GERRITS, Y.; tem KATE, F.J.; DANKERT, J.; TYTGAT, G.N. - Effect of specimen collection techniques, transport media, and incubation of cultures on the detection rate of *Helicobacter pylori*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** **15(3)**:211-215, 1996.
- HULTEN, C.; HAN, S.W.; ENROTH, H.; KLEIN, P.; OPEKUN, A. R.; GILMAN, R.H.; EVANS, D.G.; ENGSTRAND, L.; GRAHAM, D.Y.; EL-ZAATARI, F.A.K. - *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. **Gastroenterology** **110**:1031-1035, 1996.
- IGUCHI, M.; SHIOTANI, A.; NISHIOKA, S. - *Helicobacter pylori* infection reduces intraluminal nitric oxide. **Scand. J. Gastroenterol.** **35(7)**:694-698, 2000.
- IKENO, T.; OTA, H.; SUGIYAMA, A.; ISHIDA, K.; KATSUYAMA, T.; GENTA, R.M.; KAWASAKI, S. - *Helicobacter pylori*-induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils. **Am. J. Pathol.** **154(3)**:951-60, 1999.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, WHO. **Infection with *Helicobacter pylori***. In: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon: IARC, 1994: 177-202.
- ISHIHARI, S.; FUKUDA, R.; FUKUMOTO, S. - Cytokine gene expression in the gastric mucosa: its role in chronic gastritis. **J. Gastroenterol.** **31**:485-490, 1996.

- ISHIKAWA, H.; ITO, H.; HIGAKI, M.; HIGAKI, M.; MATSUMOTO, Y.; KAMIMURA, T.; KATSURA, Y.; TOMISHI, T.; INOVE, Y.; TAKASUGI, H.; TOMOI, M.; KRAKOWKA, S.; YOSHIDA, K. - FR145715, a novel histamine H₂ receptor antagonist, with specific anti-*Helicobacter pylori* activities. **Eur. J. Pharmacol.** **378(3)**:299-310, 1999.
- ISOGAI, H.; ISOGAI, E.; HAYASHI, S.; KIMURA, K.; KUBOTA, T.; FUJII, N.; OGUMA, K. - Experimental *Helicobacter pylori* infection in association with other bacteria. **Microbiol. Immunol.** **41(4)**:361-365, 1997.
- ISOGAI, H.; ISOGAI, E.; KIMURA, K.; FUJII, N.; YOKOTA, K.; OGUMA, K. - *Helicobacter pylori* induces inflammation in mouse urinary bladder and pelvis. **Microbiol. Immunol.** **38(5)**:331-336, 1994.
- JANAS, B.; CZKWIANIANC, E.; BAK-ROMANISZYN, L.; et al. - Electron microscopy study of association between coccoid forms of *Helicobacter pylori* and gastric epithelial cells. **Am. J. Gastroenterol.** **90(10)**:1929-1833, 1995.
- JAUP, B.H.; STENQUIST, B.; BRANDBERG, A. - *Helicobacter pylori* culture from a positive, liquid-based urease test for a routine clinical use: a cost-effective approach. **Helicobacter** **5(1)**:22-23, 2000.
- JENKS, P.J.; FERRERO, R.L.; TANKOVIC, J.; THIBERGE, J.M.; LABIGNE, A. - Evaluation of nitrofurantoin combination therapy of metronidazole-sensitive and -resistant *Helicobacter pylori* infections in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.** **44(10)**:2623-2329, 2000.
- JIANG, H.X.; PU, H.; HUH, N.H.; YOKOTA, K.; OGUMA, K.; NAMBA, M. - *Helicobacter pylori* induces pepsinogen secretion by rat gastric cells in culture via a cAMP signal pathway. **Int. J. Mol. Med.** **7(6)**:625-629, 2001.
- KABIR, A.M.A.; AIBA, Y.; TAKAGI, A.; KAMIYA, S.; MIWA, T.; KOGA, Y. - Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lacobacilli in a gnotobiotic murine model. **Gut** **41**:49-55, 1997.

- KABIR, S. - Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. **J. Med. Microbiol.** **50(12)**:1021-1029, 2001.
- KALDOR, J.; TEE, W.; MCCARTHY, P.; DWYER, B. - Immune response to *Campylobacter pyloridis* in patients with peptic ulcerations. **Lancet** **1(8434)**: 921, 1985.
- KALDOR, J.; TEE, W.; NICOLACOPOLUS, C.; DEMIRTZOGLU, K.; NOONAN, D.; DWYER, B. - Immunoblot confirmation of immune response to *Campylobacter pyloridis* in patients with duodenal ulcers. **Med. J. Aust.** **145**:133-135, 1986.
- KALIA, N.; BARDHAN, K.D.; REED, M.W.; JACOB, S.; BROWN, N.J. - Effects of chronic administration of *Helicobacter pylori* extracts on rat gastric mucosal microcirculation in vivo. **Dig. Dis. Sci.** **45(7)**:1343-1351, 2000.
- KAMRADT, A.E.; GREINER, M.; GHIARA, P.; KAUFMANN, S.H. - *Helicobacter pylori* infection in wild-type and cytokine-deficiente C57BL/6 and BALB/C mouse mutants. **Microbes Infect.** **2(6)**:593-597, 2000.
- KARITA, M.; LI, Q.; CANTERO, D.; OKITA, K. - Establishment of a small animal model for human *Helicobacter pylori* infection using germ-free mouse. **Am. J. Gastroenterol** **89(2)**:208-213, 1994.
- KARITA, M.; KOUCHIYAMA, T.; OKITA, K.; NAKAZAWA, T. - New small animal model for human gastric *Helicobacter pylori* infection: success in both nude and euthymic mice. **Am. J. Gastroenterol.** **86(11)**:1596-1603, 1991.
- KARITA, M.; LI, Q.; OKITA, K. - Evaluation of new therapy for eradication of *H. pylori* infection in nude mouse model. **Am. J. Gastroenterol.** **88(9)**:1366-1372, 1993.
- KARNES, W.E.; SAMLOFF, Jr. I.M.; SIURALA, M.; KEKKI, M.; SIPPONEN, P.; KIM, S.W.; WALSH, J.H. - Positive serum antibody and negative tissue staining for *Helicobacter pylori* in subjects with atrophic body gastritis. **Gastroenterol.** **101**:167-174, 1991.

- KARTTUNEN, R.; KARTTUNEN, T.; EKRE, H.P.T.; MacDONALD, T.T. - Interferon gamma and interleukin-4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. **Gut** **36**:341-345, 1995.
- KARTTUNEN, T. J.; NIEMELA, S.; KEROLA, T. - Blood leukocyte differential in *Helicobacter pylori* infection. **Dig. Dis. Sci.** **41**(7):1332-1336, 1996.
- KATAOKA, M.; HIRATA, K.; KUNIRATA, T.; USHIO, S.; IWAKI, K.; OHASHI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. - Antibacterial action of tryptanthrin and kaempferol, isolated from the indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.), against *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. **J. Gastroenterol.** **36**(1):5-9, 2001.
- KATO, M.; ASAKA, M.; SAITO, M.; SKINE, H.; OHARA, S.; TOYOTA, T.; AKAMATSU, T.; KANEKO, T.; KIYOSAWA, K.; NISHIZAWA, O.; KUMAGAI, T.; KATSUYAMA, T.; ABE, M.; KOSAKA, M.; HARIYA, S.; MINAMI, K.; SANAI, Y.; SAWAMURA, M.; TACHIKAWA, T. - Clinical usefulness of urine-based enzyme-linked immunoabsorbent assay for detection of antibody to *Helicobacter pylori*: a collaborative study in nine medical institutions in Japan. **Helicobacter** **5**(2):109-119, 2000.
- KAWAHARA, T.; KUWANO, Y.; TESHIMA-KONDO, S.; SUGIYAMA, T.; KAWAI, T.; NIKAWA, T.; KISHI, K.; ROKUTAN, K. - *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide from type I, but not type II strains, stimulates apoptosis of cultured gastric mucosal cells. **J. Med. Invest.** **48**(3-4):167-174, 2001.
- KETO, Y.; TAKAHASHI, S.; OKABE, S. - Healing of *Helicobacter pylori*-induced gastric ulcers in Mongolian gerbils: combined treatment with omeprazole and clarithromycin. **Dig. Dis. Sci.** **44**(2):257-265, 1999.
- KHANOLKAR-GAITONDE, S.S.; REUBISH, G.K.; LEE, C.K.; et al. - Isolation of bacteria other than *Helicobacter pylori* from stomachs of squirrel monkeys (*Saimiri* spp.) with gastritis. **Dig. Dis. Sci.** **45**(2):272-280, 2000.

- KIM, J.S.; CHANG, J.H.; CHUNG, S.I.; YUM, J.S. - Importance of the host genetic background on immune responses to *Helicobacter pylori* infection and therapeutic vaccine efficacy. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** **31(1)**:41-46, 2001.
- KIM, J.S.; JUNG, H.C.; KIM, J.M.; SONG, I.S.; KIM, C.Y. - Interleukin-8 expression by human neutrophils activated by *Helicobacter pylori* soluble proteins. **Scand. J. Gastroenterol.** **33**:1249-1255, 1998.
- KITSOS, C.M.; STADTLANDER, C.T. - *Helicobacter pylori* in liquid culture: evaluation of growth rates and ultrastructure. **Curr. Microbiol.** **37(2)**:88-93, 1998.
- KISS, J.; LAMARQUE, D.; MORAN, A.P.; POZSR, J.; MORSCHL, E.; LASZLO, F.; WHITTLE, B.J. - *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide injury to rat gastroduodenal microvasculature involves inducible nitric oxide synthase. **Eur. J. Pharmacol.** **420(2-3)**:175-179, 2001.
- KITAGAWA, M.; NATORI, M.; KATOH, M.; SUGIMOTO, K.; OMI, H.; AKIYAMA, Y.; SAGO, H. - Maternal transmission of *Helicobacter pylori* in the perinatal period. **J. Obstet. Gynaecol. Res.** **27(4)**:225-230, 2001.
- KOBAYASHI, H.; KAMIYA, S.; SUZULI, T.; KOHDA, K.; MURAMATSU, S.; KURUMADA, T.; OHTA, U.; MIYAZAWA, M.; KIMURA, N.; MUTOH, N.; SHIRAI, T.; TAKAGI, A.; HARASAWA, S.; TANI, N.; MIWA, T. - The effect of *Helicobacter pylori* on gastric acid secretion by isolated parietal cells from a guinea pig. Association with production of vacuolating toxin by *H. pylori*. **Scand. J. Gastroenterol.** **31(5)**:428-433, 1996.
- KODAMA, R.; FUJIOKA, T.; SHUTO, R.; et al. - *Helicobacter pylori* infection delays the healing of acetic acid-induced ulcer in Japanese monkeys. **J. Gastroenterol. Hepatol.** **11(11)**:1097-1102, 1996.

- KOLETZKO, S.; HAISCH, M.; SEEBOTH, I.; BRADEN, B.; HENGELS, K.; KOLETZKO, B.; HERING, P. - Isotope-selective non-dispersive infrared spectrometry for detection of *Helicobacter pylori* infection with ^{13}C -urea breath test. **Lancet** **345**:961-962, 1995.
- KONSTANTOPOULOS, N.; RUSSMANN, H.; TASCH, C.; SAUERWALD, T.; DEMMELMAIR, H.; AUTENRIETH, I.; KOLETZKO, S. **Am. J. Gastroenterol.** **96**(3):677-683, 2001.
- KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; KARCZEWSKA, E.; DUDA, A.; BIELANSKI, W.; HAHN, E.G.; KONTUREK, S.J. - Water extracts of *Helicobacter pylori* suppress the expression of histidine decarboxylase and reduce histamine content in the rat gastric mucosa. **Digestion** **62**(2-3):100-109, 2000a.
- KONTUREK, S.J.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; KWIECIEN, S.; KARCZEWSKA, E.; DROZDOWICZ, D.; STACHURA, J.; HAHN, E.G. - *Helicobacter pylori* infection delays healing of ischaemia-reperfusion induced gastric ulcerations: new animal model for studying pathogenesis and therapy of *H. pylori* infection. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.** **12**(12):1299-1313, 2000b.
- KRAKOWKA, S.; EATON, K.A.; LEUNK, R.D. - Antimicrobial therapies for *Helicobacter pylori* infection in gnotobiotic piglets. **Antimicrob. Agents Chemother.** **42**(7):1549-1559, 1998.
- KRAKOWKA, S.; EATON, K.A.; RINGS, D.M. - Occurrence of gastric ulcers in gnotobiotic piglets colonized by *Helicobacter pylori*. **Infect. Immun.** **63**(6):2352-2355, 1995.
- KRAKOWKA, S.; MORGAN, D.R.; KRAFT, W.G.; LEUNK, R.D. - Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. **Infect. Immun.** **55**:2789-2796, 1987.

- KRAKOWKA, S.; RINGLER, S.S.; EATON, K.A.; GREEN, W.B.; LEUNK, R. - Manifestations of the local gastric immune response in gnotobiotic piglets infected with *Helicobacter pylori*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** **52(3)**:159-173, 1996.
- KUMAGAI, T.; YAN, J.; GRAHAM, D.Y.; TOZUKA, M.; OKIMURA, Y.; IKENO, T.; SUGIYAMA, A.; KATSUYAMA, T.; OTA, H. - Serum immunoglobulin G immune response to *Helicobacter pylori* antigens in Mongolian gerbils. **J. Clin. Microbiol.** **39(4)**:1283-1288, 2001.
- KUSTERS, J.G.; GERRITS, M.M.; VAN STRIJP, J.A.G.; VANDERBROUCHE-GRAULS, C.M. - Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. **Infec. Immun.** **65(9)**:3672-3979, 1997.
- KUSUHARA, H.; HIRAYAMA, F.; MATSUYUKI, H.; HISADOME, M.; IKEDA, Y. - Evaluation of combined antibiotic-omeprazole therapies in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. **J. Gastroenterol.** **33(1)**:14-7, 1998.
- LAGE, A.P.; GODFROID, E.; FAUCONNIER, A.; BURETTE, A.; BUTZLER, J.P.; BOLLEN, A.; GLUPEZYNSKI, Y. - Diagnosis of *Heliconacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. **J. Clin. Microbiol.** **33**:2752-2756, 1995.
- LAINE, L.; LEWIN, D.N.; NARITOKU, W.; COHEN, H. - Prospective comparison of H&E, Giemsa and Genta stains for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. **Gastrointest. Endosc.** **45**:463-467, 1997.
- LAINE, L.; LEWIN, D.; NARITOKU, W.; ESTRADA, R.; COHEN, H. - Prospective comparison of commercially available rapid urease tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. **Gastrointest. Endosc.** **44**:523-526, 1996a.
- LAMARQUE, D.; KISS, J.; TANKOVIC, J.; FLEJOU, J.F.; DELCHIER, J.C.; WHITTLE, B.J. - Induction of nitric oxide synthase in vivo and cell injury in rat duodenal epithelium by a water soluble extract of *Helicobacter pylori*. **Br. J. Pharmacol.** **123(6)**:1073-1078, 1998.

- LAMARQUE, D.; MORAN, A.P.; SZEPE, Z.; DELCHIER, J.C.; WHITTLE, B.J. - Cytotoxicity associated with induction of nitric oxide synthase in rat duodenal epithelial cells in vivo by lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* inhibition by superoxide dismutase. **Br. J. Pharmacol.** **130(7)**:1531-1538, 2000.
- LAMBERT, J.R.; BORROMEO, M.; PINKARD, K.J.; TURNER, H.; CHAPMAN, C.B.; SMITH, M.L. - Colonization of gnotobiotic piglets with *Campylobacter pyloridis* - an animal model? [letter]. **J. Infect. Dis.** **155**:1344, 1987.
- LAMBERT, I.; CLYNE, M.; DRUMM, B. - *H. pylori* in dental plaque. **Lancet** **341**:957, 1993.
- LEE, A.; O' ROURKE, J.; DE UNGRIA, M.; ROBERTSON, B.; DASKALOPOULOS, G.; DIXON, M.F. - A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. **Gastroenterology** **112**:1386-1397, 1997.
- LEE, C.K. - Vaccination against *Helicobacter pylori* in non-human primate models and humans. **Scand. J. Immunol.** **53(5)**:437-442, 2001.
- LEE, C.K.; SOIKE, K.; GIANNASCA, P.; WELTZIN, R.; KLEANTHOUS, H.; BLANCHARD, J.; MONATH, T.P. - Immunization of rhesus monkeys with a mucosal prime, parenteral boost strategy protects against infection with *Helicobacter pylori*. **Vaccine** **17(23-24)**:3072-3082, 1999a.
- LEE, C.K.; SOIKE, K.; HILL, J.; GEORGAKOPOULOS, K.; TIBBITTS, T.; INGRASSIA, J.; GRAY, H.; BOHEN, J.; KLEANTHOUS, H.; GIANNASCA, P.; ERMAT, T.; WELTZIN, R.; BLANCHARD, J.; MONATH, T.P. - Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease decreases colonization levels following experimental infection of rhesus monkeys. **Vaccine** **17(11-12)**:1493-1505, 1999b.
- LEE, M.H.; ROUSSEL, Y.; WILKS, M.; TABAQCHALI, S. - Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice. **Vaccine** **19(28-29)**:3927-3935, 2001.

- LEHMANN, F.S.; SCHILLER, N.; IWAHO, E.; et al. et al. - Virulence factors of *Helicobacter pylori* affecting its gastric colonization in Mongolian gerbils. **J. Gastroenterol.** **34** (Suppl 11) : 47-54, 1999.
- LI, C.F.; HA, T.Z.; FERGUSON, D.A.; CHI, D.S.; ZHAO, R.G.; PATEL, N.R.; KRISHNASWAMY, G.; THOMAS, E. - A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and faeces - evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. **Dig. Dis. Sci.** **41**:2142-2149, 1996.
- LI, H.; KALIES, B.; MELLGARD, B.; HELANDER, H.F. - A rat model of chronic *Helicobacter pylori* infection. **Scand. J. Gastroenterol.** **33**:370-378, 1998.
- LIN, C.W.; WANG, H.H.; CHANG, Y.F.; CHENG, K.S. - Evaluation of CLO test and polymerase chain reaction for biopsy-dependent diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **J. Microbiol. Immunol. Infect.** **30**(4):219-227, 1997.
- LINDHOLM, C.; QUIDING-JARBRINK, M.; LONROTH, H.; SVENNERHOLM, A.M. - Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. **Infect. Immun.** **66**(12):5964-5971, 1998.
- LINDKVIST, P.; ASRAT, D.; NILSSON, I.; TSEGA, E.; OLSSON, G.L.; WRETTLIND, B.; GIESECKE, J. - Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: comparison of high and a low prevalence country. **Scand. J. Infect. Dis.** **28**(2):181-184, 1996.
- LINDKVIST, P.; ENQUSELASSIE, F.; ASRAT, D.; MUHE, L.; NILSSON, I.; GIESECKE, J. - Risk factors for infection with *Helicobacter pylori* - a study of children in rural Ethiopia. **Scand. J. Infect. Dis.** **30**(4):371-376, 1998.
- LOGAN, R.P.H. - Detection of *Helicobacter pylori* by the ¹³C-urea Breath Test. In: RATHBONE, B.J. & HEATLEY, R.V. - *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease. Londres, Blackweel Scientific Publications, 1992, p.88-106.
- LOY, C.T.; IRWING, L.M.; KATELARIS, P.H.; TALLEY, N.J. - Do commercial serological kits for *Helicobacter pylori* infection differ in their accuracy? A meta-analysis. **Am. J. Gastroenterol.** **91**:1138-1144, 1996.

- LUZZA, F.; IMENEO, M.; MALETTA, M.; PALUCCIO, G.; AVISTICO, S.; PERTICONE, F.; FOCA, A.; PALLONE, F. - Sugestion against an oral-oral route of transmission for *Helicobacter pylori* infection: a seroepidemiological study in a rural area. **Dig. Dis. Sci.** **43(7)**:1488-1492, 1998.
- LUZZA, F.; MANCUSO, M.; IMENEO, M.; CONTALDO, A.; GIANCOTTI, L.; PENSABENE, L.; DOLDO, P.; LIBERTO, M.C.; STRISCIUGLIO, P.; FOCA, A.; GUANDALINI, S.; PALLONE, F. - Evidence favouring the gastric-oral route in the transmission of *Helicobacter pylori* infection in children. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.** **12(6)**:623-627, 2000.
- MABE, K.; YAMADA, M.; OGUNI, I.; TAKAHASHI, T. - In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. **Antimicrob. Agents. Chemother.** **43(7)**:1788-1791, 1999.
- MACCHIA, G.; MASSONE, A.; BURRONI, D.; COVACCI, A.; CENSINI, S.; RAPPUOLI, R. - The HSP60 protein of *Helicobacter pylori* structure and immune response in patients with gastroduodenal diseases. **Mol. Microbiol.** **9(3)**:645-652, 1993.
- MAEDA, S.; KANAI, F.; OGURA, K.; YOSHIDA, H.; TSUNEO, I.; TAKAHASHI, M.; KAWABE, T.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. - High seropositivity of anti-CagA antibody in *Helicobacter pylori*-infected patients irrelevant to peptic ulcers and normal mucosa in Japan. **Dig. Dis. Sci.** **42(9)**:1841-1847, 1997.
- MAKINO, M.; KOGA, T.; ITO, K.; KAWADA, H.; TABATA, K. - Delayed healing of chronic gastric ulcer after *Helicobacter pylori* infection in mice. **J. Pharm. Pharmacol.** **50**:943-948, 1998.
- MALATY, H.M.; KIM, J.G.; KIM, S.D.; GRAHAM, D.Y. - Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Korean children: inverse relation to socioeconomic status despite a uniformly high prevalence in adults. **Am. J. Epidemiol.** **143(3)**:257-262, 1997.

- MANES, G.; BALZANO, A.; IAQUINTO, G.; RICCI, C.; PICCIRILLO, M.M.; GIARDULLO, N.; TODISCO, A.; LIONIELLO, M.; VAIRA, D. - Accuracy of the stool antigen test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection before treatment and in patients on omeprazole therapy. **Aliment. Pharmacol. Ther.** **15(1)**:73-79, 2001.
- MARCHETTI, M.; ARICÒ, B.; BURRONI, D.; FIGURA, N.; RAPPUOLI, R.; GHIARA, P. - Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. **Science** **267**:1655-1658, 1995.
- MARSHALL, B.J.; McGECHIE, D.B.; FRANCIS, G.J.; UTLEY, P.J. - Pyloric *Campylobacter* serology. **Lancet** **2(8397)**: 281, 1984.
- MARSHALL, B.J. & WARREN, J.R. - Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet** **1**:1311-1315, 1984.
- MATSUMOTO, S.; WASHIZUKA, Y.; MATSUMOTO, Y.; TAWARAS, S.; IKEDA, F.; YOKOTA, Y.; KARITA, M. - Induction of ulceration and severe gastritis in Mongolian gerbil by *Helicobacter pylori* infection. **J. Med. Microbiol.** **46**:391-397, 1997.
- MATZ-RENSING, K.; KUNZ, E.; KRAFT, C.; LORENZEN, D.; SUERBAUM, S.; KAUP, F.J. - Experimental *Helicobacter pylori* infection of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Int. J. Med. Microbiol.** **291(1)**:33-43, 2001.
- McGOWAN, C.C.; COVER, T.L.; BLASER, M.J. - *Helicobacter pylori* and gastric acid: biological and therapeutic implications. **Gastroenterology** **110(3)**:926-938, 1996.
- MARSHALL, B.J. - *Helicobacter pylori*. **Am. J. Gastroenterol.** **89(8)**:S116-S128, 1994.
- MARUTA, F.; OTA, H.; GENTA, R.M.; SUGIYAMA, A.; TATEMATSU, M.; KATSUYAMA, T.; KAWASAKI, S. - Role of N-metyl-N-nitrosurea in the induction of intestinal metaplasia and gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. **Scand. J. Gastroenterol.** **36(3)**:283-290, 2001.

- MARUTA, F.; SUGIYAMA, A.; ISHIDA, K.; IKENO, T.; MURAKAMI, M.; KAWASAKI, S.; OTA, H.; TATEMATSU, M.; KATSUYAMA, T. - Timing of N-methyl-N-nitrosurea administration affects gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. **Cancer Lett.** **160(1)**:99-105, 2000.
- MATSUI, H.; KUBO, Y.; NINOMIYA, T.; MIZUKAMI, Y.; ONJI, M. - Recurrence of gastric ulcer dependent upon strain differences of *Helicobacter pylori* in urease B gene. **Dig. Dis. Sci.** **45(1)**:49-54, 2000.
- MATYSIAK-BUDNIK, T. & MEGRAUD, F. - Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection with special reference to professional risk. **J. Physiol. Pharmacol.** **48 (Suppl 4)** : 3-17, 1997.
- MATTAPALLIL, J.J.; DANDEKAR, S.; CANFIELD, D.R.; SOLNICK, J.V. - A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques. **Gastroenterol.** **118(2)**:307-315, 2000.
- McNULTY, C.A.M. - Detection of *Helicobacter pylori* by the Biopsy Urease Test. In: RATHBONE, B.J. & HEATLEY, R.V. - *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease. Londres, Blackwell Scientific Publications, 1992, p.58-63.
- McNULTY, C.A.M. & DENT, J.C. - Rapid identification of *Campylobacter pylori* (*Campylobacter pyloridis*) by preformed enzymes. **J. Clin. Microbiol.** **25**:1683-1686, 1987.
- McNULTY, C.A.M. & WISE, R. - Rapid diagnosis of *Campylobacter*-associated gastritis. **Lancet** **1(8477)**:1443-1444, 1985.
- MEGRAUD, F. - Impact of *Helicobacter pylori* virulence on the outcome of gastroduodenal diseases: lessons from the microbiologist. **Dig. Dis.** **19(2)**:99-103, 2001.
- MEGRAUD, F. - Pathogenic diversity of *Helicobacter pylori*. **J. Gastroenterol.** **32(2)**:278-281, 1997.

- MEGRAUD, F. - Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. **Aliment. Pharmacol. Ther.** 9 (Suppl 2) : 85-91, 1995.
- MEGRAUD, F.; BURETTE, A.; GLUPCZYNSKI, Y.; FIOCCA, R.; LOGAN, R.; QUINA, M.; ERICSSON, S.; O'MORAIN, C. - Comparison of tests for assesment of *Helicobacter pylori* eradication: results of a multi-centre study using centralized facility testing. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.** 12(6):629-633, 2000.
- MENDES, E.N.; QUEIROZ, D.M.M.; MOURA, S.B.; ROCHA, G.A. - Mouse inoculation for the detection of non-cultivable gastric tightly spiralled bacteria. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31:373-373, 1998.
- METZ, D.C. - Stool testing for *Helicobacter pylori* infection: yet another noninvasive alternative. **Am. J. Gastroenterol.** 95(2):546-548, 2000.
- MICHETTI, P.; DORTA, G.; BRASSART, D.; VOUILLAMOZ, D.; SCHWITZER, W.; FELLE, C.; BLUM, A.L.; PORTA, N.; ROUVERT, M.; CORTHESEY-THEULAZ, I. - *L. acidophilus* supernatant as an adjuvant in the therapy of *H. pylori* in humans. **Gastroenterology** 108:A166, 1995.
- MIDOLO, P.D.; LAMBERT, J.R.; HULL, R.; LUO, F.; GRAYSON, M.L. - In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. **J. Appl. Bacteriol.** 79(4):475-479, 1995.
- MINE, T.; ENDO, C.; KUSHIMA, R.; KUSHIMA, W.; KOBAYASHI, I.; MURAOKA, H.; TAKI, R.; FUJITA, T. - The effects of water extracts of CagA positive or negative *Helicobacter pylori* on proliferation, apoptosis and connexin formation in acetic acid-induced gastric ulcers of rats. **Aliment. Pharmacol. Ther.** 14 (Suppl 1) : 199-204, 2000.
- MITCHELL, H.M.; LEE, A.; CARRICK, J. - Increased incidence of *Campylobacter pylori* infection in gastroenterologists: further evidence to support person to person transmission. **Scand. J. Gastroenterol.** 24:396-400, 1989.

- MIWA, H.; HIROSE, M.; KIKUCHI, S.; TERA, T.; IWASAKI, R.; KOBAYASHI, O.; YOSHIYUKI, T.; OGIHARA, T.; SATO, N. - How useful is the detection kit for antibody to *Helicobacter pylori* in urine (URINELISA) in clinical practice? **Am. J. Gastroenterol.** **94**(12):3460-3463, 1999.
- MIYATA, H.; YAGI, K.; KIMURA, M.; KIJIMA, H.; ISOBE, Y.; KANEDA, Y.; AKASHI, T. - Distribution of *Helicobacter pylori* in a Mongolian gerbil gastric ulcer model. **Lab. Anim. Sci.** **49**(6):622-627, 1999.
- MIZOGUCHI, H.; FUJIOKA, T.; KISHI, K.; WISHIKONO, ^a; KODAMA, R.; NASU, M. - Diversity in protein synthesis and viability of *Helicobacter pylori* coccoid forms in response to various stimuli. **Infect. Immun.** **66**(11):5555-5560, 1998.
- MOHAMMADI, M.; CZINN, S.; REDLINE, R.; et al - *Helicobacter*-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. **J. Immunol.** **156**:4729-4738, 1996.
- MOHAMMADI, M.; NEDRUD, J.; REDLINE, R.; LYCKE, N.; CZINN, S.J. - Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: Th1 cells enhance gastritis and Th2 cells reduce bacterial load. **Gastroenterol.** **113**:1848-1857, 1997.
- MONICI, L.T.; NISHIMURA, N.F.; HARA, N.H.; ZEITUNE, J.M.R. - Validação de um método imunoenzimático para detecção da infecção pelo *Helicobacter pylori*. **J. Bras. Patol.** **35**(2):65-70, 1999.
- MONTEIRO, L.; VEKRIS, A.; BONNET, J.; BONNEMAISON, D.; VIDAL, R.; MEGRAUD, F. - Attempts to characterize PCR inhibitors present in faeces-application to *Helicobacter pylori*. **Gut** **39**:A120, 1996.
- MORRIS, A. & NICHOLSON, G. - Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. **Am. J. Gastroenterol.** **82**:192-199, 1987.
- MOULTON-BARRETT, R.; TRIADAFILOPOULOS, G.; MICHENER, R.; GOLOGORSKY, D. - Serum ¹³C-bicarbonate in the assesment of gastric *Helicobacter pylori* urease activity. **Am. J. Gastroenterol.** **88**:369-374, 1993.

- MOURA, S.B.; MENDES, E.N.; QUEIROZ, D.M.; NICOLI, J.R.; CABRAL, M.M.; MAGALHAES, P.P.; ROCHA, G.A.; VIEIRA, E.C. - Ultrastructure of *Helicobacter trogontum* in culture and in the gastrointestinal tract of gnotobiotic mice. **J. Med. Microbiol.** **47(6)**:513-520, 1998.
- MUKAI, T.; ASASAKA, T.; SATO, E.; MORI, K.; MATSUMOTO, M.; OHORI, H. - Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** **32(2)**:105-110, 2002.
- MUOTIALA, A.; HELANDER, I.M.; PYHALA, L.; et al. - Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. **Infect. Immun.** **60(4)**:1714-1716, 1992.
- MURRAY, L.J.; McCRUM, E.E.; EVANS, A.E.; BAMFORD, K.B. - Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection among 4742 randomly selected subjects from Northern Ireland. **Int. J. Epidemiol.** **26(4)**:880-887, 1997.
- MYSORE, J.V.; WIGGINTON, T.; SIMON, P.M.; ZOPF, D.; HEMAN-ACKAH, L.M.; DUBOIS, A. - Treatment of *Helicobacter pylori* infection in rhesus monkeys using a novel antiadhesion compound. **Gastroenterology** **117(6)**:1316-1325, 1999.
- NABWERA, H.M.; LOGAN, R.P. - Epidemiology of *Helicobacter pylori*: transmission, translocation and extragastric reservoirs. **J. Physiol. Pharmacol.** **50(5)**:711-722, 1999.
- NABWERA, H.M.; NGUYEN-VAN-TAM, J.S.; LOGAN, R.F.; LOGAN, R.P. - Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Kenyan schoolchildren aged 3-15 years and risk factors for infection. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.** **12(5)**:483-487, 2000.
- NEIGER, R.; DIETERICH, C.; BURNENS, A.; WALDVOGEL, A.; CORTHESEY-THEULAZ; HALTER, F.; LAUTERBURG, B.; SCHMASSMANN, ^a - Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. **J. Clin. Microbiol.** **36(3)**:634-637, 1998.
- NEWELL, D.G. Identification of the outer membrane proteins of *Campylobacter pyloridis* and *C. jejuni*. **J. Gen. Microbiol.** **133**:163-170, 1987.

- NEWELL, D.G. & STACEY, A.R. - The serology of *Helicobacter pylori* infections. In: RATHBONE, B.J. & HEATLEY, R.V. - *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease. Londres, Blackweel Scientific Publications, 1992, p.64-73.
- NGUYEN, A.M.; ENGSTRAND, L.; GENTA, R.M.; GRAHAM, D.Y.; el-ZAATARI, F.A. - Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque by reverse transcription-polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** **31(4)**:783-787, 1993.
- NI, Y.H.; LIN, J.T.; HUANG, S.F.; YANG, J.C.; CHANG, M.H. - Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by stool antigen test and 6 other currently available tests in children. **J. Pediatr.** **136(6)**:823-827, 2000.
- NILSSON, I.; LJUNG, A.; ALELJUNG, P.; WADSTROM, T. - Immunoblot assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **J. Clin. Microbiol.** **35(2)**:427-432, 1997.
- NISHIKAWA, K.; SUGIYAMA, T.; KATO, M.; ISHIZUKA, J.; KAGAYA, H.; HOKARI, K.; ASAKA, M. - A prospective evaluation of new rapid urease tests before and after eradication treatment of *Helicobacter pylori*, in comparison with histology, culture and 13C-urea breath test. **Gastrointest. Endosc.** **51(2)**:164-168, 2000.
- NOACH, L.A.; BOSMA, N.B.; JANSEN, J.; HOEK, F.J.; DEVENTER, S.J.; TYTGAT, G.N. - Mucosal tumor necrosis factor alpha , interleukin-1 beta and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. **Scand. H. Gastroenterol.** **29**:425-429, 1994.
- ODENBREIT, S.; GEBERT, B.; PULS, J.; FISCHER, W.; HAAS, R. - Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenecity island nd translocation, phosphorylation and processing of CagA. **Cell. Microbiol.** **3(1)**:21-31, 2001.

- OGURA, K.; MAEDA, S.; NAKAO, M.; WATANABE, T.; TADA, M.; KYUTOKU, T.; YOSHIDA, H.; SHIRATONI, Y.; OMATA, M. - Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. **J. Exp. Med.** **192(11)**:1601-1610, 2000.
- OKUI, M.; FUKUDA, Y.; YAMAMOTO, I.; SHINTANI, S.; SHIMOYAMA, T. - *Helicobacter pylori* infection affects gastric ulcer healing in Japanese monkeys. **J. Gastroenterol.** **33 (Suppl 10)** : 26-30, 1998.
- OKUMURA, T.; SHOJI, E.; TAKAHASHI, N.; WAKEBE, H.; IMAGAWA, K.; KIKUCHI, M.; KOHGO, Y. - Delayed gastric emptying by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide in conscious rat. **Dig. Dis. Sci.** **43(1)**:90-94, 1998.
- OLIVEIRA, A.M.; QUEIROZ, D.M.; ROCHA, G.A.; MENDES, E.N. - Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. **Am. J. Gastroenterol.** **89(12)**:2201-2204, 1994.
- OLIVEIRA, A.M.; ROCHA, G.A.; QUEIROZ, D.M.; de MOURA, SB; RABELLO, A.L. - Seroconversion for *Helicobacter pylori* in adults from Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **93(3)**:261-263, 1999.
- OSAWA, H.; SUGANO, K.; IWAMORI, M.; KAWAKAMI, M.; TADA, M.; NAKAO, M. - Comparative analysis of colonization of *Helicobacter pylori* and glycolipids receptor density in Mongolian gerbils and mice. **Dig. Dis. Sci.** **46(1)**:69-74, 2001.
- PARSONNET, J.; SHMUELY, H.; HAGGERTY, T. - Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. **JAMA** **282(23)**:2240-2245, 1999.
- PATEL, P.; MENDALL, M.A.; KHULUSI, S.; MOLINEAUX, N.; LEVY, J.; MAXWELL, J.D.; NORTHFIELD, T.C. - Salivary antibodies to *Helicobacter pylori*: screening dyspeptic patients before endoscopy. **Lancet** **344**:511-512, 1994.
- PATHAK, C.M.; BHASIN, D.K.; PANIGRAHI, D.; GOEL, R.C. - Evaluation of ^{14}C -urinary excretion and its comparison with $^{14}\text{CO}_2$ in breath after ^{14}C -urea administration in *Helicobacter pylori* infection. **Am. J. Gastroenterol.** **89**:734-738, 1994.

- PEEK, R.M.; MILLER, Jr.G.G.; THAM, K.T.; PEREZ-PEREZ, G.I.; COVER, T.L.;
ATHERTON, J.C.; DUNN, G.D.; BLASER, M.J. - Detection of *Helicobacter pylori*
gene expression in human gastric mucosa. **J. Clin. Microbiol.** 33:28-32, 1995.
- PEEK, R.M.; THOMPSON, S.A.; DONAHUE, J.P.; THAM, K.T.; ATHERTON, J.C.;
BLASER, M.J.; MILLER, G.G. - Adherence to gastric epithelial cells induces
expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical
outcome. **Proc. Assoc. Am. Physicians** 110(6):531-544, 1998.
- PEEK, R.M.Jr.; WIRTH, H.P.; MOSS, S.F.; YANG, M.; ABDALLA, P.M.; THAM, K.T.;
ZHANG, T.; TANG, L.H.; MODLIN, I.M.; BLASER, M.J. - *Helicobacter pylori* alters
gastric epithelial cell cycle events and gastrin secretion in Mongolian gerbils.
Gastroenterology 118(1):48-59, 2000.
- PEREZ-PEREZ, G.I. - Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Culture, including
transport. **Gastroenterol. Clin. North. Am.** 29(4):879-884, 2000.
- PEREZ-PEREZ, G.I.; BLASER, M.J. - Conservation and diversity of *Campylobacter*
pyloridis major antigens. **Infect. Immun.** 55:1256-1263, 1987.
- PEREZ-PEREZ, G.I.; DWORKIN, B.M.; CHODOS, J.E.; BLASER, M.J. - *Campylobacter*
pylori antibodies in humans. **Ann. Intern. Med.** 109:11-17, 1988.
- PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; MEDICI, M. - Systemic and local augmentation of the
immune response in mice by feeding with milk fermented with *Lactobacillus*
acidophilus and/or *Lactobacillus casei*. In: PAUBERT-BRAQUET, M.; DUPONT, C.;
PAOLETTI, R. - **Food, nutrition and immunity**. Switzerland, Karger, 1992, p66-76.
- PERKINS, S.E.; FOX, J.G.; MARINI, R.P.; SHEN, Z.; DANGH, C.A.; GE, Z. -
Experimental infection in cats with a *cagA*⁺ human isolate of *Helicobacter pylori*.
Helicobacter 3(4):225-235, 1998.
- PUSPOK, A.; BAKOS, S.; OBERHUBER, G.- A new, non-invasive method for detection
of *Helicobacter pylori*: validity in the routine clinical setting. **Eur. J. Gastroenterol.**
Hepatol. 11(10):1139-1142, 1999.

- QUEIROZ, D.M.; MENDES, E.N.; ROCHA, G.A. - Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. **J. Clin. Microbiol.** **25**:2378-2379, 1987.
- QUEIROZ, D.M.; ROCHA, G.A.; MENDES, E.N.; DE MORA, S.B.; DE OLIVEIRA, A.M.; MIRANDA, D. - Association between *Helicobacter* and gastric ulcer disease of the pars esophagea in swine. **Gastroenterology** **111**(1):19-27, 1996.
- RABELO-GONÇALVES, E.M.A.; NISHIMURA, N.F.; ZEITUNE, J.M.R. - Modelos experimentais para a infecção pelo *H. pylori*. **GED** **19**(2):84-87, 2000.
- RADCLIFF, F.J.; FERRERO, R.L. - Effect of low-dose antigen exposure on development of immunity to *Helicobacter pylori* infection in mice. **Infect. Immun.** **69**(8):5186-5188, 2001.
- RADIN, M.J.; EATON, K.A.; KRAKOWKA, S.; MORGAN, D.R.; LEE, A.; OTTO, G.; FOX, J.G. - *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic Beagle dogs. **Infect. Immun.** **58**(8):2606-2612, 1990.
- RAMARAO, N.; GRAY-OWEN, S.D.; BACKERT, S.; MEYER, T.F. - *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. **Mol. Microbiol.** **37**:1389-1404, 2000.
- RAMARAO, N. & MEYER, T.F. - *Helicobacter pylori* resists phagocytosis by macrophages: quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence-activated cell sorting. **Infect. Immun.** **69**(4):2604-2611, 2001.
- REINDEL, J.F.; FITZGERALD, A.L.; BREIDER, M.A.; GOUGH, W.; YAN, C.; MYSORE, J.V.; DOBOIS, A. - An epizootic of lymphoplasmacytic gastritis attributed to *Helicobacter pylori* infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Vet. Pathol.** **36**(1):1-13, 1999.
- RILEY, L.K.; FRANKLIN, C.L.; HOOK, R.R.; BESCH-WILIFORD, C. - Identification of murine helicobacters by PCR and restriction enzyme analyses. **J. Clin. Microbiol.** **34**(4):942-946, 1996.

- RIVERA, E.; LÓPEZ-VIDAL, Y.; LUQUENO, V.; RUIZ-PALACIOS, G.M. - Indirect Immunofluorescence assay for detection of *Helicobacter pylori* in human gastric mucosal biopsies. **J. Clin. Microbiol.** **29(8)**:1748-1751, 1991.
- ROACH, S.; SAVAGE, D.C.; TANNOCK, G.W. - Lactobacilli isolated from the stomach of conventional mice. **Appl. Environ. Microbiol.** **33(5)**:1197-1203, 1977.
- ROCHA, G.A.; OLIVEIRA, A.M.R.; QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; MOURA, S.B.; OLIVEIRA, C.A.; FERRARI, T.C.A. - Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection by Cobas Core ELISA in adults from Minas Gerais, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **31**:1263-1268, 1998.
- ROCHA, G.A.; QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; CARVALHO, A.T.C.; OLIVEIRA, A.M.R.; MOURA, S.B. - Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children by and indirect immunofluorescence test. **J. Pediat. Gastroenterol. Nut.** **16**:247-251, 1993.
- ROCHA, G.A.; QUEIROZ, D.M.; MENDES, E.N.; OLIVEIRA, A.M.; MOURA, S.B.; BARBOSA, M.T.; MENDES, C.C.; LIMA JUNIOR, G.F.; OLIVEIRA, C.A. - Indirect immunofluorescence determination of the frequency of anti-*H. pylori* antibodies in Brazilian blood donors. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **25(7)**:683-689, 1992.
- ROSS, J.S.; BUI, H.X.; del ROSARIO, A.; SONBATI, H.; GEORGE, M.; LEE, C.Y. - *Helicobacter pylori*: its role in the patogenesis of peptic ulcer disease in a new animal model. **Am. J. Pathol.** **141(3)**:721-727, 1992.
- ROSSI, G.; FORTUNA, D.; PANCOTTO, L.; RENZONI, G.; TACCINIE, E.; GHIARA, P.; RAPPUOLI, R.; DEL GIUDICE, G. - Immunohistochemical study of lymphocyte populations infiltrating the gastric mucosa of Beagle dogs experimentally infected with *Helicobacter pylori*. **Infect. Immun.** **68(8)**:4769-4772, 2000.
- ROSSI, G.; ROSSI, M.; VITALI, C.G.; FORTUNA, D.; BURRONI, D.; PANCOTTO, L.; CAPECCHI, S.; SOZZI, S.; RENZONI, G.; BRACA, G.; DEL GIUDICE, G.; RAPPUOLI, R.; GHIARA, P.; TACCINI, E. - A conventional Beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*. **Infect. Immun.** **67(6)**:3112-3120, 1999.

- RUDMANN, D.G.; EATON, K.A.; KRAKOWKA, S. - Ultrastructural study of *Helicobacter pylori* adherence properties in gnotobiotic piglets. **Antimicrob. Agents Chemother.** **44(10)**:2623-2629, 2000.
- RUIZ-BUSTOS, E.; SIERRA-BELTRAN, A.; ROMERO, M.J.; RODRIGUEZ-JARAMILLO, C.; ASCENCIO, F. - Protection of BALB/c mice against experimental *Helicobacter pylori* infection by oral immunisation with *H. pylori* heparan sulphate-binding proteins coupled to cholera toxin beta-subunit. **J. Med. Microbiol.** **49(6)**:535-541, 2000.
- RÜSSMANN, H.; KEMPF, V.A.J.; KOLETZKO, S.; HEESEMANN, J.; AUTENRIETH, I.B. - Comparison of fluorescent *in situ* hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. **J. Clin. Microbiol.** **39(1)**:304-308, 2001.
- SADOWSKI, D.; COHEN, H.; LAINE, L.; GREENBERG, P.; GOLDSTEIN, J.; MIHALOV, M.; CUTLER, A.F. - Evaluation of the Flexsure HP fingerprick blood test for detection of *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology** **110**:A246, 1996.
- SAKAGAMI, T.; DIXON, M.; O'ROURKE, J.; HOWLETT, R.; LDERUCCIO, F.; VELLA, J.; SHIMOYAMA, T.; LEE, A. - Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. **Gut** **39**:639-648, 1996.
- SAKAMOTO, I.; IGARASHI, M.; KIMURA, K.; TAKAGI, A.; MIWA, T.; KOGA, Y. - Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infections in humans. **J. Antimicrob. Chemother.** **47(5)**:709-710, 2001.
- SALAMA, N.R.; OTTO, G.; TOMPKINS, L.; FALKOW, S. - Vacuolatin cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. **Infect. Immun.** **69(2)**:730-736, 2001.

- SANCHEZ, V.; GIMENEZ, S.; HAENSLER, J.; GEOFFROY, C.; ROKBI, B.; SEGUIN, D.; LISSOLO, L.; HARRIS, B.; RIZVI, F.; KLEANTHOUS, H.; MONATH, T.; CADOZ, M.; GUY, B. - Formulations of single or multiple *H. pylori* antigens with DC Chol adjuvant protection by the systemic route in mice. Optimal prophylactic combinations are different from therapeutic ones. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** **30(2)**:157-165, 2001.
- SAROSIEK, J.; SLOMIANY, A.; SLOMIANY, B.L. - Evidence for weakening of gastric mucus integrity by *Campylobacter pylori*. **Scand. J. Gastroenterol.** **23**:585-590, 1988.
- SASAKI, K.; TAJIRI, Y.; SATA, M.; FUJII, Y.; MATSUBARA, F.; ZHAO, M.; SHIMIZU, S.; TOYONAGA, A.; TANIKAWA, K. - *Helicobacter pylori* in the natural environment. **Scand. J. Infect. Dis.** **31**:275-279, 1999.
- SATO, T.; FUJINO, M.A.; KOJIMA, Y.; KITAHARA, F.; MOROZUMI, A.; NAGATA, K.; NAKAMURA, M.; HOSAKA, H. - Evaluation of immunological rapid urease testing for detection of *Helicobacter pylori*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** **19(6)**:438-442, 2000.
- SAWADA, Y.; KURODA, Y.; SASHIO, H.; YAMAMOTO, N.; TONOKATSU, Y.; SAKAGAMI, T.; FUKUDA, Y.; SHIMOYAMA, T.; NISHIGAMI, T.; UEMATSU, K. - Pathological changes in glandular stomach of *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbil model. **J. Gastroenterol.** **33 (Supl 10)** : 22-25, 1998.
- SAWAI, N.; KITA, M.; KODAMA, T.; TANAHASHI, T.; YAMAOKA, Y.; TAGAWA, Y.I.; IWAKURA, Y.; IMANISHI, J. - Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. **Infect. Immun.** **67(1)**:279-285, 1999.
- SCHUMAN, R.B.; RIGAS, B.; PRADA, A.; MINOLI, G. - Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by the Lara system-towards a simplified breath test. **Gastroenterology** **108**:A215, 1995.

- SHARMA, S.A.; MILLER, G.G.; PEREZ-PEREZ, G.I.; GUPTA, R.S.; BLASER, M.J. - Humoral and cellular immune recognition of *Helicobacter pylori* proteins are not concordant. **Clin. Exp. Immunol.** **97**:126-132, 1994.
- SHEN, Z.; FENG, Y.; DEWHIRST, F.E.; FOX, J.G. - Coinfection of enteric *Helicobacter* spp. and *Campylobacter* spp. in cats. **J. Clin. Microbiol.** **39**(6):2166-2172, 2001.
- SHEN, Z.; FOX, J.G.; DEWHIRST, FE.; PASTER, B.J.; FOLTZ, C.J.; YAN, L.; SHAMES, B.; PERRY, L. - *Helicobacter rodentium* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from laboratory mice. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **47**(3):627-634, 1997.
- SHERON, N & WILLIAMS, R. - IL-8 as a circulating cytokine: induction by recombinant tumor necrosis factor-alpha. **Clin. Exp. Immunol.** **89**:100-103, 1992.
- SHEU, B.S.; YANG, H.B.; WU, J.J.; HUANG, A.H.; LIN, X.Z.; SU, I.J. - Development of *Helicobacter pylori* infection model in BALB/c mice with domestic cagA-positive and negative strains in Taiwan. **Dig. Dis. Sci.** **44**(5):868-75, 1999.
- SHIMIZU, T.; AKAMATSU, T.; SUGIYAMA, A.; OTA, H.; KATSUYAMA, T. - *Helicobacter pylori* and the surface mucous gel layer of the human stomach. **Helicobacter** **1**(4):207-218, 1996.
- SHIMIZU, N.; IKEHARA, Y.; INADA, K.; NAKANISHI, H.; TSUKAMOTO, T.; AOZAKI, K.; KAMINISHI, M.; KURAMOTO, S.; SUGIYAMA, A.; KATSUYAMA, T.; TATEMATSU, M. - Eradication diminishes enhancing effects of *Helicobacter pylori* infection on glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils. **Cancer Res.** **60**(6):1512-1514, 2000.
- SHIMIZU, N.; INADA, K.; NAKANISHI, H.; TSUKAMOTO, T.; IKEHARA, Y.; KAMINISHI, M.; KURAMOTO, S.; SUGIYAMA, A.; KATSUYAMA, T.; TATEMATSU, M. - *Helicobacter pylori* infection enhances glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils treated with chemical carcinogens. **Carcinogenesis** **20**(4):669-676, 1999a.

- SHIMIZU, N.; INADA, KI; TSUKAMOTO, T.; NAKANISHI, H.; IKEHARA, Y.; YOSHIKAWA, A.; KAMINISHI, M.; KURAMOTO, S.; TATEMATSU, M. - New animal model of glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori* and treated with a chemical carcinogen. **J. Gastroenterol.** **34** (Suppl. 11) : 61-66, 1999b.
- SHIMOYAMA, T.; CRABTREE, J.E. - Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. **Gut** **43** (Suppl 1) : S2-S5, 1998.
- SHIMOYAMA, T.; HORIE, N.; KATO, T.; KANEKO, T.; KOMIYAMA, K. - *Helicobacter pylori* in oral ulcerations. **J. Oral. Sci.** **42**(4):225-229, 2000.
- SHOMER, N.H.; DANGLER, C.A.; MARINI, R.P.; FOX, J.G. - *Helicobacter bilis*/*Helicobacter rodentium* co-infection associated with diarrhea in a colony of scid mice. **Lab. Anim. Sci.** **48**(5):455-9, 1998a.
- SHOMER, N.H.; DANGLER, C.A.; WHARY, M.T.; FOX, J.G. - Experimental *Helicobacter pylori* infection induces antral gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue in guinea pigs. **Infect. Immun.** **66**(6):2614-2618, 1998b.
- SIMPSON, K.W.; STRAUSS-AYALI, D.; STRAUBINGER, R.K.; SCANZIANI, E.; McDONONGH, P.L.; STRAUBINGER, A.F.; CHANG, Y.F.; ESTEVES, M.I.; FOX, J.G.; DOMENEGHINI, C.; AREBI, N.; CALAM, J. - *Helicobacter pylori* infection in the cat: evaluation of gastric colonization, inflammation and function. **Helicobacter** **6**(1):1-14, 2001.
- SIMOR, A.E.; LIN, E.; SAIBIL, F.; COHEN, L.; LOUIE, M.; PEAREN, S.; DONHOFER, H.A. - Evaluation of enzyme immunoassay for detection of salivary antibody to *Helicobacter pylori*. **J. Clin. Microbiol.** **34**:550-553, 1996.
- SIPPONEN, P.; KOSUNEN, T.U.; SAMLOFF, IM.; HEINONEN, O.P.; SIURALA, M. - Rate of *Helicobacter pylori* acquisition among Finnish adults: a fifteen year follow-up. **Scand. J. Gastroenterol.** **31**(3):229-232, 1996.

- SIU, L.K.; LEUNG, W.K.; CHENG, A.F.B. - Evaluation of a selective transport medium for gastric biopsy specimens to be cultured for *Helicobacter pylori*. **J. Clin. Microbiol.** **36 (10)**:3048-3050, 1998.
- SJUNNESSON, H.; STUREGARD, E.; GRUBB, A.; WILLEN, R.; WADSTROM, T. - Comparative study of *Helicobacter pylori* infection in guinea pigs and mice - elevation of acute-phase protein C3 in infected guinea pigs. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** **30(2)**:167-172, 2001.
- SLOMIANY, B.L.; PIOTROWSKI, J.; SLOMIANY, A. - Effect of ebrotidine on gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. **J. Physiol. Pharmacol.** **50(3)**:391-404, 1999.
- SLOMIANY, B.L.; PIOTROWSKI, J.; SLOMIANY, A. - Omeprazole fails to suppress up-regulation of gastric mucosal endothelin-converting enzyme-1 by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. **J. Physiol. Pharmacol.** **51(3)**:421-431, 2000.
- SMYTHIES, L.E.; WAITES, K.B.; LINDSEY, J.R.; HARRIS, P.R.; GHIARA, P.; SMITH, P.D. - *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not INF- γ gene-deficient mice. **J. Immunol.** **165**:1022-1029, 2000.
- SOBALA, G.M.; CRABTREE, J.E.; DIXON, M.F.; SCHORAH, C.J.; TAYLOR, J.D.; RATHBONE, B.J.; HEATLEY, R.V.; AXON, A.T. - Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology and gastric juice ascorbic acid concentrations. **Gut** **32**:1415-1418, 1991.
- SOLNICK, J.V.; CANFIELD, D.R.; YANG, S.; PARSONNET, J. - Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of *Helicobacter pylori*: non-invasive detection and derivation of specific-pathogen free monkeys. **Lab. Anim. Sci.** **49(2)**:197-201, 1999.
- SOMMER, F.; FALLER, G.; ROLLINGHOFF, M.; KIRCHNER, T.; MAK, T.W.; LOHOFF, M. - Lack of gastritis and of an adaptive immune response in interferon regulatory factor-1-deficient mice infected with *Helicobacter pylori*. **Eur. J. Immunol.** **31(2)**:396-402, 2001.

- SONG, Q.; SPAHR, A.; SCHMID, R.M.; ADLER, G.; BODE, G. - *Helicobacter pylori* in the oral cavity: high prevalence and great DNA diversity. **Dig. Dis. Sci.** **45(11)**:2162-2167, 2000.
- SOUTO, F.J.; FONTES, C.J.; ROCHA, G.A.; de OLIVEIRA, A.M.; MENDES, E.N.; QUEIROZ, D.M. - Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a rural área of the state of Mato Grosso, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **93(2)**:171-174, 1998.
- STADTLANDER, C.T.; GANGEMI, J.D.; KHANOLKAR, S.S.; KITSOS, C.M.; FARRIS, H.E. Jr; FULTON, L.K.; HILL, J.E.; HUNTINGTON, F.K.; LEE, C.K.; MONATH, T.P. - Immunogenicity and safety of recombinant *Helicobacter pylori* urease in a nonhuman primate. **Dig. Dis. Sci.** **41(9)**:1853-1862, 1996.
- STADTLANDER, C.T.; GANGEMI, J.D.; STUZENBERGER, F.J.; LAWSON, J.W.; KHANOLKAR, S.S.; ELLIOTT-RAYNOR, K.E.; FARRIS, H.E. Jr; FULTON, L.K.; HILL, J.E.; HUNTINGTON, F.K.; LEE, C.K.; MONATH, T.P.- Experimentally induced infection with *Helicobacter pylori* in squirrel monkeys (*Saimiri* spp): clinical, microbiological, and histopathologic findings. **Lab. Anim. Sci.** **48(3)**:303-309, 1998.
- STEVENSON, T.H.; LUCIA, L.M.; ACUFF, G.R. - Development of a selective medium for isolation of *Helicobacter pylori* from cattle and beef samples. **Appl. Environ. Microbiol.** **66(2)**:723-727, 2000.
- STRAUSS-AYALI, D.; SCANZIANI, E.; DENG, D.; SIMPSON, K.W. - *Helicobacter* spp infection in cats: evaluation of the humoral response and prevalence of *Helicobacter* spp. **Vet. Microbiol.** **79(3)**:253-265, 2001.
- STRAUSS-AYALI, D.; SIMPSON, K.W.; SCHEIN, A.H. - Serological discrimination of dogs infected with gastric *Helicobacter* spp. and uninfected dogs. **J. Clin. Microbiol.** **37(5)**:1280-1287, 1999.
- STUREGARD, E.; SYNNESSON, H.; HO, B.; WILLEN, R.; ALELJUNG, P.; NG, H.C.; WADSTROM, T. - Severe gastritis in guinea-pigs infected with *Helicobacter pylori*. **J. Med. Microbiol.** **47(12)**:1123-1129, 1998.

- STUREGARD, E.; SJUNNESSON, H.; NILSSON, H.; ANDERSSON, R.; ARESKOU, C.; WADSTROM, T. - Infection with cagA-and vacA-positive and -negative strains of *Helicobacter pylori* in a mouse model. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** **30(2)**:115-120, 2001.
- SUTO, H.; AZUMA, T.; ITO, S.; ITO, Y.; MIYAJI, H.; YAMAZAKI, Y.; KOHLI, Y.; KURIYAMA, M. - Endoscopic [13C]-urea breath test for quantification of *Helicobacter pylori* infection. **J. Gastroenterol. Hepatol.** **15(2)**:161-167, 2000.
- SUTO, H.; AZUMA, T.; ITO, S.; ITO, Y.; MIYAJI, H.; YAMAZAKI, Y.; KOHLI, Y.; KURIYAMA, M. - Evaluation of endoscopic 13C-urea breath test for assessment of *Helicobacter pylori* eradication. **J. Gastroenterol.** **34 (Suppl 11)** : 67-71, 1999.
- SUTTON, P.; WILSON, J.; LEE, A. - Further development of the *Helicobacter pylori* mouse vaccination model. **Vaccine** **18(24)**:2677-2685, 2000.
- SUGANUMA, M.; KURUSU, M.; OKABE, S.; SUEOKA, N.; YOSHIDA, M.; WAKATSUKI, Y.; FUJIKI, H.- *Helicobacter pylori* membrane protein 1: a new carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*. **Cancer Res.** **61(17)**:6356-6359, 2001.
- SUGIYAMA, A.; MARUTA, F.; IKENO, T.L; ISHIDA, K.; KAWASAKI, S.; KATSUYAMA, T.; SHIMIZU, N.; TATEMATSU, M. - *Helicobacter pylori* infection enhances N-methyl-N-nitrosurea-induced stomach carcinogenesis in the Mongolian gerbil. **Cancer Res.** **58(10)**:2067-2069, 1998.
- SURESH, M.R.; FANTA, M.B.; KRIANGKUN, J.; JIANG, Q.; TAYLOR, D.E. - Colonization and immune responses in mice to *Helicobacter pylori* expressing different Lewis antigens. **J. Pharm. Pharm. Sci.** **3(2)**:259-266, 2000.
- SUTO, H.; AZUMA, T.; ITO, S.; OHTANI, M.; DOJO, M.; ITO, Y.; KOHLI, Y.; KURIYAMA, M. - *Helicobacter pylori* infection induces hyperammonaemia in Mongolian gerbils with liver cirrhosis. **Gut** **48(5)**:605-608, 2001.

- SUZUKI, H.; MORI, M.; KAI, A.; SUZUKI, M.; SUEMATSU, M.; MIURA, S.; ISHII, H.
- Effect of rebamipide on *Helicobacter pylori*-associated gastric mucosal injury in Mongolian gerbils. **Dig. Dis. Sci.** **43** (Suppl 9) : 181S-187S, 1998.
- SVEC, A.; KORDAS, P.; PAVLIS, Z.; NOVOTNY, J. - High prevalence of *Helicobacter heilmannii*-associated gastritis in a small, predominately rural area: further evidence in support of a zoonosis? **Scand. J. Gastroenterol.** **35**(9):925-928, 2000.
- TAKAHASHI, S.; FUJITA, T.; YAMAMOTO, A. - Role of cyclooxygenase-2 in *Helicobacter pylori* induced gastritis in Mongolian gerbils. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.** **279**(4):G791-798, 2000.
- TAKAHASHI, S.; KETO, Y.; FUJITA, T.; UCHIYAMA, T.; YAMAMOTO, A. - FR167653, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, prevents *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **296**(1):48-56, 2001.
- TAKASHIMA, M.; FURUTA, T.; HANAI, H.; SUGIMURA, H.; HANEKO, E. - Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. **Gut** **48**(6):765-773, 2001.
- TANI, N.; WATANABE, Y.; SUZUKI, T.; MURAMATSU, S.; MIYAZAWA, M.; KIMURA, N.; MIWA, T. - Effects of inflammatory cytokines induced by *Helicobacter pylori* infection on aminopyrine accumulation in parietal cells isolated from guinea pigs. **Dig. Dis. Sci.** **44**(4):686-690, 1999.
- TATEMATSU, M.; YAMAMOTO, M.; SHIMIZU, N.; YOSHIKAWA, A.; FUKAMI, H.; KAMINISHI, M.; OOHARA, T.; SUGIYAMA, A.; IKENO, T. - Induction of glandular stomach cancers in *Helicobacter pylori*-sensitive Mongolian gerbils treated with N-methyl-N-nitrosurea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in drinking water. **Jpn. J. Cancer Res.** **89**(2):97-104, 1998.
- TAYLOR, D.N. & BLASER, M.J. - The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Epidemiol. Rew.** **13**:43-59, 1991.

- TELFORD, J.L.; GHIARA, P.; DELL'ORCO, M.; COMANDUCCI, M.; BURRONI, D.; BUGNOLI, M.; TECCE, M.F.; CENSINI, S.; COVACCI, A.; XIANG, Z. - Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. **J. Exp. Med.** **179**:1653-1658, 1994.
- TODOROKI, I.; JOH, T.; WATANABE, K.; MIYASHITA, M.; SENO, K.; NOMURA, T.; OHARA, H.; YOKOYAMA, Y.; TOCHIKUBO, K.; ITOH, M. - Suppressive effects of DNA vaccines encoding heat shock protein on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun** **277**(1):159-163, 2000.
- TOKIEDA, M.; HONDA, S.; FUJIOKA, T.; NASU, M. - Effect of *Helicobacter pylori* infection on the N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in mongolian gerbils. **Carcinogenesis** **20**(7):1261-1266, 1999.
- TOMINAGA, K.; HAMASAKI, N.; WATANABE, T.; UCHIDA, T.; FUJIWARA, Y.; TAKAISHI, O.; HIGUCHI, K.; ARAKAWA, T.; ISHII, E.; KOBAYASHI, K.; YANU, I.; KUROKI, T. - Effect of culture conditions on morphological changes of *Helicobacter pylori*. **J. Gastroenterol.** **34** (Suppl 1) : 28-31, 1999.
- THOMAS, J.E.; GIBSON, G.R.; DARBOE, M.K.; DALE, A.; WEAVER, L.T. - Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. **Lancet** **340**:1194-1195, 1992.
- TUFANO, M.A.; ROSSANO, F.; CATALANOTTI, P.; LIGUORI, G.; CAPASSO, C.; CACCARELLI, M.J.; MARINELLI, P.- Immunobiological Activities of *Helicobacter Pylori* porins. **Infect. Immun.** **62**(4):1392-1399, 1994.
- TUMMURU, M.K.; SHARMA, S.A.; BLASER, M.J. - *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. **Mol. Microbiol.** **18**(5):867-876, 1995.
- VAIRA, D.; HOLTON, J.; MENEGATTI, M.; GATTA, L.; RICCI, C.; ALI, A.; LANDI, F.; MORETTI, C.; MIGLIOLI, M. - Routes of transmission of *Helicobacter pylori* infection. **Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.** **30**(Suppl 3):S279-285, 1998.

- VAIRA, D.; HOLTON, J.; MENEGATTI, M.; RICCI, C.; GATTA, L.; GEMINIANI, A.; MIGLIOLI, M. - Review article: invasive and non-invasive tests for *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.** **14 (Suppl 3)** :13-22, 2000.
- VAIRA, D.; MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F.; AXON, A.T.R.; DELTENRE, M.; HIRSCHI, A.M.; GASBARRINI, G.; O'MORAIN, C.; GARCIA, J.M.P.; QUINA, M.; TYTGAT, G.N. and the HpSA European Study Group. - Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. **Lancet** **354(3)**:30-33, 1999.
- VARGAS, M.; LEE, A.; FOX, J.G.; CAVE, D.R. - Inhibition of acid secretion from parietal cells by non-human-infecting *Helicobacter* species: a factor in colonization of gastric mucosa? **Infec. Immun.** **59**:3694-3699, 1991.
- WANG, X.; HIRMO, S.; WILLEN, R.; WADSTROM, T. - Inhibition of *Helicobacter pylori* infection by bovine milk glycoconjugates in a BALB/cA mouse model. **J. Med. Microbiol.** **50(5)**:430-435, 2001.
- WANG, X.; STUREGARD, E.; RUPAR, R.; NILSSON, H.O.; ALELJUNG, P.A.; CARLEN, B.; WILLEN, R.; WADSTROM, T. - Infection of BALB/c A mice by spiral and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. **J. Med. Microbiol.** **46**:657-663, 1997.
- WANG, X.; WILLEN, R.; ANDERSSON, C.; WADSTROM, T. - Development of high-grade lymphoma in *Helicobacter pylori*-infected C57BL/6 mice. **APMIS** **108(7-8)**:503-508, 2000a.
- WANG, X.; WILLEN, R.; WADSTROM, T. - Astaxanthin-rich algal meal and vitamin C inhibit *Helicobacter pylori* infection in BALB/cA mice. **Antimicrob. Agents Chemother.** **44(9)**:2452-2457, 2000b.
- WARREN, J.R. & MARSHAL, B.J. - Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet** **2**:1273-1275, 1983.

- WATANABE, T.; JOH, T.; SENO, K.; TAKAHASHI, N.; OHARA, H.; NOMURA, T.; TOCHIKUBO, K.; ITOH, M. - Injurious effect of *Helicobacter pylori* culture fluid to gastroduodenal mucosa, and its detoxification by sucralfate in the rat. **Aliment. Pharmacol. Ther.** **13(10)**:1363-1371, 1999.
- WATANABE, T.; TADA, M.; NAGAI, H.; SASAKI, S.; NAKAO, M. - *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. **Gastroenterology** **115**: 642-648, 1998.
- WELTZIN, R.; GUY, B.; THOMAS, WD.; GIANNASCA, P.J.; MONATH, T.P. - Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric *Helicobacter pylori* infection. **Infect. Immun.** **68(5)**:2775-2782, 2000.
- WESTBLOM, T.U.; MADAN, E.; GUDIPATI, S.; MIDKIFF, B.R.; CZINN, S. - Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in adult and pediatric patients using Pyloriset, a rapid latex agglutination test. **J. Clin. Microbiol.** **30(1)**:96-98, 1992.
- WHARY, M.T.; CLINE, J.H.; KING, A.E.; HEWES, K.M.; CHOJNACKY, D.; SALVARREY, A.; FOX, J.G. - Monitoring sentinel mice for *Helicobacter hepaticus*, *H. rodentium* and *H. bilis* infection by use of polymerase chain reaction analysis and serologic testing. **Comp. Med.** **50(4)**:436-443, 2000.
- WIRTH, H.P.; BEINS, M.H.; YANG, M.; THAM, K.T.; BLASER, M.J. - Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. **Infect. Immun.** **66(10)**:4858-4866, 1998.
- WU, D.C.; KUO, C.H.; LU, C.Y.; SU, Y.C.; YU, F.J.; LEE, Y.C.; LIN, S.R.; LIU, C.S.; JAN, C.M.; ANG, W.M. - Evaluation of an office-based urine test for detecting *Helicobacter pylori*: a prospective pilot study. **Hepatogastroenterol.** **48(39)**:614-617, 2001.

- WU, J.C.; LIU, G.L.; ZHANG, Z.H.; MOU, Y.L.; CHEN, Q.A.; YANG, S.L. - $^{15}\text{NH}_4^+$ excretion test: a new method for detection of *Helicobacter pylori* infection. **J. Clin. Microbiol.** **30**:181-184, 1992.
- WYATT, J.I. & GRAY, S.F. - Detection of *Helicobacter pylori* by histology. In: *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease. Blackweel Scientific Publications, Oxford, Londres, 2º edição, 1992, 299p.
- YAMAOKA, Y.; KITA, M.; KODAMA, T.; SAWAI, N.; TANAHASHI, T.; KASHIMA, K.; IMANISHI, J. - Chemokines in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. **Gut** **42**:609-617, 1998a.
- YAMAOKA, Y.; KITA, M.; KODAMA, T.; SAWAI, N.; KASHIMA, K.; IMANISHI, J. - Expression of cytokine mRNA in gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection. **Scand. J. Gastroenterol.** **30**:1153-1159, 1995.
- YAMAOKA, Y.; KODAMA, T.; GRAHAM, D.Y.; KASHIMA, K. - Search for putative virulence factors of *Helicobacter pylori*: the low molecular weight (33-35K) antigen. **Dig. Dis. Sci.** **43**(7):1482-1487, 1998b.
- YAMAOKA, Y.; KODAMA, T.; GRAHAM, D.Y.; KASHIMA, K. - Comparison of four serological tests to determine the CagA or VacA status of *Helicobacter pylori* strains. **J. Clin. Microbiol.** **36**(11):3433-3434, 1998c.
- YAMAOKA, Y.; KODAMA, T.; GUTIERREZ, O.; KIM, J.G.; KASHIMA, K.; GRAHAM, D.Y. - Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. **J. Clin. Microbiol.** **37**(7):2274-2279, 1999.
- YOSHIDA, Y.; BARRET, D.; AZAMI, H.; MORINAGA, C.; MATSUMOTO, S.; MATSUMOTO, Y.; TAKASUGI, H. - Studies on anti-*Helicobacter pylori* agents. Part 1: Benzyloxyisoquinoline derivatives. **Bioorg. Med. Chem.** **7**(11):2647-2666, 1999.

- YOSHIMURA, N.; TAJIRI, H.; SAWADA, A.; KOSAIWA, K.; IDA, S.; FUJISAWA, T.; KONNO, M.; KATO, S. - A ^{13}C -urea breath test in children with *Helicobacter pylori* infection: assessment of eradication therapy and follow-up after treatment. **J. Gastroenterol.** **36(9)**:606-611, 2001.
- YOUNG, G.O.; STEMMET, N.; LASTOVICA, A.; van der MERWE, E.L.; LOUW, J.A.; MODLIN, I.M.; MARKS, I.N. - *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates gastric mucosal pepsinogen secretion. **Aliment. Pharmacol. Ther.** **6(2)**:169-177, 1992.
- ZEITUNE, J.M.R. - Doenças causadas por *Helicobacter pylori*. In: AMATO NETO, V. & BALDY, J.L.S., [In press].
- ZEITUNE, J.M.R.; SERVIDONI, M.F.; NISHIMURA, N.F.; MONICI, L.T. - Validação da pesquisa de antígenos de *Helicobacter pylori* nas fezes como método de diagnóstico da infecção numa população pediátrica. Estudo preliminar. **GED 19 (Suppl 2)** : S31, 2000.
- ZHU, H.; QU, F.; ZHU, L.H. - Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. **Nucl. Acids Res.** **21(22)**:5729-5280, 1993.