

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

JULIANA RIBEIRO DO PRADO MORENO

**DETECÇÃO DO *Helicobacter pylori* E DOS SEUS
PRINCIPAIS MARCADORES DE PATOGENICIDADE,
GENES *cag-A*, *vac-A* E *dup-A***

BAURU
2015

JULIANA RIBEIRO DO PRADO MORENO

**DETECÇÃO DO *Helicobacter pylori* E DOS SEUS
PRINCIPAIS MARCADORES DE PATOGENICIDADE,
GENES *cag-A*, *vac-A* E *dup-A***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação do Prof.º Dr.º Lucas Trevizani Rasmussen.

BAURU
2015

M8435d	<p>Moreno, Juliana Ribeiro do Prado</p> <p>Detecção do <i>Helicobacter pylori</i> e dos seus principais marcadores de patogenicidade, genes <i>cag-A</i>, <i>vac-A</i> e <i>dup-A</i> / Juliana Ribeiro do Prado Moreno. -- 2015. 46f. : il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Lucas Trevisani Rasmussen.</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p>1. <i>cag-A</i>. 2. <i>dup-A</i>. 3. <i>Helicobacter pylori</i>. 4. <i>vac-A</i>. I. Rasmussen, Lucas Trevisani. II. Título.</p>
--------	---

JULIANA RIBEIRO DO PRADO MORENO

**DETECÇÃO DO *Helicobacter pylori* E DOS SEUS PRINCIPAIS
MARCADORES DE PATOGENICIDADE, GENES *cag-A*, *vac-A* E *dup-A***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharelado sob orientação do Prof.º Dr.º Lucas Trevizani Rasmussen.

Banca examinadora:

Prof.º Dr.º Lucas Trevizani Rasmussen
Universidade do Sagrado Coração

Prof.º Dr.º Spencer Luiz Marques Payão
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 01 de dezembro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais, Susana e Zeca, que depositaram sua confiança em mim e me deram a oportunidade de concretizar esta etapa.

AGRADECIMENTOS

Minha profunda gratidão e consideração àqueles que fizeram parte dos meus esforços nestes anos de estudo e dedicação:

A Deus, por ter me concedido saúde e sabedoria não apenas na vida acadêmica, mas em todos os caminhos por mim percorridos.

Aos meus pais pela dedicação, paciência, carinho, incentivo e confiança investidos em mim ao longo de toda minha vida.

Ao professor Lucas Trevisani Rasmussen, que com sabedoria, paciência e dedicação, soube transmitir seus conhecimentos e experiências para a elaboração deste trabalho.

Aos professores pelo incentivo, carinho, dedicação e ensinamentos ao longo de todos esses anos.

Ao Wilson A. Orcini e a Jéssica L. Melchiades, pelos ensinamentos, paciência e amizade durante todo esse período.

Ao meu namorado, que esteve ao meu lado me apoiando e incentivando com paciência e carinho ao longo desta jornada.

A todas as outras pessoas que direta ou indiretamente me apoiaram e contribuíram para minha formação.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

(Dalai Lama)

RESUMO

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria Gram-negativa conhecida por colonizar a mucosa gástrica e está relacionada à gênese das gastrites, úlceras e câncer gástrico. A evolução da infecção está relacionada a diversos fatores, incluindo as características genéticas da bactéria, como a presença dos marcadores de patogenicidade, genes: *cag-A*, *vac-A* e *dup-A*. O gene *cag-A*, codifica uma citotoxina associada A, envolvida com o aumento do processo inflamatório e danos ao citoesqueleto celular, o gene *vac-A*, apresenta uma sequência sinal (s) e uma região mediana (m), sendo que a atividade patogênica desta combinação de alelos é mais elevada no genótipo s1/m1, que está associado a úlceras pépticas, gastrites e câncer gástrico, e o gene *dup-A*, predispõe úlceras gástricas duodenais e tem relação inversa ao câncer gástrico. Assim, o presente trabalho teve como objetivo diagnosticar o *H. pylori* e analisar seus marcadores de patogenicidade, além de correlacioná-los com o desenvolvimento das doenças gástricas. Foram analisadas 131 amostras de biópsia gástrica, coletadas de pacientes dispépticos, maiores de 18 anos, atendidos no setor de gastroenterologia do Hospital Estadual de Bauru e submetidos a endoscopia digestiva alta. A partir das amostras de biópsia gástricas foi extraído o DNA, e posteriormente, utilizado para detecção e genotipagem do *H. pylori* pela técnica da PCR. O *H. pylori* foi diagnosticado em 41% das amostras. A análise dos marcadores de patogenicidade detectou o gene *cag-A* em 30% das amostras, o *dup-A* em 57% e 43% s1m1, 13% s1m2, 41% s2m2 e 3% s1m1/2 pertencentes ao *vac-A*. A análise estatística revelou uma associação significativa entre a presença da bactéria e o desenvolvimento de gastrite associados aos genes citados. Conclui-se que diagnosticar e tratar o *H. pylori* precocemente representa um melhor prognóstico ao paciente, além da importância da detecção dos fatores de virulência, os quais representam um fator de risco para o desenvolvimento de doenças gástricas.

Palavras-chave: *cag-A*; *dup-A*; *Helicobacter pylori*; *vac-A*.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a gram-negative bacterium known to colonize the gastric mucosa and is related to gastritis, ulcers and stomach cancer. The evolution of infection is related to several factors, including the bacterium genetic characteristics, as a presence of pathogenic markers, genes: *cag-A*, *vac-A* and *dup-A*. The *cag-A* gene, encodes a cytotoxin associated A, involved with inflammatory process increase and cellular cytoskeletal damage, *vac-A* gene, has a signal sequence (s) and a middle region (m), and the activity pathogenic this combination of alleles is higher in s1/m1 genotype which is associated with peptic ulcers, gastritis and gastric cancer, and *dup-A* gene, predisposes the duodenal gastric ulcers and has an inverse relation with gastric cancer. The aim of the present study was to diagnose *H. pylori* and analyze their pathogenicity markers, and correlate them with the development of gastric disorders. 131 samples of gastric biopsy were analyzed, collected from dyspeptic patients over 18 years old, at the Gastroenterology Department of Bauru State Hospital and underwent to a upper gastrointestinal endoscopy. From gastric biopsy samples, DNA was extracted and subsequently used for detection and genotyping of *H. pylori* by PCR technique. *H. pylori* infection was diagnosed in 41% of samples. The pathogenicity markers analysis detected *cag-A* gene in 30% of samples, *dup-A* in 57% and 43% s1m1, 13% s1m2, 41% s2m2 and 3% s1m1/2 belonging to the *vac-A* gene. Statistical analysis revealed a significant association between presence of bacterium and development of gastritis associated to these genes. In concludes, the early diagnose and treatment of *H. pylori* has a better prognosis for patient, besides the importance of detection of virulence factors, which represent a risk factor for the development of gastric disorders.

Key words: *cag-A*; *dup-A*; *Helicobacter pylori*; *vac-A*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Helicobacter pylori</i>	14
Figura 2 - <i>Helicobacter pylori</i> no mundo	18
Figura 3 - Estrutura do <i>cag-A</i>	23
Figura 4 – Estrutura do gene <i>vac-A</i>	25
Figura 5 – Sistema de secreção tipo VI - <i>dup-A</i>	26
Figura 6 - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio referente à amplificação do produto da PCR de 150pb para detecção do <i>H. pylori</i> . M: Marcador de peso molecular 100pb; C+ e C-: Controle Positivo e negativo respectivamente. <i>Slots</i> 1, 3 e 5 amostras positivas. Slot 2 e 4 amostras negativas.....	28
Figura 7 - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio referente à amplificação do produto da PCR de 232pb para detecção do <i>cag-A</i> . M: Marcador de peso molecular 50pb; C+ e C-: Controle Positivo e negativo respectivamente. <i>Slots</i> 1, 2 e 3 amostras positivas. Slot 4 e 5 amostras negativas.	29
Figura 8 - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio referente à amplificação do produto da PCR de 400 e 475pb para detecção dos alelos m1 e m2 respectivamente. M: Marcador de peso molecular 100pb; C-: Controle negativo. <i>Slots</i> 1, 3, 4 e 5 amostras m1. Slot 2 e 6 amostras m2.	30
Figura 9 - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio referente à amplificação do produto da PCR de 176 e 203pb para detecção dos alelos s1 e s2 respectivamente. M: Marcador de peso molecular 100pb; C-: Controle negativo. <i>Slots</i> 4 e 5 amostras s1. Slot 1, 2 e 3 amostras s2.	30
Figura 10 - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio referente à amplificação do produto da PCR de 232pb para detecção do <i>cag-A</i> . M: Marcador de peso molecular 100pb; C+ e C-: Controle Positivo e negativo respectivamente. <i>Slots</i> 1, 3, 4 e 5 amostras positivas. Slot 2 amostra negativa.	30
Figura 11 - Características do tecido gástrico de acordo com a análise histopatológica e a presença do <i>H. pylori</i>	32
Figura 12 - Detecção dos genótipos do gene <i>vac-A</i> nas doenças gástricas estudadas.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência da infecção por *H. pylori* em diferentes populações brasileiras....**Erro!**

Indicador não definido.

Tabela 2 – Métodos diagnósticos do *H. pylori*..... 20

Tabela 3 - Descrição dos oligonucleotídeos..... 31

Tabela 4 – Correlação entre o *cag-A* e suas patologias 33

Tabela 5 - Correlação entre o *vac-A*, *cag-A* e suas patologias..... 34

Tabela 6 - Correlação entre o *dup-A*, *vac-A* e suas patologias 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>cag-A</i>	Gene Associado a Citotoxina A
°C	Graus Celsius
CO₂	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
kDa	Quilodalton
kb	Quilobytes
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
dNTP	Dinucleotídeo tri-fosfato
<i>dup-A</i>	Gene Promotor de Úlcera Duodenal (duodenal ulcer promoting)
m1	Mililitro
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
µl	Microlitro
µM	Micromolar
mM	Milimolar
ng	Nanograma
pb	Pares de Base
pH	Potencial Hidrogeniônico
U	Unidades
<i>vac-A</i>	Gene da Citotoxina Vacuolizante
♂	Masculino
♀	Feminino

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	<i>Helicobacter pylori</i>	14
2.1.1	Aspectos Gerais	14
2.1.2	Genoma e Metabolismo	15
2.1.3	Doenças associadas	17
2.1.4	Epidemiologia	18
2.1.5	Métodos diagnósticos	19
2.1.6	Tratamento	21
2.2	FATORES DE VIRULÊNCIA	21
2.2.1	<i>cag-A</i>	22
2.2.2	<i>vac-A</i>	23
2.2.3	<i>dup-A</i>	25
3	OBJETIVOS	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	27
4.2	EXTRAÇÃO DE DNA E DETECÇÃO DO <i>H. pylori</i>	27
4.3	FATORES DE VIRULÊNCIA	28
4.3.1	<i>cag-A</i>	29
4.3.2	<i>vac-A</i> (s/m)	29
4.3.3	<i>dup-A</i>	30
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5	RESULTADOS	32
5.1	DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO <i>H. pylori</i>	32
5.2	FATORES DE VIRULÊNCIA	32
5.2.1	<i>cag-A</i>	32
5.2.2	<i>vac-A</i>	33
5.2.3	<i>dup-A</i>	34
6	DISCUSSÃO	35
7	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39
	ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (USC)	43
	ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (Plataforma Brasil)	44

1 INTRODUÇÃO

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria gram-negativa, espiralada, com flagelos que coloniza a mucosa gástrica. Por não possuir nenhum competidor importante, uma vez estabelecida a infecção, há a formação de uma monocultura no estômago. A infecção por *H. pylori* está entre as mais comuns entre os seres humanos e é relacionada com processos patogênicos do sistema gastrointestinal superior, como processos neoplásicos e inflamatórios. (CHEY, 2007).

No início do século XX, vários pesquisadores relataram a presença de microrganismos em espiral no estômago de animais. Logo depois, essas bactérias foram observadas em humanos. Robin Warren, um patologista de Perth, Austrália, observou pequenas bactérias curvas que colonizam a parte inferior do estômago em cerca de 50% das biópsias dos pacientes com sintomas pépticos e que haviam sinais de inflamação presentes na mucosa gástrica ao redor de onde as bactérias foram vistas.

Barry Marshall, um jovem clínico, tornou-se interessado nas descobertas de Warren e juntos analisaram biópsias gástricas de 100 pacientes com dor abdominal. Após várias tentativas, Warren e Marshall conseguiram cultivar a espécie bacteriana com posterior erradicação da infecção com bismuto e amoxicilina ou tinidazol. (MARSHAL, 2005).

A partir destes relatos, pesquisas começaram a serem desenvolvidas. Estudos histológicos, endoscópicos e culturas de biópsia gástrica, reforçaram a premissa da participação do *H. pylori* na gênese de doenças gástricas, mas somente em 1986 Rathbone et al. obtiveram o reconhecimento oficial da identificação do *H. pylori* na mucosa do estômago e duodeno de indivíduos adultos.

O *H. pylori* aparece distribuído em todo o mundo porém, sua prevalência é maior em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento podendo atingir até 50% das crianças já aos cinco anos de idade e acima de 70% aos 10 anos de idade. O valor elevado na infância, expressa a condição de vida dos indivíduos nessa fase da vida, uma vez que a aquisição da infecção pelo *H. pylori* ocorre principalmente neste período e de forma geral, o mesmo passa a conviver com ela por toda a vida. (PARENTE, 2010).

A transmissão do *H. pylori* ocorre normalmente de pessoa para pessoa, pelas rotas oral-oral, gastro-oral e oro-fecal. Transmissão pela água, provavelmente por contaminação fecal, pode ser uma importante fonte de infecção, especialmente em populações expostas à água não tratada. (BROWN, 2000).

Há diversos métodos de diagnóstico disponíveis para detectar a presença do *H. pylori*, cada um tem suas vantagens e desvantagens. A maneira clássica de categorizar os métodos se

dá de forma invasiva ou não invasiva, ou seja, da necessidade ou não de uma endoscopia. Testes baseados em biópsia incluem avaliação histológica, cultura, reação em cadeia da polimerase (PCR), e teste da urease. Em alternativa, o teste respiratório da ureia, sorologia e teste do antígeno fecal podem ser realizadas como procedimentos não-invasivos. (PADILLA, 2014)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% dos casos de câncer gástrico poderiam ser evitados com a erradicação da bactéria. Essa é a razão pela qual a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), da OMS, classificou o *H. pylori* como um carcinógeno classe I para o câncer de estômago. Isso quer dizer que o micro-organismo está na mesma categoria do tabagismo para o câncer de pulmão e do trato respiratório e dos vírus da hepatite B e C para o câncer do fígado.

Aliado ao exposto, a literatura destaca três genes como sendo os principais marcadores de patogenicidade: o gene *cag-A* (Cytotoxin Associated Gene A), que induz a síntese de citocinas pro e anti inflamatórias como as interleucinas 1 β (IL-1 β) e 8 (IL-8); o gene *vac-A* (Vacuolating Cytotoxin A), que determina a produção de citotoxinas vacuolizantes relacionadas a apoptose; e o gene *dup-A* (Duodenal Ulcer Promoting A), que esta associado a produção elevada de IL-8 e IL-12, levando a gastrite antro-predominante. (ANGELO, 2014).

Segundo Chey (2007), a erradicação do *H. pylori* reduz ou regride alguns tipos de lesões pré-cancerosas, mas o tempo ideal para a erradicação é antes desse tipo de lesão surgir. A infecção está claramente envolvida com o desenvolvimento de úlceras gástrica devido ao fato que o *H. pylori* compromete a mucosa protetora que envolve o estômago e duodeno, alterando-o sua conformação normal causando gastrite, permitindo que os sucos digestivos lesionem o epitélio gástrico originando uma doença que pode evoluir para o câncer gástrico devido ao não tratamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Helicobacter pylori*

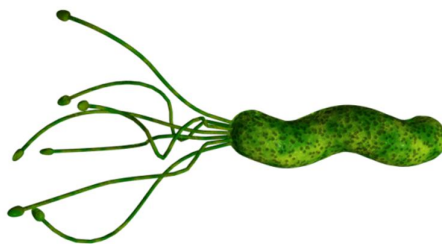
2.1.1 Aspectos Gerais

O gênero *Helicobacter* é composto atualmente de, no mínimo, 27 espécies que compartilham propriedades comuns, especialmente aquelas relacionadas com a vida no estômago, onde podem estar localizadas no fundo e no corpo gástrico, mas é principalmente no antro que as bactérias são encontradas em maior quantidade. O *H. pylori* pode distribuir-se de maneira localizada, segmentada ou difusa ao longo da mucosa gástrica, localizando-se no interior ou sob a camada de muco que recobre o epitélio. (BROWN, 2000). Etimologicamente, o nome *Helicobacter pylori* deriva das raízes: **helix** = espiral, **bacter** = bastonete e **pylorus** = parte inferior do estômago. (MURRAY, 2006).

Esta bactéria é adaptada para colonizar somente a mucosa gástrica, sendo observada raramente em áreas de metaplasia intestinal. No duodeno, a bactéria pode colonizar áreas de metaplasia, um fator de grande importância para seu papel na patogênese da úlcera péptica duodenal. A afinidade do *H. pylori* pelas células mucíparas gástricas deve-se à composição neutra do muco gástrico, diferente dos mucopolissacarídeos ácidos produzidos pelas células caliciformes da metaplasia intestinal. (LADEIRA, 2003).

A morfologia do *H. pylori* é de aspecto homogêneo, apresentando-se com estrutura encurvada ou espiralada, de superfície lisa e extremidades arredondadas, móvel, não-esporulada, gram-negativa e microaerófila. Mede aproximadamente 0,5µm a 0,1µm de largura e 3µm de comprimento, possui de quatro a seis flagelos unipolares embainhados e bulbos terminais nas extremidades lisas. (LADEIRA, 2003).

Figura 1 - *Helicobacter pylori*



Fonte: <http://www.fotosantesedepois.com/helicobacter-pylori/>

As colônias provenientes de culturas jovens são bacilos na forma espiral, enquanto as provenientes de culturas mais velhas exibem a forma esférica, conhecida como cocóide. A

conversão morfológica da forma espiral para cocóide pode se dar em uma diversidade de condições ambientais, como incubação prolongada, temperatura elevada, pH alcalino, aerobiose, entre outros fatores adversos. Culturas com formas cocóides são metabolicamente ativas, porém não podem ser repicadas, pois o microrganismo já não seria capaz de produzir colônias no novo meio. (DUNN, 2007).

2.1.2 Genoma e Metabolismo

Dois genes independentes do *H. pylori* foram completamente sequenciados e descobriu-se que ambos têm origens distintas. O *H. pylori* 26695, sequenciado pelo Instituto de Pesquisa Genômica, foi isolado no Reino Unido no início de 1980 a partir de um paciente que sofria de gastrite. Esta estirpe foi repetidamente subcultivada no laboratório antes do sequenciamento. Em contraste, o *H. pylori* J99, que foi sequenciado em colaboração entre a Astra AB (atualmente AstraZeneca PLC) e Genome Therapeutics Corporation, foi isolado nos Estados Unidos, em 1994, a partir de um paciente que sofria de úlcera duodenal e duodenite. (NOONAN, 2001).

O genoma do *H. pylori* consiste em um cromossomo circular de aproximadamente 1,7 Mpb e teor médio de G + C de 39%. Cinco regiões dentro do genoma tem composição de G + C significativamente diferente, dois deles contém uma ou mais cópias da sequência de inserção IS605 e está flanqueado por uma sequência de RNA ribossômico 5S em uma extremidade e uma repetição de 521pb na outra. Estas duas regiões são também notáveis porque contêm genes envolvidos no processamento de DNA e contém dois genes necessários para a transferência ontogênica de DNA. (TOMB, 1997).

Em contraste com outros patógenos bacterianos que são altamente clonais (como *Mycobacterium tuberculosis*), o *H. pylori* é geneticamente heterogênea, o que lhe sugere uma falta de clonalidade. A heterogeneidade genética é, possivelmente, uma adaptação do *H. pylori* para as condições gástricas do seu hospedeiro, bem como para os padrões distintos da resposta imune mediada por hospedeiro a infecção por *H. pylori*. (KUIPERS, 2000).

Uma característica fundamental do *H. pylori* é a sua microaerofilia, com o crescimento ótimo em níveis de O₂ de 2 a 5%, necessidade adicional de 5 a 10% de CO₂ e umidade elevada. Não há necessidade de H₂, embora não seja prejudicial para o seu crescimento. *H. pylori* é um microrganismo fastidioso e requer meio de crescimento complexo. Muitas vezes, estes meios são complementados com sangue ou soro. Estes suplementos podem atuar como fontes adicionais de nutrientes e, eventualmente, também proteger contra os efeitos tóxicos de ácidos de cadeia longa. (KUSTERS, 2006).

O *H. pylori* apresenta uma gama de hospedeiros mas uma restrição ao local de infecção, isto sugere uma forte adaptação para seu habitat natural. Como consequência, o *H. pylori* não possui vias biossintéticas comumente encontrados em bactérias menos especializadas, tais como muitas bactérias entéricas. Foi inferida a partir de comparações genômicas e estudos metabólicos que o *H. pylori* tem uma rota metabólica despojada com pouca redundância e carece de vias biossintéticas para alguns aminoácidos. A urease, catalase e oxidase positiva, são características que são frequentemente utilizados na identificação do microrganismo. O *H. pylori* cataboliza glicose e tanto a informação genômica e bioquímica indica que outros açúcares não podem ser catabolizados pela bactéria. (RAYMOND, 2004).

A principal característica típica desta espécie é a produção abundante de uma enzima denominada urease, a qual é responsável pela degradação da uréia em amônia alcalinizando o pH gástrico. Todas estas características são adaptativas a sobrevivência da bactéria no estômago (JERRIS, 1989).

A urease e a amônia também promovem a desestabilização da camada de muco e lesões sobre as células de revestimento, além de ser responsável pela ativação de neutrófilos, monócitos e do sistema imune para produzir lesão inflamatória local (NIELSEN & ANDERSEN, 1992; CRAIG *et al.*, 1992; MAI *et al.*, 1992).

Existem outras características da bactéria que também estão envolvidas no desenvolvimento de doenças, tais como:

Motilidade: O *H. pylori* através de seus flagelos penetra rapidamente na camada de muco que reveste a mucosa gástrica, o protegendo da acidez e dos movimentos peristálticos do estômago (GEIS *et al.*, 1989; JACKSON *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1995 e BLASER, 1997).

Aderência: O *H. pylori* é recoberto por estruturas fibrilares circulares as quais facilitam sua adesão às células epiteliais gástricas e dificulta a sua eliminação pelos movimentos peristálticos. (BOREN *et al.*, 1993; SMOOT *et al.*, 1993; PEEK *et al.*, 1996).

Produção de enzimas: Através da produção de proteases e lipases a bactéria interfere na estrutura, integridade, síntese e secreção de muco gástrico, lesando a membrana lipoprotéica das células epiteliais de revestimento.

2.1.3 Doenças associadas

O *H. pylori* apresenta um papel significativo na patogênese de um largo espectro de infecções em crianças e em adultos, como gastrite crônica, úlceras pépticas gástrica e duodenal, adenocarcinoma, linfoma gástrico e dor abdominal recorrente. (ASAHI, 2000).

Após a infecção primária, aproximadamente metade dos indivíduos infectados podem apresentar sintomas de gastrite aguda, tais como náuseas, vômitos, digestão difícil e demorada. Caracteriza-se pelo aumento transitório de secreção ácida e hipocloridria, precursora para o desenvolvimento de uma gastrite crônica ativa, denso infiltrado celular na mucosa, que devido à persistência pode causar sérios danos à mucosa gástrica, podendo evoluir para gastrite atrófica, atrofia gástrica, metaplasia. (APPELMEK, 1999).

Embora a associação entre úlcera péptica e o *H. pylori* esteja bem estabelecida, acredita-se que a bactéria seja responsável por diminuir as defesas da mucosa gástrica, facilitando o processo ulcerativo. Crianças com ulceração e colonizadas pelo *H. pylori* apresentam maiores níveis séricos de gastrina e de pepsinogênio I, assim com maiores níveis do conteúdo da gastrina na mucosa antral do que as não infectadas. Estes níveis diminuem após a erradicação do patógeno. A infecção pela bactéria também apresenta níveis elevados de acidez duodenal, predispondo à metaplasia gástrica no duodeno. (BEIER, 1997).

A infecção por *H. pylori* pode resultar na gastrite crônica, um infiltrado celular de linfócitos imunocompetentes e de IgA, IgG, IgM e secretoras de células plasmáticas na mucosa gástrica (ARMUZZI, 2001). Em 1994, um Centro Internacional de Investigação encontrou provas suficientes para classificar *H. pylori* como carcinogêneo humano para câncer gástrico. No entanto, alguns pesquisadores acreditam que a epidemiologia evidenciada é contraditória e que esta agência foi prematura na sua designação de grupo 1, porque o *H. pylori* aparece para desempenhar um papel apenas no início da inflamação crônica (uma ocorrência comum em grande parte do mundo) mas não nas últimas etapas que levam à carcinogênese (ATHERTON, 1997).

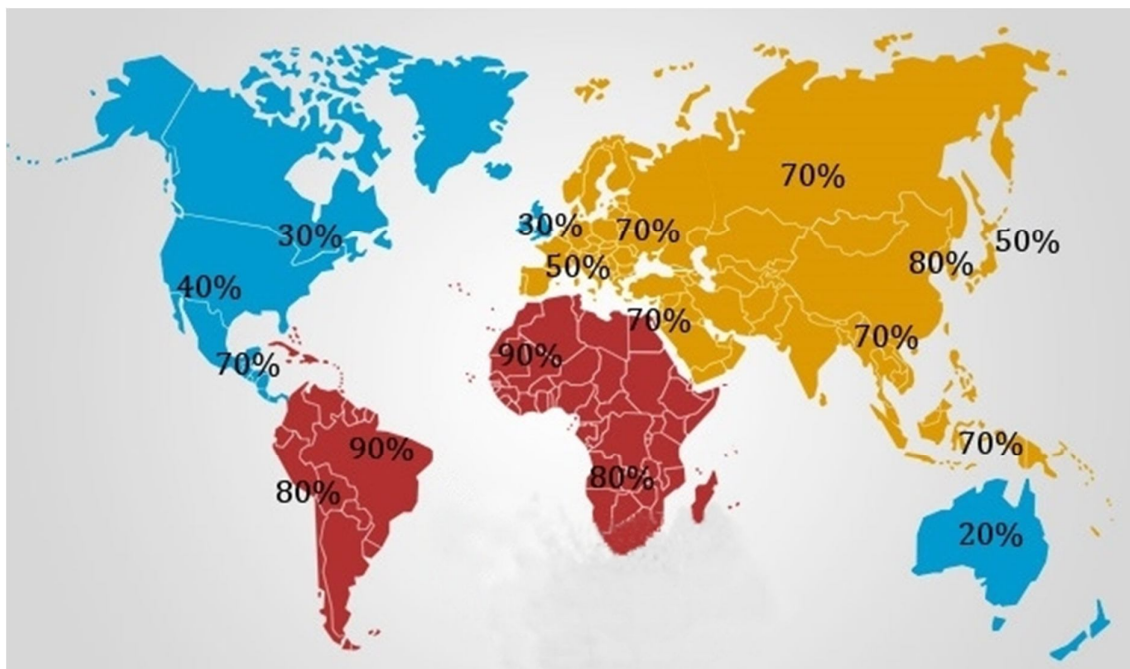
Há alguma preocupação de que infecções por *H. pylori* podem estar associado a um risco aumentado de doença cardíaca coronária possivelmente devido a uma inflamação sistêmica de baixa qualidade ou um aumento das concentrações circulantes de fatores de coagulação. Contudo, os resultados de vários estudos e análises sugerem que o *H. pylori* não é, provavelmente, um importante contribuinte para coronária doença cardíaca. (ROWLAND, 2006).

2.1.4 Epidemiologia

Globalmente, diferentes cepas de *H. pylori* são associadas a diferenças na virulência que, interagindo com fatores ambientais e do hospedeiro, levam a diferenças subsequentes na expressão da doença. Idade, etnia, gênero, geografia e condição socioeconômica são fatores que influenciam a incidência e prevalência da infecção pelo *H. pylori*. (WGO, 2010). (Figura 2).

A prevalência da infecção por *H. pylori* nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento é muito elevada, podendo atingir até 50% das crianças já aos cinco anos de idade e acima de 70% aos 10 anos de idade. (PARENTE, 2006). Em países desenvolvidos existe maior prevalência nas faixas etárias acima de 45 anos. Isso devido a alta taxa de contaminação das crianças nascidas antes de 1950, quando esses países estavam em más condições econômicas e sociais. (MAZZOLENI, 2010).

Figura 2 - *Helicobacter pylori* no mundo



Fonte: Federação Brasileira de Gastroenterologia

No Brasil estima-se que 60% a 70% dos indivíduos estejam infectados pelo *H. pylori*. Em Minas Gerais foi constatada prevalência de 34% da infecção em crianças de baixo nível socioeconômico e de 40% a 80% em adultos. Zaterka demonstra prevalências de 66,5% em homens e de 63,2% em mulheres em uma população de doadores de sangue no Estado de São Paulo. No Estado do Rio Grande do Sul um estudo encontrou prevalência de 72% de infecção pelo *H. pylori* em pacientes dispépticos funcionais. (MAZZOLENI, 2010).

2.1.5 Métodos diagnósticos

Vários métodos estão disponíveis atualmente para detectar a presença de *H. pylori*, cada um com suas próprias vantagens, desvantagens e limitações. A maneira clássica de categorizar os métodos é a necessidade ou não de uma endoscopia. Testes baseados em biópsia (necessidade de endoscopia), ou seja, invasivos, incluem avaliação histológica, cultura, reação em cadeia da polimerase (PCR), e o teste da urease (RUT). Em alternativa, o teste respiratório da ureia (UBT), sorologia e teste do antígeno fecal (SAT) podem ser realizados como procedimentos não-invasivos. (PADILLA,2014).

2.1.5.1 Não invasivos perante a endoscopia:

O teste respiratório da ureia tem como procedimento a ingestão de ureia marcada com isótopos ^{14}C ou ^{13}C . Como a uréase degrada a ureia, há formação de amônia e CO_2 , mensurando-se então, a quantidade de CO_2 exalada pela respiração. Este método é acessível, com facilidade de execução e de alta especificidade e sensibilidade. (CULTER, 1995). Na sorologia a detecção de anticorpos IgG é utilizado com maior frequência, podendo ser utilizado também a IgA. O material analisado de rotina é o soro, sendo que a saliva também é descrita como fonte de análise. Os métodos mais usados são o ELISA e o radioimunoensaio que são considerados práticos, acessíveis, de fácil execução com sensibilidade e especificidade de 90%. (HUNT, 2010).

Há também testes rápidos de consultório que utilizam as mesmas imunoglobinas, por ELISA ou hemoaglutinação. A grande vantagem é que pode ser realizado com quantidades pequenas de sangue, permitindo seu uso em consultórios médicos. O tempo para o resultado é de 10 minutos. Possui as mesmas características que o anterior, porém com sensibilidade mais baixa que o método sorológico convencional (PATEL, 2014).

O SAT utiliza um imunoensaio enzimático para detectar a presença de antígenos do *H. pylori* em amostras de fezes. É um método fiável para o diagnóstico de uma infecção ativa e para confirmar um tratamento eficaz da infecção. A sensibilidade e especificidade do SAT variam em diferentes ambientes clínicos, sendo que nos doentes não tratados, a detecção de infecção por SAT é comparável a UBT.

2.1.5.2 Invasivos perante a endoscopia:

No procedimento da endoscopia de via alta, há a coleta da biópsia para o teste rápido da urease. A biópsia é colocada em meio contendo ureia e um indicador colorimétrico de pH, em que há formação de amônia e o aumento do pH são revelados por alteração da cor do

meio, rosado quando positivo e amarelo quando negativo. É um método rápido, barato e sua sensibilidade e especialidade ficam entre 90%. (THOMAS, 1997). A histologia além de possibilitar a identificação da bactéria, permite também avaliar o tipo e a intensidade da inflamação da mucosa gástrica, a presença ou não de atrofia, metaplasia, displasia, neoplasia e a classificação da gastrite, mas devido à distribuição desigual do *H. pylori* na mucosa gástrica, amostras de tecido deve ser obtido a partir de diferentes áreas do estômago. (MOREIRA, 2004).

Na cultura, a biopsia é inoculada em placas, o que permite a correta identificação da bactéria. Sua desvantagem é o alto custo e tempo, e necessita de condições especiais para a sua realização. A vantagem é que permite a realização de testes de sensibilidade do *H. pylori* aos antimicrobianos. (PATEL, 2014).

A detecção do *H. pylori* pela técnica de biologia molecular é utilizada de forma experimental, onde há a amplificação do DNA bacteriano devido a reação em cadeia polimerase (PCR) que apesar de ser 100% sensível e específico, ainda tem custos muito elevados. (GRANSTROM, 2008).

Como todos os métodos possuem sensibilidade e especificidade altas e semelhantes, a escolha dependerá da disponibilidade e acessibilidade do teste, devendo-se considerar também o objetivo da sua realização, seja para diagnóstico, epidemiologia ou experimental. (PATEL, 2014).

Tabela 1 – Métodos diagnósticos do *H. pylori*

Diagnóstico	Principal	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Teste respiratório	Confirmação e erradicação	95	100
Teste da urease	Diagnóstico	90	90
Histologia	Diagnóstico	90	90
Cultura	Sensibilidade aos antimicrobianos	80-90	95
Sorologia	Epidemiologia e diagnóstico	90	90
SAT	Epidemiologia e diagnóstico	95	95
Biologia molecular	Experimental	100	100

Fonte: http://www.ans.gov.br/images/stories/Materiais_para_pesquisa/Materiais_por_assunto/ProdEditorialANS_Primeiras_Diretrizes_Clinicas_da_SS.pdf

2.1.6 Tratamento

A American College of Gastroenterology e a Conferencia de Maastricht sugerem terapia tripla, terapia sequencial ou terapia quádrupla. O Consenso brasileiro recomenda como primeira linha de tratamento da infecção por *H. pylori* a associação de um inibidor de bomba de prótons (iansoprazol, omeprazol, pantoprazol, rabeprazol, esomeprazol), e os antibióticos amoxicilina e claritromicina por 7 dias. (TESTERMAN & MORRIS, 2014). A duração do tratamento pode ser de até 14 dias como mencionado por Cochrane em 2012 que revelou prolongar o tratamento com Terapia Tripla de 7 para 10 dias e de 10 para 14 dias foi associado à uma taxa de erradicação mais elevada. (COELHO, 2013).

Os mais importantes fatores da falha de tratamento são o não cumprimento do regime medicamentoso e a resistência bacteriana. Eventos adversos leves são muito comuns, e eventos graves podem ocorrer em 5-20% dos pacientes. (CHEY, 2007).

No Brasil, esse regime terapêutico rende taxa de erradicação de 80%. Segundo o Consenso brasileiro e europeu, a confirmação da erradicação do *H. pylori* deve ser feita no mínimo quatro semanas após o término do tratamento, por meio do teste respiratório com ureia marcada com carbono 13, e no caso de indisponibilidade, o teste de antígeno nas fezes. No caso da indisponibilidade de ambos pode ser utilizada a endoscopia com biópsia para teste histológico ou teste da urease. O controle da erradicação deve ser feito nos pacientes com úlcera gastroduodenal, linfoma MALT gástrico ou após a ressecção precoce do câncer. (MALFERTHEINER, 2012).

Vacinas têm sido propostas como medida para controlar a infecção do *H. pylori*. Há vários estudos experimentais para garantir a eficácia da vacina e os autores consideram que ela é segura e imunogênica e que deverá ser estudada em futuros ensaios clínicos. (NEWS, 2015).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

A infecção causada pelo *H. pylori* geralmente é assintomática e acomete aproximadamente metade da população mundial, contudo, apenas 10-15% dos pacientes infectados desenvolvem doenças gástricas, incluindo úlceras pépticas, gastrite, adenocarcinoma entre outros. Devido a esse fato, cientistas iniciaram pesquisas a fim de comprovarem diferentes tipos de cepas. (BARBOSA, 2010).

Após anos de pesquisa identificaram diversos fatores de virulência bacterianos, os quais podem influenciar na capacidade da bactéria de provocar alterações morfológicas, estruturais, vacuolização e degenerações das células gástricas. (BARBOSA; SCHINONNI, 2010).

Os principais fatores de virulência do *H. pylori* incluem os genes: **cag-A** (cytotoxin associated gene A), **vac-A** (vacuolating cytotoxin A) e o mais recente descrito, **dup-A** (duodenal ulcer promoting gene A). (BROWN, 2000).

2.2.1 *cag-A*

O primeiro fator de virulência identificado no *H. pylori* foi o gene *cag-A* (Citotoxina Associada A), responsável por sintetizar uma proteína com aproximadamente 140kDa, de alta imunogenicidade e presente em mais da metade das cepas do *H. pylori*. (BARBOSA, 2010). Este marcador de virulência, está fortemente associado ao risco de desenvolvimento de câncer gástrico e úlcera péptica além de induzir altos níveis de citocinas pro e anti inflamatórias como as interleucinas 1 β (IL-1 β) e 8 (IL-8). (ASHOUR, 2002).

Um fator determinante da virulência deste gene é a Ilha de Patogenicidade (*cag-PAI*), um elemento de 40kb, que possui até 31 genes. Entre eles, existem genes homólogos aos de outras bactérias os quais codificam componentes do sistema de secreção do tipo IV, injetando moléculas efetoras na célula hospedeira, modulando a via de metabolismo celular e induzindo a expressão de proto-oncogenes. (BARBOSA, 2010).

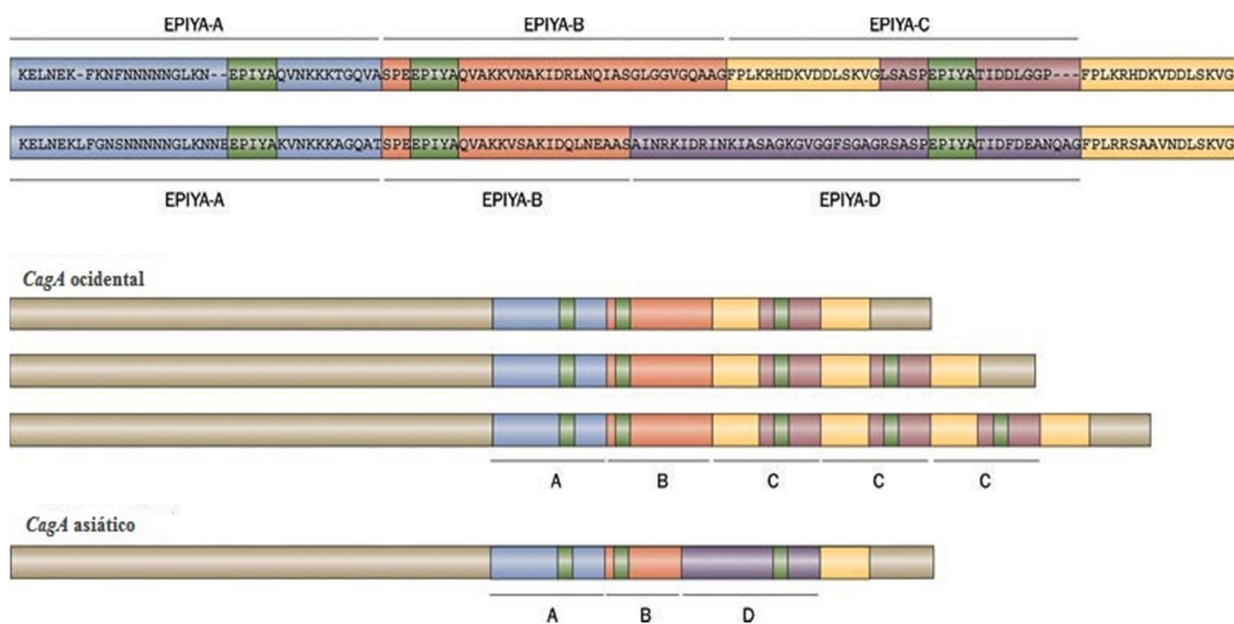
Segundo Lima e Rabenhorst, (2009), as diferenças quanto ao potencial patogênico do gene *cag-A* podem ser devido a variações na sua estrutura gênica, onde a região 5' é altamente conservada e a região 3' tem número variável de sequencias.

O *cag-A* também pode induzir alterações na fosforilação de tirosinas, nas vias de sinalização e de transdução da célula hospedeira, resultando em rearranjos do citoesqueleto e alterações morfológicas que estimulam a célula a se espalhar e se alongar de maneira idêntica a produzida pelo fator de crescimento de hepatócitos, podendo estimular a transformação celular. (LADEIRA, 2003).

Esta fosforilação ocorre na região variável C-terminal (em verde na **Figura 3**) por várias proteínas da família Src tirosina-quinase que são definidos pela sequência Glu-Pro-Ile-Tir-Ala (Epiya) e classificados como Epiya-A, B, C, ou D de acordo com os aminoácidos que o flanqueiam. Cepas *cag-A* ocidentais têm os segmentos A, B e 1 ou mais segmentos C, já as asiáticas têm os segmentos A, B e D, o que explica a variabilidade do tamanho das proteínas *cag-A*. (BELTRAN-ANAYA,2014).

O nível de fosforilação é proporcional ao número de repetições do Epiya-C, assim, o aumento desse número, aumenta o potencial pró-inflamatório e carcinogênico da proteína. Fosforilada, o *cag-A* forma complexos com a fosfatase SHP-2, resultando em um sinal anormal, levando a alterações celulares subsequentes que aumentam o risco de gerar células pré-cancerígenas. Ou seja, nos países ocidentais a incidência de câncer gástrico é significativamente mais elevado em pacientes infectados com cepas contendo vários segmentos Epiya-C do que em pacientes infectados com cepas contendo um único segmento do mesmo. (BELTRAN-ANAYA,2014).

Figura 3 - Estrutura do *cag-A*



Fonte: http://www.nature.com/nrgastro/journal/v7/n11/fig_tab/nrgastro.2010.154_F2.html

2.2.2 *vac-A*

O *vac-A* (citotoxina vacuolizante A) é um gene polimórfico em mosaico que pode ser produzido e segregado pela maioria, se não todas, as cepas de *H. pylori*. Está relacionada com úlceras pépticas tendo como função principal a intensa indução de vacúolos nas células epiteliais. Em alguns casos, induz a apoptose pela formação de poros nas membranas mitocondriais, permitindo a liberação de citocromos que interagem com a $\beta 2$ integrina nas células T e inibe o fator nuclear de transcrição de células T ativadas (NFAT), que levará à inibição da interleucina-2 (IL-2), bloqueando a ativação das células T sua proliferação. (JONES, 2010).

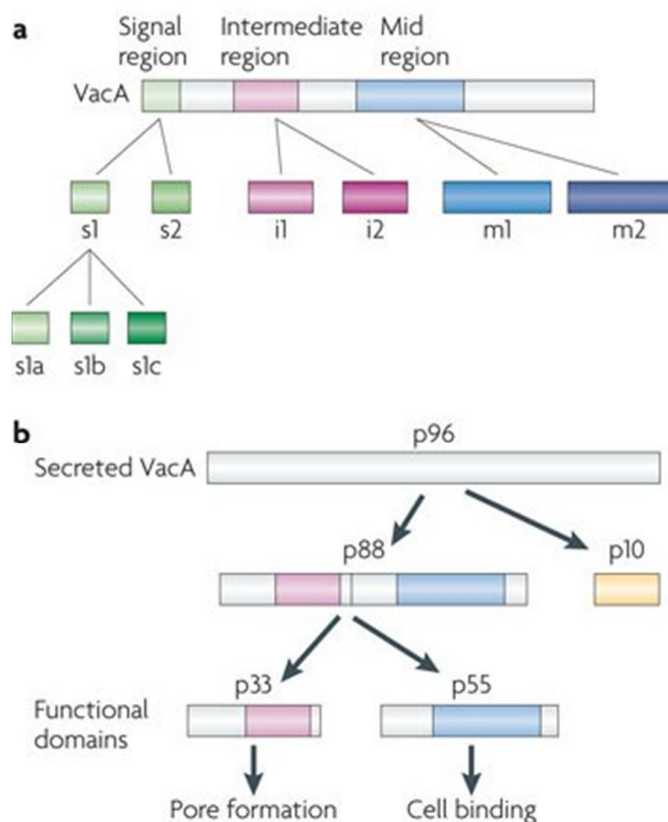
Uma vez produzido, o *vac-A* pode permanecer na superfície bacteriana ou ser secretada como uma toxina de aproximadamente 96 kDa, que é rapidamente clivado em um

domínio de 10 kDa (p10) e outro de 88 kDa (proteína madura - p88). O fragmento p88 contém dois domínios funcionais, o p33 e o p55. A forma monomérica p88 liga-se as células epiteliais de forma não específica criando canais de ânions-seletivos nas membranas endossomais, que inicialmente provocam uma hiperacidificação dos compartimentos endocíticos por transportar ânions para o interior das organelas levando a hiperatividade da V-ATPase. Esse acúmulo é devido a atividade da urease que cria um desequilíbrio osmótico resultando em sua expansão. O produto p33 é hidrofóbico, mimetiza estruturas responsáveis pela inserção na membrana celular do hospedeiro e ativam a atividade vacuolar, ao passo que o domínio p55 tem o papel crucial na ligação as células hospedeiras. (BARBOSA, 2010).

Há três regiões variáveis neste gene: média (m), sinal (s) e intermediária (i). As regiões s e m do gene *vac-A* são divergentes entre as cepas de *H. pylori*, podendo ser do tipo s1 (subdividida em s1a, s1b e s1c) ou s2 e do tipo m1, os quais também podem ser subdivididos em m1a, m1, m1-m2, m2a e m2b (CONRADI, 2012).

A variante s2, localizada na região p33, sofre clivagem em um local que proporciona uma extensão de 12 aminoácidos hidrofílicos. Já a variante s1 contém aminoácidos hidrofóbicos mais perto do local de clivagem do que a variante s2, assim, a sequência s1 é mais facilmente inserida na membrana da célula hospedeira. A variante m1, localizada na região p55, é tóxica e com isso o alelo m2 é atenuado e não consegue induzir a vacuolização. A região i está localizada entre as regiões s e m, sua função ainda é indefinida, mas acredita-se estar associada com atividade vacuolar mais forte. A atividade patogênica desta combinação de alelos é mais elevada nos genótipo s1/m1, intermediária nos genótipo s1/m2 e pobre nos genótipo s2/m2, assim o genótipo s1/m1 está associado com úlceras pépticas, gastrites e câncer gástrico e um pior prognóstico. (ASHOUR, 2002).

Nos últimos anos, estudos elucidaram múltiplos receptores para *vac-A* e mostraram que ele utiliza diferentes receptores com base em diferentes tipos de células hospedeiras (SEWALD, 2008). Nas células epiteliais, vários receptores foram identificados, entre estes estão o RPTP α (proteína tirosina fosfatase) e o RPTP β , um receptor que necessita ser glicosilado para ligar-se ao *vac-A*. (PADILLA, 2000). Quando RPTP β é aumentado artificialmente, em algumas linhas de células, a toxicidade do *vac-A* também aumenta. A importância deste receptor in vivo foi demonstrada em ratos, tornando-os resistente à ulceração do *vac-A*. (FUJIKAWA, 2003).

Figura 4 – Estrutura do gene *vac-A*

Fonte: http://www.nature.com/nrc/journal/v10/n6/fig_tab/nrc2857_F1.html

2.2.3 *dup-A*

O gene promotor de úlcera duodenal (*dup-A*) está localizado na região de plasticidade do *H. pylori* e abrange dois genes, o Jhp0917 e Jhp0918, que lhe confere abertura para leitura contínua da sequência, através da inserção de uma base T ou C após a posição 1385 na região 3' do gene Jph0917. (SOUOD, 2015).

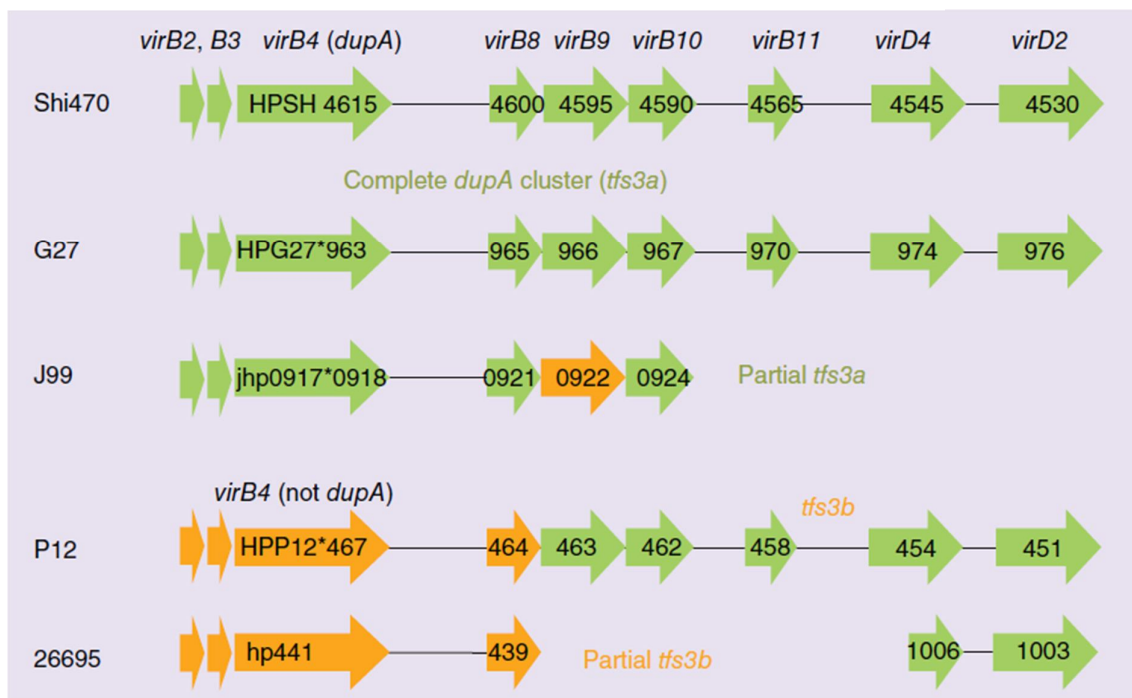
A presença deste marcador confere predisposição a úlcera gástrica duodenal e uma relação inversa ao câncer gástrico, ou seja, proteção ao câncer gástrico. Está relacionada com a produção elevada de Interleucina 8 (IL-8) no antro, levando a gastrite antro-predominante e induz a produção de Interleucina 12 (IL-12) a partir de monócitos. (JUNG, 2012).

dup-A e *virB4*, genes que codificam proteínas do sistema de secreção do tipo IV (T4SS) em *Agrobacterium tumefaciens*, são homólogos e estão envolvidos na virulência bacteriana. Três grupos de genes que codificam T4SS foram reconhecidos no *H. pylori*: um sistema de translocação da proteína codificada pela ilha de patogenicidade do *Cag-PAI*, um

sistema de captação de DNA codificada pelo cluster e um outro cluster desconhecido na zona de plasticidade. (YAMAOKA, 2014).

O gene *vir* tem seis genes homólogos (*virB8*, *B9*, *B10*, *B11*, *virD2* e *D4*) na zona de plasticidade, o que sugere que ele contribui para formar a base de dois outros T4SS chamando-os de *tfs3a* e *fs3b*, sendo que no ultimo não há o gene *dup-A*, e estão presentes em três genomas do *H. pylori* (Shi470, Cuz20 e G27). (ABADI, 2014).

Figura 5 – Sistema de secreção tipo VI - *dup-A*



Fonte: Yamaoka, Y.; Graham, D.; *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis.

3 OBJETIVOS

Diagnosticar o *Helicobacter pylori*, detectar os fatores de virulência *cag-A*, *vac-A* e *dup-A* e correlaciona-los com desenvolvimento das doenças gástricas;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram analisadas 131 amostras de DNA extraído de biópsia gástrica, coletadas de pacientes dispépticos, com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos (50♂/81♀) (média de idade - 53 anos), atendidos no setor de gastroenterologia do Hospital Estadual de Bauru e submetidos a endoscopia digestiva alta.

Coletou-se três amostras de cada paciente, uma para análise histopatológica, outra para a realização do teste da urease e uma terceira para genotipagem do *H. pylori* pela técnica de PCR.

Para a análise histopatológica de rotina, todas as amostras foram fixadas em formalina a 10% e embebidos em parafina, cortadas e coradas com hematoxilina, eosina e giemsa. Os parâmetros histológicos foram classificados de acordo com o sistema Sydney. Vale destacar que a análise histopatológica segue a dinâmica do Hospital Estadual de Bauru, uma vez que é realizada no laboratório do hospital.

Para a realização do teste da urease, o fragmento da mucosa gástrica é colocado em frasco contendo ureia e vermelho fenol como indicador de pH. O *H. pylori*, por produzir grande quantidade de urease, a ureia é desdobrada em CO₂ e amônia, aumentando o pH e mudando a cor da solução de amarela para avermelhada. O teste é considerado positivo quando a mudança de cor aparece em até 24 horas. (EISING; CARVALHAES, 2004).

No presente estudo foram utilizadas amostras de pacientes dispépticos e que não receberam drogas quimioterápicas, antiparasitárias ou antibióticos nos últimos 30 dias.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade do Sagrado Coração (processo n. 068/12), (Bauru, Brasil) e o Termo de Consentimento Livre Esclarecido obtido de todos os pacientes.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA E DETECÇÃO DO *H. pylori*

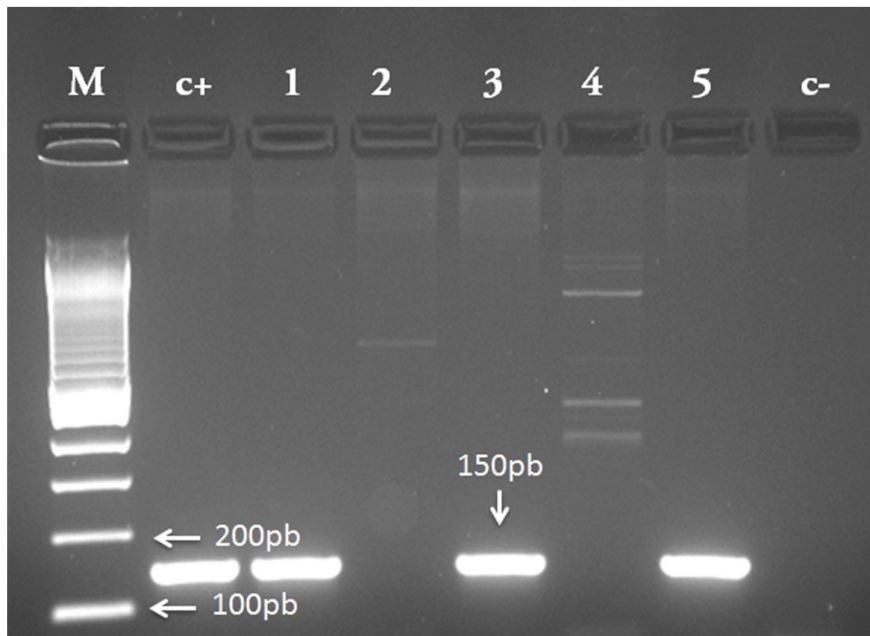
O DNA contido nas amostras de biópsia gástricas foi extraído utilizando o kit QIAamp® DNA mini kit (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a detecção do *H. pylori* empregou-se a técnica de PCR, realizada utilizando um par de oligonucleotídeos Hpx1/Hpx2 específico, o qual amplifica um fragmento de 150pb referente a um fragmento da fração 16S do RNA bacteriano.

A reação teve um volume final de 50µl e utilizou: 50ng de DNA, 1x PCR buffer, 1,5mM de MgCl₂, 10mM de dNTPs, 17µM de cada primer específico, 1,5U de Taq DNA polimerase e água. Esta reação foi incubada em um termociclador (Applied Biosystems®) utilizando as

condições descritas na **Tabela 3**. Após esse procedimento, os produtos amplificados foram detectados, por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, em um transiluminador de luz ultravioleta, após coloração com brometo de etídio, empregando-se marcador de peso molecular de 100pb.

Figura 6 - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio referente à amplificação do produto da PCR de 150pb para detecção do *H. pylori*. M: Marcador de peso molecular 100pb; C+ e C-: Controle Positivo e negativo respectivamente. Slots 1, 3 e 5 amostras positivas. Slot 2 e 4 amostras negativas.



Fonte: Elaborado pela autora.

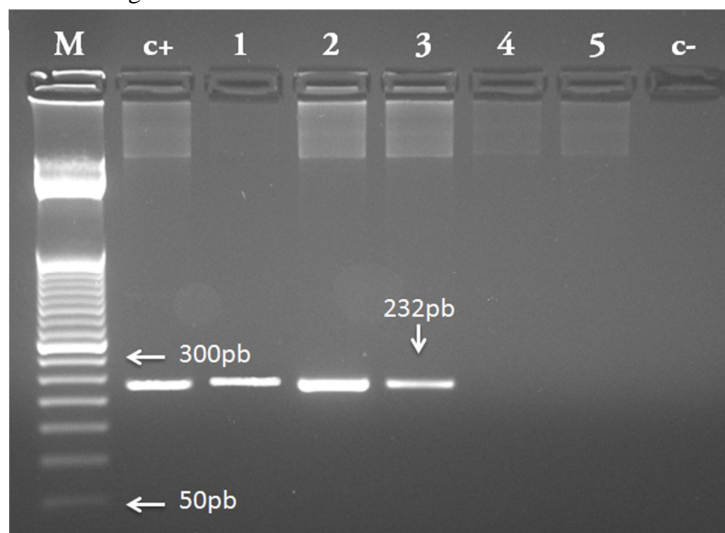
4.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Após a detecção do *H. pylori*, realizou-se os fatores de virulência *cag-A*, *vac-A* (“s” e “m”) e *dup-A* das amostras positivas. Todas estas pela técnica de PCR, utilizando o mesmo volume de reação, incubada no termociclador (Applied Biosystems®) seguindo as condições descritas na **Tabela 3**, detectados por meio de eletroforese em gel de agarose a 2% em um transiluminador de luz ultravioleta, corado com brometo de etídio e empregado marcadores de peso molecular.

4.3.1 *cag-A*

Para detecção do gene *cag-A* foram utilizados os oligonucleotídeos específicos, *cag-A*₁/*cag-A*₂ (Tabela 3).

Figura 7 - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio referente à amplificação do produto da PCR de 232pb para detecção do *cag-A*. M: Marcador de peso molecular 50pb; C+ e C-: Controle Positivo e negativo respectivamente. Slots 1, 2 e 3 amostras positivas. Slot 4 e 5 amostras negativas.



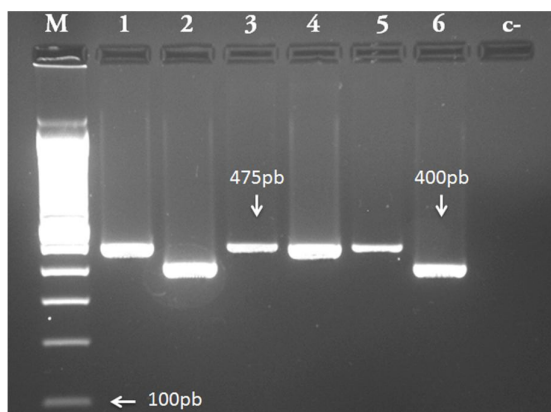
Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.2 *vac-A* (s/m)

Para detecção dos tipos alélicos “s” e “m” do gene *vac-A* foram utilizados pares de oligonucleotídeos específicos, sA/sC e mA/mB respectivamente (Tabela 3).

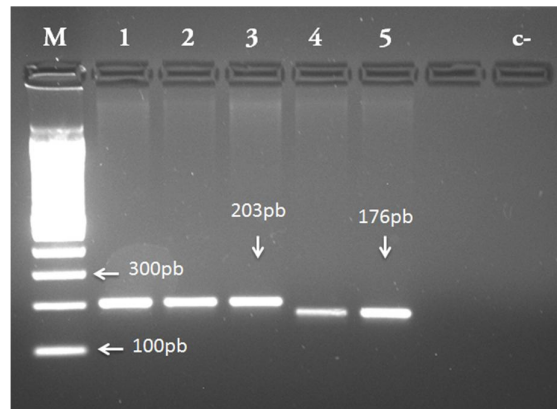
Os oligonucleotídeos “m” foram utilizados para distinguir os tipos alélicos m1 e m2, 400 e 475pb respectivamente, da região mediana do gene. Já os oligonucleotídeos “s” foram utilizados para detectar alelos s1 e s2, 176 e 203pb respectivamente, sendo “s” a região que codifica o peptídeo sinal da proteína. Na reação houve a necessidade da utilização de Taq DNA Polimerase Platinum e 5% de DMSO.

Figura 8 - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio referente à amplificação do produto da PCR de 400 e 475pb para detecção dos alelos m1 e m2 respectivamente. M: Marcador de peso molecular 100pb; C-: Controle negativo. Slots 1, 3, 4 e 5 amostras m1. Slot 2 e 6 amostras m2.



Fonte: Elaborado pela autora.

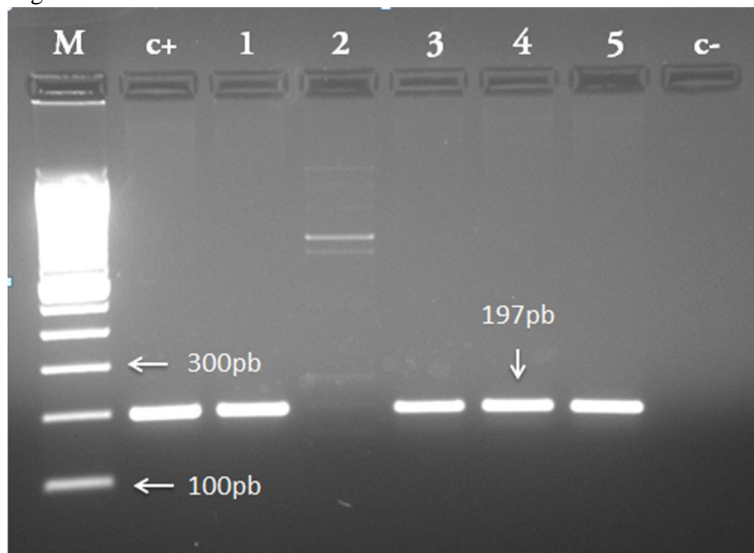
Figura 9 - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio referente à amplificação do produto da PCR de 176 e 203pb para detecção dos alelos s1 e s2 respectivamente. M: Marcador de peso molecular 100pb; C-: Controle negativo. Slots 4 e 5 amostras s1. Slot 1, 2 e 3 amostras s2.



4.3.3 dup-A

Para a detecção do gene *dup-A*, foram utilizados um par de oligonucleotídeos, descritos por Gomes et al., (2008) (**Tabela 3**), o qual amplifica um fragmento de 197pb referente ao gene em questão. Nesta reação também houve a necessidade da utilização de Taq DNA Polimerase Platinum e 5% de DMSO.

Figura 10 - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio referente à amplificação do produto da PCR de 232pb para detecção do *dup-A*. M: Marcador de peso molecular 100pb; C+ e C-: Controle Positivo e negativo respectivamente. Slots 1, 3, 4 e 5 amostras positivas. Slot 2 amostra negativa.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2 - Descrição dos oligonucleotídeos

Oligo	Sequência (5'-3')	Condições de reação	Gene	Bibliografia
hpx₁	CTGGAGARACTAAGYCCTCC	40 ciclos de 94°C por 45' / 60°C por 45' e 72°C por 45'	16S rRNA	SCHOLTE <i>et al.</i> , 1997
hpx₂	GAGGAATACTCATTGCGAAGGCG			
cag-A₁	ATGACTAACGAACTATTGATC	25 ciclos de 94°C por 60' / 53°C por 60' e 72°C por 60'	<i>cag-A</i>	Rasmussen <i>et al.</i> , 2010
cag-A₂	CAGGATTTTTGATCGCTTTATT			
sA	ATGGAAATACAACAAACACAC	35 ciclos de 94°C por 45' / 53°C por 45' e 72°C por 45'	<i>vac-A</i> (S)	ATHERTON <i>et al.</i> , 1995 DOORN <i>et al.</i> , 1998
sC	CCTGARACCGTTCCTACAGC			
mA	CACAGCCACTTTYAATAACGA	35 ciclos de 94°C por 45' / 54°C por 45' e 72°C por 60'	<i>vac-A</i> (M)	Doorn <i>et al.</i> , 1998
mB	CGTCAAATAATTCCAAGGG			
dup-A₁	CGTGATCAATATGGATGCTT	35 ciclos de 94°C por 45' / 53°C por 45' e 72°C por 45'	<i>dup-A</i>	Gomes <i>et al.</i> , 2008
dup-A₂	TCTTTCTAGCTTGAGCGA			

• Sequência do alelo s1/m1 do gene *vac-A*, da cepa 60190 de *H.pylori* (n^o. Acesso no GeneBank U05676).

• Sequência do alelo s2/m2 do gene *vac-A*, da cepa Tx30a de *H.pylori* (n^o. Acesso no GeneBank U29401).

Fonte: Adaptado pela autora.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise da expressão dos genes entre os grupos e sua associação com os marcadores de patogenicidade foram avaliadas pelos testes χ^2 e/ou Exato de Fisher e/ou pelo teste de Kruskal-Wallis. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico GraphPad Prism 5.

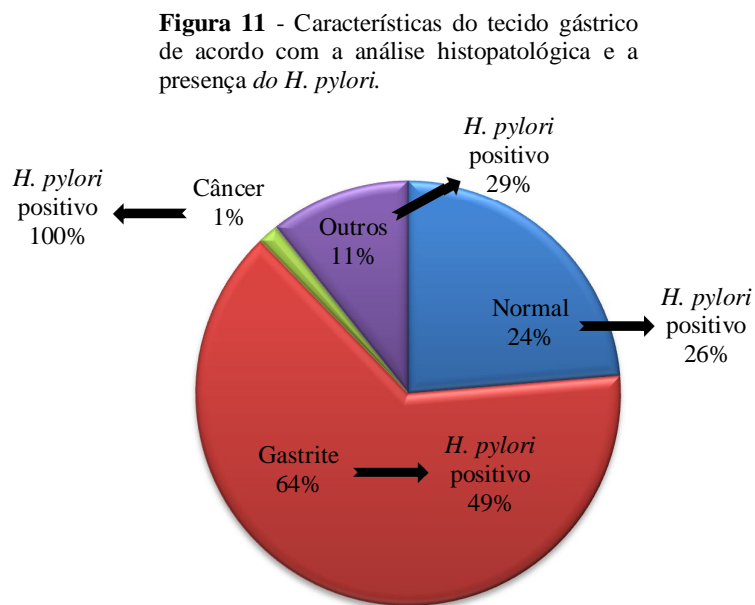
5 RESULTADOS

5.1 DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO *H.pylori*

O *Helicobacter pylori* foi detectado em 53 (41%) das 131 amostras. Em pacientes com tecido gástrico normal, o *H. pylori* foi encontrado em menor frequência, ou seja, nove (29%) das 31 amostras foram positivas.

Dos 84 pacientes com gastrite, o *H. pylori* foi detectado em 38 (45%). Nos dois casos de câncer gástrico, o *H. pylori* teve prevalência de 100%, e em outras doenças gástricas como úlceras e esofagites, das 14 amostras, 4 (29%) eram *H. pylori* positivas. A análise estatística revelou uma associação significativa entre a presença da bactéria e as doenças gástricas ($p=0,0001$).

A **Figura 11** mostra o resultado da análise histopatológica e a prevalência do *H. pylori* em cada grupo: Normal, gastrite, câncer e outros.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

5.2.1 *cag-A*

O fator de virulência *cag-A* foi detectado em 16 (30%) das 53 amostras *H. pylori* positivas. Dos *cag-A* positivos, 12 (75%) estão relacionados à gastrite e o restante apresentou-se como tecido normal, ou seja, sem patologias.

Nos casos de *cag-A* negativo, houve uma prevalência de 70% com gastrite, seguido de 14% com tecido sadio, 11% com esofagite e 5% com câncer gástrico. (**Tabela 4**)

Tabela 3 – Correlação entre o *cag-A* e suas patologias

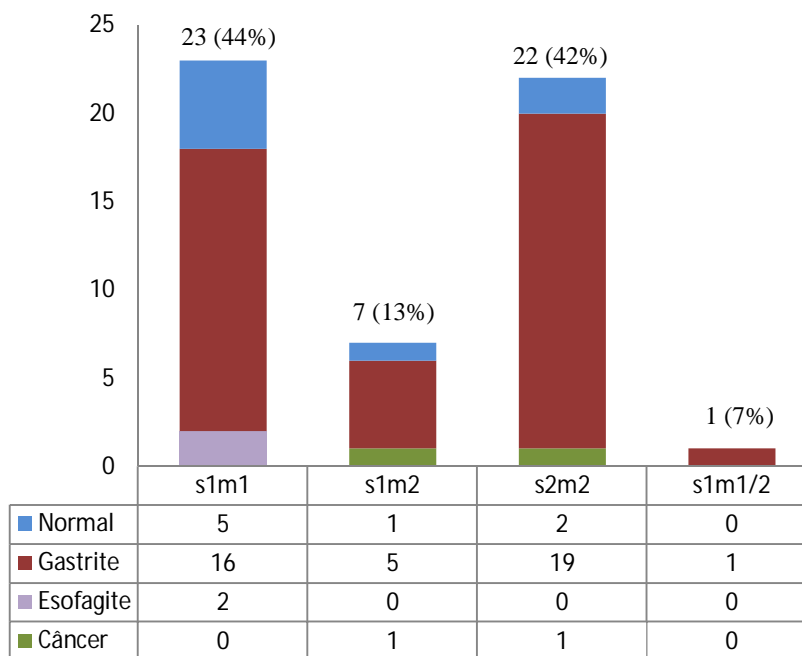
<i>cag-A</i>	Valor absoluto	Valor relativo (%)	Normal	Gastrite	Esofagite	Câncer
positivo	16	30	4	12	0	0
negativo	37	70	5	26	4	2

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.2 *vac-A*

Como já era esperado, o *vac-A* foi detectado em todas as amostras de *H. pylori* positivas. As combinações de alelos do *vac-A* estão escritos na **Figura 12**, e estes comparados às patologias.

Também verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre a presença do gene *cag-A* e o genótipo s1/m1 do gene *vac-A*. Ambos associados com o desenvolvimento de gastrite. (**Tabela 5**)

Figura 12 - Detecção dos genótipos do gene *vac-A* nas doenças gástricas estudadas

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4 - Correlação entre o *vac-A*, *cag-A* e suas patologias.

<i>vac-A</i>	<i>cag-A</i>	Valor absoluto	Valor relativo (%)	Normal	Gastrite	Esofagite	Câncer
s1m1	positivo	14	61	4	9	1	0
	negativo	9	39	1	7	1	0
s1m2	positivo	2	28	0	2	0	0
	negativo	5	72	1	3	0	1
s2m2	positivo	0	0	0	0	0	0
	negativo	22	100	2	19	0	1
s1m1/2	positivo	0	0	0	0	0	0
	negativo	1	100	0	1	0	0

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.3 dup-A

Das amostras positivas para *H. pylori*, o gene *dup-A* esteve presente em 57%. Ao correlacioná-lo com o gene *cag-A* obteve-se uma proporção de 36% para ambos os genes negativos, 34% para *cag-A* negativo e *dup-A* positivo, 23% para ambos positivos e 7% para *cag-A* positivo e *dup-A* negativo.

A relação entre o *dup-A*, o *vac-A* e as patologias estão descritas na tabela a baixo:

Tabela 5 - Correlação entre o *dup-A*, *vac-A* e suas patologias

<i>dup-A</i>	Normal	Gastrite	Esofagite	Câncer	Valor absoluto	<i>vac-A</i>
positivo	3	11	1	0	15	s1m1
negativo	2	5	1	0	8	
positivo	0	3	0	1	4	s1m2
negativo	1	2	0	0	3	
positivo	0	11	0	0	11	s2m2
negativo	2	8	0	1	11	
positivo	0	0	0	0	0	s1m1/2
negativo	0	1	0	0	1	

Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

A infecção por *Helicobacter pylori* é uma das infecções bacterianas mais frequentes em todo o mundo, estando consistentemente acompanhada por reação inflamatória da mucosa gástrica. Uma vez adquirida, a infecção persiste, na maior parte dos indivíduos, por toda a vida se não tratada com drogas antimicrobianas (FORMAN, 1991). Na maioria das vezes, a infecção é assintomática ou o paciente apresenta apenas manifestações clínicas discretas. Apenas uma minoria desenvolvem úlceras pépticas, importante causa de morbidade em todo o mundo, ou gastrite crônica atrófica, considerada um fator de risco para o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico (WHO, 1994).

Dentre as 131 amostras analisadas, 53 foram positivas para a presença da bactéria. Das amostras positivas, observou-se que 41 pacientes sofriam de gastrite, 2 de câncer, 2 de esofagite e 8 considerados normais.

A detecção do *H. pylori* também foi realizada em outros trabalhos e em outras regiões, Matsuhisa *et al.* detectaram a presença desta bactéria em 48% dos pacientes japoneses, além de analisar a relação desta positividade com a idade dos pacientes. A infecção teve maior prevalência entre os jovens, diminuindo com o aumento da idade. De acordo com estudos de Saber *et al.*, a prevalência do *H. pylori* foi de 72% em pacientes Sauditas, sendo este percentual dentro da vasta gama das infecções por esta bactéria, que fica em torno de 50 - 70% na Arábia Saudita.

Esta variabilidade na prevalência entre os diferentes estudos podem ser atribuídas as diferentes técnicas utilizadas na detecção da bactéria, as diferentes localizações geográficas, e até mesmo os hábitos de higiene dos pacientes analisados. (CENSINI, 1996).

Com relação a detecção do gene *cag-A*, nas amostras analisadas no presente estudo, detectou-se que 30% dos pacientes positivos para a presença de *H. pylori*, portam o gene *cag-A* independente de gênero e/ou idade. O presente estudo demonstrou uma relação entre a presença do gene *cag-A* e o estado clínico dos pacientes, ou seja, a detecção do gene foi significativamente maior em pacientes diagnosticados com gastrite, aproximadamente 75%, o que também pôde ser evidenciado em alguns estudos relacionando a presença deste gene com doenças gástricas (gastrites). (AREVALO, 2012).

Esses dados estão de acordo com estudos prévios, que demonstraram que pacientes infectados por cepas de *H. pylori* que expressam o gene *cag-A* têm maior probabilidade de desenvolver doenças gástricas do que aqueles infectados por cepas que não expressam *cag-A* (PARSONNET, 1997). No Brasil, estudos desenvolvidos em Belo Horizonte, Minas Gerais, demonstram que o *cag-A*, presente em aproximadamente 70%, tem alto impacto no risco para

desenvolvimento de câncer gástrico distal (QUEIROZ, 1998). Em populações europeias, venezuelanas e norte-americanas, 60% das cepas de *H. pylori* isoladas possuem o gene *cag-A*, já no Japão e na Coreia, a proporção aumenta para 90%. (MATSUHISA, 2015).

A variabilidade encontrada quanto a presença do gene *cag-A* está relacionado ao número de pacientes analisados em cada pesquisa, assim como também aos fatores que interferem direta e indiretamente na população estudada, como: fatores geográficos/ambientais, étnicos, socioeconômicos. (RIZWAN, 2014)

Como já era esperado, o gene *vac-A* foi encontrado em todas as cepas de *H. pylori* positivas. A frequência de s1 e s2 observada na população examinada neste estudo foi de 58% e 42% respectivamente. Matsuhisa et al. encontraram dados semelhantes na França, Itália, Canadá e Estados Unidos (60%).

As amostras m1 (45%) são menos frequentes que as m2 (55%) o que confere com Van et al. que afirmam uma distribuição homogênea, ou seja, aproximadamente 50% de cada alelo. Discordando com os estudos de Yamaoka, onde no leste e no norte da Europa, na América Central e no Japão a frequência do alelo m1 é de aproximadamente 75%.

Ao associarmos os alelos do *vac-A*, observou-se que 44% das amostras eram s1m1, 42% s2m2 e 7% s1m2. O genótipo s1m1 é comum no mundo inteiro, com relatos de aproximadamente 40% das cepas de *H. pylori* de todo o mundo (VAN, 2000). Já o s2m2 é menos comum, na Austrália e Norte da África e sua prevalência varia entre 30 e 35%. (YAMAOKA, 2002).

Ao relacionar o *vac-A* com o *cag-A*, observou-se que dos genótipos s1m1 e s1m2, 61% e 28% eram *cag-A* positivos, respectivamente. Segundo Cover et al. esses genótipos contêm, em sua maioria, o gene *cag-A* associado, o que está em desacordo com o presente estudo. Todas as amostras s2m2 são *cag-A* negativas, o que é compatível com os estudos realizados por Evans (1998), Jones (1999) e Rimbara (2013).

A presença do genótipo s1/*cag-A* positivo foi observada em 100% dos pacientes. No que se refere à região média do gene, grande parte dos autores não faz referência à existência de associação dos alelos m1 ou m2 com o *cag-A*. Alta frequência do genótipo m1/*cag-A* positivo foi observada neste estudo (87%), como relatado por Atherton et al. e Evans et al., para adultos. Recentemente, Van Doorn et al. relataram que, em adultos holandeses, amostras de *H. pylori* com genótipo s1/*cag-A* positivo podem ser consideradas mais virulentas, uma vez que tais amostras são predominantemente encontradas em pacientes com úlcera péptica, resultado que vem sendo confirmado por outros autores em pacientes adultos (MORALES, 1999).

O presente estudo mostrou que a prevalência do gene *dup-A* foi de 57%. O gene foi significativamente maior em pacientes diagnosticados com gastrite, aproximadamente 75%, do que em pacientes com câncer, esofagites e normais (50%, 50% e 38% respectivamente).

Há estudos controversos relatados em todo o mundo, e a associação entre a presença do *dup-A* e das doenças gástricas tem aparecido em algumas populações, mas não em todas (MATTEO, 2010). O *dup-A* geralmente é mais prevalente em estirpes ocidentais do que em linhagens asiáticas. Jung (2009) descreveu a prevalência do *dup-A* em 45% dos pacientes com gastrite. Os *H. pylori* isolados na América do Sul foram significativamente mais propensos a ser *dup-A* (80%) do que os do Leste Asiático (36%), Oriente Médio (40%) e Europa (44%) (HUSSEIN, 2010). A associação entre o *dup-A* e desenvolvimento da doença é observada principalmente em países asiáticos como a China, a Coreia, Iraque e norte da Índia.

7 CONCLUSÃO

O *H. pylori* foi detectado em 41% das amostras, indicando uma moderada prevalência da bactéria nas amostras estudadas. Quanto ao gene *cag-A* há uma baixa prevalência, aproximadamente 30%, por outro lado os alelos s1 e m1 foram os mais prevalentes e associados as doenças gástricas, assim como o gene *dup-A*. Também podemos concluir que a associação entre o gene *cag-A* e os alelos s1 e m1 do gene *vac-A* representa um importante fator à ser considerado na etiologia das doenças gástricas.

REFERÊNCIAS

- ABADI, A. T. B. **The *Helicobacter pylori dupA*: a novel biomarker for digestive diseases.** *Frontiers in Medicine*, 2014.
- ANGELO, Z. et al. **Gastric MALT lymphoma: old and new insights.** *Annals of Gastroenterology*, 2014.
- APPELMELK, B. J., et al. **Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide due to changes in the lengths of pylori.** *Infect. Immun.* 1999.
- ARMUZZI, A., F. CREMONINI, et al. **Effect of Lactobacillus GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy: a pilot study.** *Digestion*, 2001.
- ASAHI, M., T. AZUMA, et al. ***Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells.** *J. Exp. Med.*, 2000.
- ASHOUR, A. A. R. et al. **Associação entre *cagA* e alelos do *vacA* de *Helicobacter pylori* e úlcera duodenal em crianças no Brasil.** *Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial*, 2002.
- ATHERTON, J. C. **Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*.** *Gastroenterology*, 1997.
- BARBOSA, J. A.; SCHINONNI, M. I. ***Helicobacter pylori*: Associação com o câncer gástrico e novas descobertas sobre os fatores de virulência.** *Revista Ciências Médicas e Biológicas*, 2010.
- BASIRI, Z. et al. ***Helicobacter pylori vacA* d1 Genotype Predicts Risk of Gastric Adenocarcinoma and Peptic Ulcers in Northwestern Iran.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014.
- BEIER, D., SPOHN. G., SCARLATO, V. **Identification and characterization of an operon of *Helicobacter pylori* that is involved in motility and stress adaptation.** *J. Bacteriol*, 1997.
- BELTRAN-ANAYA; et al. **The EPIYA-ABCC motif pattern in *CagA* of *Helicobacter pylori* is associated with peptic ulcer and gastric cancer in Mexican population.** *BMC Gastroenterology*, 2014.
- BROWN, L. M. ***Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission.** *Epidemiologic Reviews*, 2000.
- CENSINI, S. et al. **Cag-A a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors.** *Proc Nat Acad Sci.*, 1996.
- CHEY, W. D.; WONG, B. C. Y. **American College of Gastroenterology Guideline on the Management of *Helicobacter pylori* Infection.** *Am J Gastroenterol*, 2007.

- COELHO, L. G.; et al. **Brazilian Consensus on *Helicobacter pylori***. Arq Gastroenterol, 2013.
- CONRADI, J.; et al. **An RGD Helper Sequence in CagL of *Helicobacter pylori* Assists in Interactions with Integrins and Injection of CagA**. Front Cell Infect Microbiol, 2012.
- COVER, T. L.; BLANKE, S. R. ***Helicobacter pylori vaca*, a paradigm for toxin multifunctionality**. Nature Reviews Microbiology, 2005.
- CUTLER, AF. et al. **Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori***. Gastroenterology, 1995.
- DUNN, B. E; COHEN, H; BLASER, M. J. ***Helicobacter pylori*. Clinical. Microbiology Reviews**, 1997.
- EISING, J. N.; CARVALHAES, A. **Como diagnosticar e tratar infecções por *H. pylori***. Grupo editorial Moreira Jr, 2004.
- FORMAN, D. et al. **Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation**. Br. Med. J., 1991.
- FUJIKAWA, A., et al. **Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori***. Nature Genetics, 2003.
- GUIMARÃES, J. et al. ***Helicobacter pylori*: fatores relacionados à sua patogênese**. Revista paranaense de medicina, 2008.
- GRANSTROM, M. et al. **Diagnosis of *Helicobacter pylori***. The Authors, 2008.
- HUNT, R. H, et al. ***Helicobacter pylori* nos países em desenvolvimento**. WGO Practice Guidelines, 2010.
- HUSSEIN N.R. **The association of dupA and *Helicobacter pylori* related gastroduodenal diseases**. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2010.
- JONES, K. R.; WHITMIRE, J. M.; MERRELL, D. S. **A tale of two toxins: *Helicobacter pylori* CagA and VacA modulate host pathways that impact disease**. Frontiers in Microbiology, 2010.
- JUNG, S. W.; et al. **The Intact dupA Cluster Is a More Reliable *Helicobacter pylori* Virulence Marker than dupA Alone**. Journals ASM, 2012.
- KUIPERS, E. J. **Species development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host**. J. Infect. Dis, 2000.
- KRUSTERS, J. G. et al. **Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection**. Clinical microbiology reviews, 2006.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADOR, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. **Biopatologia do *Helicobacter pylori***. Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial, 2003.

LIMA, V. P.; RABENHORST, S. H. B. **Genes associados a virulência de *Helicobacter pylori***. Revista brasileira de cancerologia, 2009.

LU H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y. **Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori***. Gastroenterology, 2005.

MALFERTHEINER, P.; et al. **Management of *Helicobacter pylori* infection**. Florence Consensus Report, 2012.

MATSUHISA, T. et al. **Gastric mucosa in Mongolian and Japanese patients with gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection**. World J Gastroenterol, 2015.

MATTEO, M.J., et al. ***Helicobacter pylori oipA, vacA, and dupA* genetic diversity in individual hosts**. J. Med. Microbiol. 2010.

MAZZOLENI, F.; et al. **Tratamento e retratamento do *H. pylori***. Grupo editorial Moreira Jr, 2010.

MORALES-Espinosa, R. et al. **Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes**. J. Clin. Microbiol., 1999.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. ***Campylobacter e Helicobacter***. Microbiologia médica, 2006.

NEWS.MED.BR. **Nova vacina recombinante oral contra o *Helicobacter pylori* está em estudo e pode ser eficaz para crianças**. Revista News Med, 2015.

NOONAN, B.; ALM, R. A. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Hazell editors, 2001.

PADILLA, F. J. B; et al. **A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication**. World Journal of Gastroenterology, 2000.

PALFRAMAN. S. L.; KWOK, T.; GABRIEL, K. **Vacuolating cytotoxina A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis**. Frontiers cellular and infection microbiology, 2012.

PARENTE, J. M. L.; PARENTE, M. P. P. D. P. **Contexto epidemiológico atual da infecção por *Helicobacter pylori***. Gastroenterol Endosc Dig., 2010.

PARSONNET, J. et al. **Risk for gastric cancer in people with *cagA* positive and *cagA* negative *Helicobacter pylori* infection**. Gut, 1997.

PATEL, S. K.; et al. **Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard?**. World J Gastroenterol, 2014.

POLK, D. B., PEEK, R. M. J. ***Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond.** Nature reviews cancer, 2010.

QUEIROZ, D.M.M. et al. **CagA-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil.** Int J Cancer, 1998.

RAYMOND, J. J. M. et al. **Genetic and transmission analysis of *Helicobacter pylori* strains within a family.** Emerg. Infect. Dis. 2004.

RIZWAN M., FATIMA N., ALVI A. **Epidemiology and pattern of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: Scenario from Saudi Arabia.** Saudi J. Gastroenterol, 2014.

ROWLAND, M., L. et al. **Age-specific incidence of *Helicobacter pylori*.** Gastroenterology, 2006.

SABER, T. et al. **Association of *Helicobacter pylori* cagA Gene with Gastric Cancer and Peptic Ulcer in Saudi Patients.** J. Microbiol. Biotechnol, 2015.

SAHARA, S.; et al. **Role of *Helicobacter pylori* cagA EPIYA motif and vacA genotypes for the development of gastrointestinal diseases in Southeast Asian countries: a meta-analysis.** BMC Infectious diseases, 2012.

SEWALD, X.; et al. **Integrin subunit CD18 is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin.** Cell host microbe, 2008.

SHIOTA S, et al. **Systematic review and meta-analysis: the relationship between the *Helicobacter pylori* dupA gene and clinical outcomes.** Gut Pathog, 2010.

SOUOD, N.; et al. **The study of the *oipA* and *dupA* genes in *Helicobacter pylori* strains and their relationship with different gastroduodenal diseases.** Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, 2015.

THOMAS, E.; et al. **The Role of the Oral Cavity in *Helicobacter pylori* Infection.** Clinical reviews, 1997.

TOMB, F. J. et al. **The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*.** International weekly journal of science, 1997.

VAN, L.J. et al. **Importance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA status for efficacy of antibiotic treatment.** Gut., 2000.

WARBURTON, V.J. et al. **Clinical and histological association of cagA and vacA genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis.** J. Clin. Pathol, 1998.

YAMAOKA, Y.; GRAHAM, D.; ***Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis.** Future Oncology, 2014.

ZATERKA, S.; et al. **Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil.** Helicobacter, 2007.

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (USC)



PRPPG
Pró-Reitoria
de Pesquisa e
Pós-Graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**CERTIFICADO**

Baseado em parecer competente este Comitê de Ética em Pesquisa analisou o Projeto “**CARACTERIZAÇÃO DO MARCADOR DE PATOGENICIDADE DUPLA, DO HELICOBACTER PYLORI, GENOTIPAGEM E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DO FATOR DE NECROSE TUMORAL E E-CADERINA EM AMOSTRAS DE CRIANÇAS E ADULTOS COM SINTOMAS PÉPTICOS**”, sob o protocolo nº 068/12, tendo como responsável o pesquisador **LUCAS TREVIZANI RASMUSSEN** e o considerou **Aprovado**.

Bauru, 28 de novembro de 2012.



Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan
Presidente Comitê de Ética em Pesquisa – USC

ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (Plataforma Brasil)

UNIVERSIDADE DO SAGRADO
CORAÇÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MICRO RNAs E DE GENES ASSOCIADOS A APOPTOSE E A INFLAMAÇÃO NAS DOENÇAS GÁSTRICAS: UMA POSSÍVEL RELAÇÃO COM O HELICOBACTER PYLORI

Pesquisador: Lucas Trevizani Rasmussen

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 46219315.0.0000.5502

Instituição Proponente: Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.119.830

Data da Relatoria: 23/06/2015

Apresentação do Projeto:

adequada, com todos os documentos necessários

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo (rs2069762) do gene da IL- 2, por meio da técnica de PCR – RFLP• Verificar a expressão gênica (mRNA) do gene da IL-2 por meio da técnica de PCR em Tempo Real;• Correlacionar às frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene da IL-2 com sua expressão e a presença do H. pylori e os marcadores de patogenicidade cagA e vacA, previamente detectados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

trata-se de estudo com dados secundários que não inclui identificação nem manipulação de casos humanos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

proposta de interesse científico

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

não se caracteriza como necessário

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Bairro: Rua Irmã Arminda Nº 10-50

CEP: 17.011-160

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)2107-7051

E-mail: prppg@usc.br

UNIVERSIDADE DO SAGRADO
CORAÇÃO



Continuação do Parecer: 1.119.830

Recomendações:

pode ser aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

nada a declarar

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BAURU, 23 de Junho de 2015

Assinado por:

**Marcos da Cunha Lopes Vimond
(Coordenador)**

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Bairro: Rua Irmã Arminda Nº 10-50

CEP: 17.011-160

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)2107-7051

E-mail: prppg@usc.br