



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

**TIAGO GOMES DA SILVA BENIGNO**

**ANÁLISE DA RESPOSTA HUMORAL CONTRA *H. pylori* EM  
PACIENTES PORTADORES E NÃO PORTADORES DE CÂNCER  
GÁSTRICO.**

**FORTALEZA**

**2013**

TIAGO GOMES DA SILVA BENIGNO

ANÁLISE DA RESPOSTA HUMORAL CONTRA *H. pylori* EM  
PACIENTES PORTADORES E NÃO PORTADORES DE CÂNCER  
GÁSTRICO.

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em cirurgia, da Faculdade de medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em ciências médico-cirúrgicas. Área de concentração: Estresse celular em pacientes infectados com *H. pylori*. Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dra. Lucia Libanez Bessa Campelo Braga.

TIAGO GOMES DA SILVA BENIGNO

ANÁLISE DA RESPOSTA HUMORAL CONTRA *H. pylori* EM  
PACIENTES PORTADORES E NÃO PORTADORES DE CÂNCER  
GÁSTRICO.

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em cirurgia, da Faculdade de medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em ciências médico-cirúrgicas. Área de concentração: Estresse celular em pacientes infectados com *H. pylori*. Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dra. Lucia Libanez Bessa Campelo Braga.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

(...)

---

(...)

---

(...)

*Primeiramente agradeço a DEUS por me dar a força necessária para superar os obstáculos da vida. Aos meus pais e minha noiva por ter me apoiado nos momentos mais difíceis dessa jornada.*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. LÚCIA LIBANEZ BESSA CAMPELO BRAGA, Professora adjunta do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade concedida, por sua orientação constante, pelo incentivo e competência com que exerce a vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, professor associado do Departamento de Cirurgia e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará (UFC), por sua dedicação à Pós-Graduação.

A Sra. BRUNA DEISE GURGEL MAIA, técnica de laboratório, pela parceria na rotina laboratorial para a realização deste estudo.

A Srta. MARIA APARECIDA ALVES DE OLIVEIRA, enfermeira, doutoranda em cirurgia, pelo companheirismo e dedicação na conclusão deste estudo.

Ao Sr. CÍCERO IGOR SIMÕES MOURA SILVA, farmacêutico, doutor em cirurgia, pela parceria na rotina laboratorial para a realização deste estudo.

Ao Sr. FRANCISCO JOSEMAR ALVES DE OLIVEIRA, farmacêutico, mestre em cirurgia, pela parceria na rotina laboratorial para a realização deste estudo.

As Sras. MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA MARIA GOMES FONTENELE, secretárias do Programa de Pós-graduação em Cirurgia da UFC, pela presteza e auxílio no desempenho das atividades letivas deste programa.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da UFC, pelas disciplinas ministradas e conhecimentos partilhados para a execução do método científico.

A todos e todas que, de diversas formas, participaram, contribuíram e viabilizaram a realização deste trabalho.

“Refletir é desarrumar os pensamentos”

Jean Rostand

## RESUMO

O *Helicobacter pylori* tem acompanhado a humanidade em todas as suas rotas de migração pelo planeta. Sendo o *H.pylori* uma bactéria cosmopolita que evoluiu e se adaptou as condições mais adversas através de mutações e troca de material genético que resultaram em mudanças morfofisiológicas favoráveis. Tais mudanças contribuíram no desenvolvimento de estirpes da bactéria altamente virulentas e que provocam diferentes condições fisiopatológicas no hospedeiro. A grande variabilidade genética do *H.pylori* dificulta a investigação para se descobrir associações com determinadas patologias gastrointestinais. No entanto, marcadores de virulência da bactéria já foram identificados e associados a diferentes doenças gastrointestinais. Cepas de *H.pylori* que expressam as proteínas Cag A e Vac A tem sido encontradas em pacientes com câncer gástrico, já outros que expressam Oip A e Dup A são encontrados em pacientes com úlcera gástrica sendo considerados como genes de proteção, pois não estão relacionados com o desenvolvimento de câncer gástrico. Os métodos utilizados para detectar a infecção pelo *H.pylori* se dividem em invasivos e não invasivos. A endoscopia é um método invasivo onde se faz a biopsia e teste da uréase para detectar a presença da bactéria. O problema é que endoscopia não consegue identificar discretos pontos de colonização do *H. pylori*, ou então, é indicada quando o paciente já esta sintomático, onde se tem uma situação avançada de injúria das células epiteliais gástricas. Entre os métodos não invasivos temos os métodos sorológicos. Entre esses métodos sorológicos temos o *immunoblotting* um método que pesquisa a presença de anticorpos específicos (Ig G). A pesquisa de anticorpos contra fatores de virulência e proteínas específicas (Cag A, Vac A, Ure A, Ure B, proteína flagelar), serve tanto para detectar a infecção como mensurar o tipo de cepa de *H.pylori* presente no individuo infectado. Podendo esse método ser utilizado para investigar a resposta humoral em pacientes com e sem câncer gástrico infectados com *H.pylori*.

**Palavras-chave:** *H.pylori*, Cag A, Vac A, câncer gástrico, immunoblotting.

## ***ABSTRACT***

*Helicobacter pylori* have accompanied humanity in all its migration routes across the planet. Being the cosmopolitan *H.pylori* bacteria that evolved and adapted the most adverse conditions through mutation and genetic exchange that resulted in favorable changes morphological. Such changes contributed to the development of highly virulent strains of bacteria which cause different pathophysiological conditions in the host. The high genetic variability of *H. pylori* hinders research to uncover associations with certain gastrointestinal conditions. However, bacterial virulence markers have been identified and associated with different gastrointestinal diseases. *H. pylori* strains that express proteins Cag A and Vac A has been found in patients with gastric cancer, others expressing Dup A and Oip A are found in patients with gastric ulcer were considered protective genes, since they are not related with development of gastric cancer. The methods used to detect *H. pylori* infection can be divided into invasive and non-invasive. The endoscopy is an invasive method is where the biopsy urease test to detect the presence of bacteria. The problem is that endoscopy can't identify discrete points of colonization of *H. pylori*, or else, is indicated when the patient is already symptomatic, where you have a situation of advanced gastric epithelial cell injury. Among the non-invasive methods have serological methods. Among these serological methods have *immunoblotting* method that searches the presence of specific antibodies (Ig G). The antibodies against virulence factors and specific proteins (Cag A, Vac, Ure A, Ure B, and flagellar protein) serves both to detect infection and measure the type strain of *H. pylori* present in the infected individual. This method can be used to investigate the humoral response in patients with and without gastric cancer infected with *H. pylori*.

**Keywords:** *H. pylori*, Cag A, Vac, gastric cancer, *immunoblotting*.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASPP2 \_ Proteína que estimula a apoptose

Bab A \_ Adesina de ligação ao antigênio

C<sup>13</sup> \_ Carbono 13

C<sup>14</sup> \_ Carbono 14

Cag A \_ Citotoxina A do *Helicobacter pylori*

Cag PAI \_ Ilha de patogenicidade Cag

cagA \_ Gene associado à citotoxina A do *Helicobacter pylori*

Epiya \_ Sequência codificadora dos aminoácidos dos sítios de fosforilação da proteína Cag A

ERO's \_ Espécies reativas de oxigênio

flaA, flaB, flaK e flaH \_ Genes responsáveis pela codificação da flagelina

Ig A \_ Imunoglobulina A

Ig G \_ Imunoglobulina G

Ig M \_ Imunoglobulina M

IL 1 \_ Interleucina 1

IL 4 \_ Interleucina 4

IL 5 \_ Interleucina 5

IL 6 \_ Interleucina 6

IL 8 \_ Interleucina 8

IL 10 \_ Interleucina 10

IL 12 \_ Interleucina 12

IFN - $\gamma$  \_ Interferon gama

kDa \_ Kilodaltons

Le<sup>b</sup> \_ Antígeno de Lewis

OMS \_ Moléculas de membrana externa

$p$  \_ índice de significância

PC \_ Paciente portadores de câncer gástrico

PCF \_ Proteínas que constituem o complexo flagelar

PFC \_ Pacientes não portadores de câncer gástrico com histórico familiar de câncer de estômago na família

pH \_ Potencial de hidrogênio

PNFC \_ Pacientes não portadores de câncer gástrico sem histórico familiar de câncer de estômago na família

PSC \_ Pacientes não portadores de câncer gástrico

T4SS \_ Sistema de secreção tipo IV

Th1 \_ Células T help 1

Th2 \_ Células T helper 2

TNF \_ Fator de necrose tumoral

Ure A \_ Enzima urease A

Ure B \_ Enzima urease B

Vac A \_ Citotoxina vacuolizante

vacA \_ Gene da citotoxina vacuolizante

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1: Mecanismo de ação das enzimas presentes na membrana do <i>H.pylori</i> , tendo como destaque a urease.....	22
Figura 2: Diagrama esquemático de colonização do <i>H. pylori</i> .....	24
Figura 3: Transferência de proteínas de gel para membrana com o método de transferência horizontal.....	39
Figura 4: Técnica de Western Blotting evidenciando a adição de anticorpos.....	40
Figura 5: Distribuição dos grupos por faixa etária.....	43
Figura 6: Prevalência de anticorpos contra antígenos do <i>H.pylori</i> .....	45
Tabela 1: Comparação da resposta humoral em pacientes com e sem câncer gástrico.....	44
Tabela 2: Comparação da resposta humoral em pacientes com câncer gástrico, PFC e PNFC.....	45
Tabela 3: Comparação da resposta humoral entre PFC e PNFC.....	46
Tabela 4: comparação dos diferentes perfis de imunorreatividade contra as proteínas 19,5 e 33 kDa com os grupos.....	46
Tabela 5: comparação dos diferentes perfis de imunorreatividade contra as proteínas 19,5 e 120 kDa com os grupos.....	47
Tabela 6: comparação dos diferentes perfis de imunorreatividade contra as proteínas 120 e 87 kDa com os grupos.....	47
Tabela 7: Comparação da média do número de bandas entre pacientes com câncer gástrico e sem câncer gástrico.....	48
Tabela 8: Comparação da média do número de bandas entre PC, PFC e	

PNFC.....	48
Tabela 9: Análise da prevalência de anticorpos contra Cag A por faixa etária nos PC.....	49
Tabela 10: Análise da prevalência de anticorpos contra Cag A por faixa etária nos PSC.....	49
Tabela 11: Análise da prevalência de anticorpos contra Cag A por gênero nos PC.....	50
Tabela 12: Análise da prevalência de anticorpos contra Cag A por gênero nos PSC.....	50

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....	15
1.2. Sistema de Secreção tipo IV e ilha de patogenicidade cag (cag pai).....	17
1.3. Proteína Cag A.....	18
1.4. Proteína Vac A.....	20
1.5. Enzima Urease.....	21
1.6. Outros fatores de virulência do <i>H. pylori</i> .....	23
1.6.1. Complexo flagelar.....	23
1.6.2. Moléculas da membrana externa.....	23
1.7. Resposta imunológica ao <i>H.pylori</i> .....	25
1.7.1. Resposta imunológica inata ao <i>H.pylori</i> .....	25
1.7.2. Resposta imunológica adquirida ao <i>H.pylori</i> .....	26
1.8. Métodos diagnósticos para detectar infecção por <i>H.pylori</i> .....	27
1.8.1. Métodos Invasivos.....	28
1.8.2. Métodos Não Invasivos.....	30
1.9. <i>H.pylori</i> e câncer gástrico.....	33
1.10. <i>H.pylori</i> e histórico familiar de câncer de estômago.....	34
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVOS.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Causuística.....	36
4.2. Desenho do estudo.....	36
4.3. Seleção dos participantes.....	36
4.4. Critérios de positividade para infecção por <i>H. pylori</i> .....	37
4.5. Produção e doseamento de antígenos.....	38

4.6. Western Blotting.....	38
4.7. Immunoblotting.....	39
4.8. Interpretação do immunoblotting.....	41
4.9. Análise estatística.....	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1. Caracterização da amostra para avaliação da resposta humoral em pacientes com e sem câncer gástrico.....	42
5.2. Análise da prevalência de anticorpos contra antígenos do <i>H.pylori</i> em pacientes com e sem câncer gástrico.....	43
5.3. Análise do número de bandas dos pacientes com e sem câncer gástrico.....	47
5.4. Análise da prevalência de anticorpos contra Cag A por faixa etária e gênero.....	48
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERÊNCIAS.....	57

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *Helicobacter pylori*

A infecção por *Helicobacter pylori* continua sendo a mais comum infecção bacteriana crônica em todo o mundo. A prevalência nos países em desenvolvimento oscila entre 60-90%, e a prevalência no mundo desenvolvido está em constante declínio nas últimas décadas, mas ainda está em níveis de 25-35% em muitas populações (ANNEMARIE, 2010). Apesar de um declínio geral na incidência de câncer gástrico, ele continua a ser o quarto câncer mais comum e a segunda causa de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo (YAMAOKA, 2010).

O *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa em espiral cujo nicho ecológico é o estômago humano. A bactéria tem evoluído com os seres humanos, migrou junto com a humanidade para fora da África a cerca de 58.000 anos atrás e provavelmente tenha acompanhando o homem em toda a sua evolução (YAMAOKA, 2010).

O *H. pylori* se tornou uma bactéria altamente heterogênea e sua virulência mudou com a mudança de ambiente geográfico (YAMAOKA, 2010). Cepas do *H. pylori* de diferentes áreas geográficas apresentam características filogeográficas diferentes, estas características permitiram admitir a migração das populações humanas por análises filogeográficas de *H. pylori*. Além disso, a diversidade genética das cepas de *H. pylori* é maior do que na maioria das outras bactérias e cerca de 50 vezes maior do que a da população humana (RUMIKO, 2012). Esse alto grau de heterogeneidade genética ocorre pela mudança do material genético através de rearranjos, mutações pontuais, inserções de genes e/ou deleções. A grande variação das cepas dificulta a observação de um fator específico para ser associado com determinadas doenças gástricas. No entanto, pontos específicos foram identificados e associados ao aumento no desenvolvimento de câncer gástrico (JENNIFER, 2012).

As doenças gastrointestinais induzidas pelo *H. pylori* dependem de fatores de virulência que causam danos nas células epiteliais gástricas como desordem na junção célula-célula e ruptura da barreira da mucosa gástrica. Temos como exemplos de fatores de virulência do *H.pylori*: a proteína Cag A produto do gene associado à citotoxina, a toxina vacuolizante (Vac A) e proteínas de adesão Bab A, Oip A, Hom A / B (JENNIFER, 2012).

A variação na capacidade de algumas cepas de *H. pylori* para induzir a produção de quimiocinas no epitélio gástrico tem sido associada à presença de genes presentes da ilha de patogenicidade (RAFFAELE, 1999).

As citocinas contribuem, diretamente ou indiretamente, para o dano na mucosa gástrica, através da resposta imunológica gerada contra o *H. pylori*. Os níveis da mucosa gástrica das interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF) são aumentados em indivíduos infectados por *H. Pylori* (RAFFAELE, 1999).

Em camundongos transgênicos, no qual a finalidade era a superexpressão da proteína Cag A, desenvolveram a hiperproliferação das células epiteliais gástricas e desenvolveram adenocarcinoma gástrico, demonstrando o potencial oncogênico dessa proteína bacteriana (JENNIFER, 2012). O gene *vacA* presente em todas as cepas de *H. Pylori*, mas que apenas 50-65% das cepas expressam a citotoxina que induzir vacuolização celular, também está associada com reações inflamatórias mais severas nas células epiteliais gástricas (JANULAITYTE, 2007).

O *H.pylori* está relacionado no processo de inflamação crônica da mucosa gástrica que avança para gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal, displasia e, finalmente, leva ao desenvolvimento do câncer gástrico. A gastrite atrófica crônica é uma condição inflamatória caracterizada pela perda das estruturas glandulares gástricos que são substituídos por um tecido conjuntivo (atrofia não metaplásico), ou por estruturas glandulares inadequadas (atrofia metaplásico). Alguns estudos têm tentado identificar os fatores de risco associados com a progressão das lesões pré-cancerosas (gastrite atrófica crônica ou metaplasia intestinal) para câncer gástrico (VANNELLA, 2012).

O diagnóstico para detectar o *H. pylori* envolve métodos invasivos e não invasivos. A endoscopia é um exemplo de método invasivo onde é feita a biopsia. Um teste não invasivo que poderia ser utilizado seria o teste respiratório com carbono  $^{13}\text{C}$ , só que tal método é inviável pela necessidade de um suporte técnico especializado, bem como pelo elevado gasto financeiro. Tornando assim, esse método inviável as redes de saúde pública. No entanto, o aprimoramento dos métodos sorológicos (não invasivos) para detectar a infecção pelo *H. pylori* atingiram uma precisão suficiente para serem usados como teste de triagem antes da necessidade da endoscopia ou para levantamentos soroepidemiológicos (LEPPER, 2004).



Estudos sorológicos demonstraram que cepas de *H.pylori* que expressam ambas as proteínas Cag A e Vac A são frequentemente detectadas em pacientes com câncer gástrico (JANULAITYTE, 2007).

O método sorológico western blotting pode detectar infecções causadas por estirpes de *H. pylori* que expressam Cag A e Vac A. Essas proteínas presentes no organismo estimulam uma resposta imune nos indivíduos infectados resultando na produção de anticorpos específicos. Estas imunoglobulinas presentes no indivíduo podem ser detectadas pelo *immunoblotting* (LEPPER, 2004).

## **1.2. Sistema de secreção tipo IV(T4SS) e A ilha de patogenicidade cag (cag pai)**

Os T4SSs são sistemas complexos de transporte que estão presentes em muitas bactérias gram-negativas e que estão relacionados com ancestrais sistemas de conjugação. Estes transportadores apresentam diversas funções, dentre elas temos o transporte e recepção de proteínas e fragmentos de DNA. Essa interação pode ocorrer tanto em bactérias da mesma espécie, como de espécies diferentes (BACKERT 2003).

O sistema de secreção bacteriano do tipo IV é codificado pela ilha de patogenicidade cag (cag PAI) que contém aproximadamente 32 genes. O cag PAI é um determinante de virulência do *H. pylori* bem caracterizado que está presente em cerca de 60-70% das estirpes de *H. pylori* ocidentais e praticamente 100% das estirpes do leste asiático (JENNIFER, 2012). Provavelmente essa sequência foi adquirida horizontalmente por um ancestral ainda desconhecido (AKOPYANZ, 1998).

O gene *cagA* foi reconhecido como um marcador para a região do cag PAI que está presente nas estirpes virulentas, mas ausente em ausente nas cepas de *H.pylori* menos agressivas (CENSINI, 1996).

Tem sido mostrado que células epiteliais gástricas, infectadas por cepas de *H.pylori* que apresentam o complexo gênico cag PAI, são induzidas a produzir a interleucina-8 (IL-8). A

IL-8 induz infiltração de neutrófilos, o que pode levar ao desenvolvimento de úlcera péptica ou uma inflamação persistente que possivelmente resultará em um adenocarcinoma gástrico (ZHANG, 1996).

A expressão de alguns genes de cag PAI resulta na formação de uma estrutura em forma de agulha que permite à bactéria translocar a proteína Cag A em células hospedeiras. (BACKERT, 2003).

Estudos mostram que algumas proteínas injetadas através do T4SS pelo *H.pylori*, principalmente cag A, regulam a expressão do micro RNA 155 de modo negativo. O micro RNA 155 tem influência direta sobre a regulação apoptótica das células epiteliais gástricas e tem sido relacionado diretamente com os mecanismos de supressão do câncer gástrico. Alterações da expressão desse supressor de tumor causadas pela proteína cag A, provavelmente, podem ter favorecido o desenvolvimento de CA gástrico (KOCH, 2012).

### 1.3. Proteína Cag A

O citotoxina A foi identificado em 1989. E é codificada pela ilha de patogenicidade cag (cag PAI), um segmento que codifica uma série de componentes necessários para forma o sistema de secreção do tipo IV (T4SS) (HANDA, 2007).

Mais de 90% das cepas de *H.pylori* isoladas do Leste Asiático, incluindo a Coreia, Japão e China são genotipadas como cagA positivas, enquanto 50% -60% das cepas isoladas nos países ocidentais são positivos para o gene (KIM, 2000).

A proteína Cag A é crucial para o desenvolvimento de alterações morfológicas como o alongamento celular conhecido como dispersão ou "beija-flor", um fenótipo adquirido pelas células epiteliais infectadas, e na perturbação em componentes responsáveis pela junção célula-célula no epitélio gástrico. Essas alterações podem contribuir no desenvolvimento de úlceras e câncer gástrico (BACKERT 2003).

Evidências apontam na possibilidade da proteína estimular a produção de gastrina. A gastrina, por sua vez, estimula a secreção de mais ácido na mucosa o que expõe a célula epitelial gástrica a mais um fator de pressão mutágena (ZHOU, 2011).

A expressão de diferentes proteínas de diferentes cepas isoladas em pacientes com gastrite e pacientes com câncer gástrico indicou a presença de polimorfismo. O polimorfismo da proteína Cag A é um achado importante para se determinar uma relação histopatológica com o hospedeiro (YANG, 2011).

A estrutura do gene revelou em estudos uma região altamente conservada e outra que apresenta variações que eram responsáveis pela variação de tamanho e, conseqüentemente, de peso molecular da proteína Cag A, isso ocorre devido à presença de diferentes tipos de seqüências correspondentes aos sítios de fosforilação classificados como Epiyas (YAMAOKA, 2000).

Quatro tipos de segmentos Epiya foram descritos: A, B, C e D. Cada sítio apresenta um diferente potencial de fosforilação. O principalmente alvo das epiyas na célula gástrica é a tirosina cinase (HIGASHI, 2002).

A patogenicidade da cepa de *H.pylori* é diretamente proporcional à capacidade de fosforilação da tirosina cinase pela epiya presente no poliformo de cag A. As epiyas do tipo A e B são menos patogênicas e relacionadas a úlceras gástricas e as do tipo C e D são encontradas em processos inflamatórios mais graves (PANAYOTOPOULOU, 2007).

Estudos mostram que a proteína cag A pode interagir com a proteína estimulante de apoptose (ASPP2). A ASPP2 induz a apoptose frente a algum dano no DNA, ativando o supressor de tumor p53. No entanto, a interação da ASPP2 com Cag A resulta em ASPP2 inativa, a consequência dessa interação é um efeito antiapoptótico (BUTI, 2011).

## 1.4. Proteína Vac A

Vac A é uma proteína com característica citotóxica vacuolizante, formada por monômeros e que pesa aproximadamente 87 k Da e tem capacidade de induzir a formação de vacúolos citoplasmáticos em culturas de células eucarióticas (BOQUET, 2003). Em células epiteliais gástricas de pacientes infectados por *H. Pylori* é observada a presença de vacúolos citoplasmáticos (TRICOTTET, 1986).

Quando a proteína Vac A purificada é administrada em ratinhos causa danos nas células epiteliais gástricas semelhantes aos encontrados em pacientes colonizados por *H. pylori* (TELFORD, 1994). Estudos mostram que o processo de Vacuolização dependente, estreitamente, da presença de um meio com um pH levemente básico. A amônia produzida pela urease, uma enzima presente nas cepas de *H. Pylori* pode proporcionar esse meio básico necessário no processo de vacuolização celular (RICCI, 1997).

Alguns trabalhos afirmam que a proteína Vac A atua como uma toxina multifatorial (pleitrópica), que pode ter efeito sobre as células e tecidos de mamíferos, podendo agir tanto nas funções fisiológicas como nas funções imunocelulares das células epiteliais gástricas (ROMANO, 2006).

A proteína Vac A atua como um agente responsável pela formação de canais aniônicos seletivos na membrana plasmática das células epiteliais gástricas, esses ânions plasmáticos extravasados seriam coletados pela bactéria para utilidade própria (MONTECUCCO, 2001).

A proteína Vac A também tem a capacidade de induzir a apoptose através da permeabilização da membrana mitocondrial, causando liberação do citocromo c (MANENTE, 2008).

Vac A, assim como Cag A, apresenta natureza polimórfica onde se é possível à formação de diferentes proteínas Vac A. Estas áreas de variação são amplamente definidas como regiões s, m e i localizadas, respectivamente, nas extremidades, nas regiões medianas e

intermediárias do gene. As variações na região s são: s1 e s2, na região i são: i1, i2 e i3, e na região m temos: m1 e m2. Várias combinações das regiões s, i e m estão presentes no interior de cada estirpe de *H. pylori*, para obter um determinado alelo vacA (CHUNG, 2010).

Diferentes variações representam capacidades diferentes de vacuolização. As cepas que apresentam a combinação s1, m1 e i1 são as mais agressivas e tem maior capacidade de formar canais aniônicos nas células epiteliais gástricas. Resultando, conseqüentemente, em quadros patológicos mais graves (LETLEY, 2003).

## 1.5. Enzima Urease

O *H.pylori*, ao contrário de outras bactérias gram-negativas, conseguiu se adaptar ao peculiar nicho que é o estômago humano pelo fato de ter desenvolvido um sistema complexo que lhe permite colonizar o estômago do indivíduo durante anos ou mesmo por toda a vida (FOSTER, 1999).

O principal mecanismo adaptativo do *H. Pylori* ao meio ácido é a enzima urease, que consiste de um sistema regulador complexo (HUYNH, 2007). Esse sistema também é utilizado amplamente por outras bactérias para resistir a mudanças de pH (EATON, 1991).

Foram relatados pelo menos 7 genes envolvidos tanto na formação do complexo enzimático: a ureA e ureB genes que codifica as duas subunidades da própria enzima (Ure A e Ure B, respectivamente), enquanto o ureE, ureF, ureG e ureH são genes que codificam proteínas acessórias necessárias para o desenvolvimento correto da enzima e, finalmente, ureI que codifica uma proteína responsável pelo transporte de ureia no interior do citoplasma (WEEKS, 2000).

A enzima urease catalisa a conversão de ureia, presente no estômago, em amônia (NH<sub>3</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Ambos os gases se difundem para o periplasma, onde o CO<sub>2</sub> é convertido para bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-2</sup>) pela enzima anidrase carbônica periplasmática (figura 1). A amônia produzida pela urease é usada para neutralizar tanto os protons produzidos pela

esta reação como os que entram no periplasma através do meio externo. Estima-se que o pH do espaço periplasmático da bactéria pode ser mantida de cerca de 6,1, mesmo se o pH externo cai a valores significativamente inferiores (MARCUS, 2005).

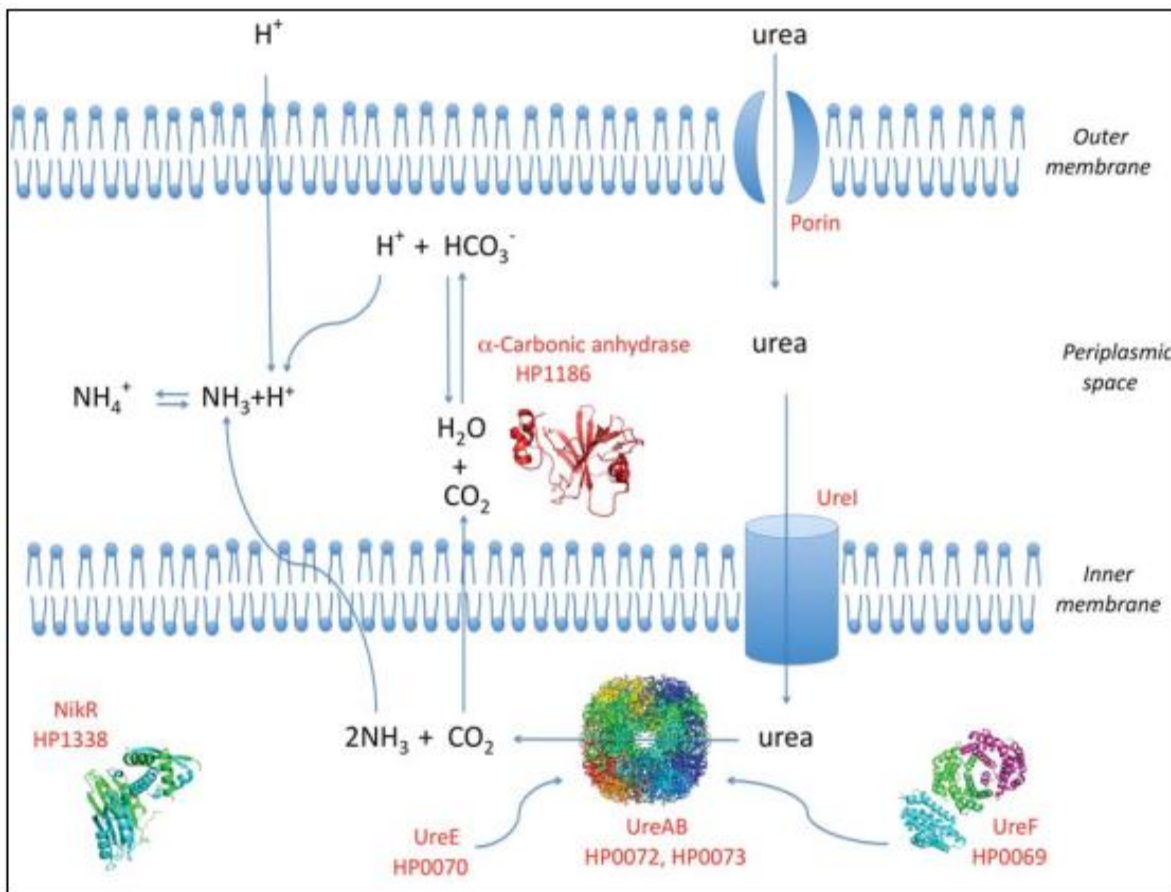


Figura 1: Mecanismo de ação das enzimas presentes na membrana do *H. pylori*, tendo como destaque a urease. Fonte: Adaptação feita a partir da referência (MARCUS, 2005).

## 1.6. Outros fatores de virulência do *H. pylori*.

### 1.6.1. Complexo flagelar

O gel de muco que recobre as células gástricas tem alta rotatividade. Tal efeito leva a *H. pylori* a depender de boa motilidade mediada por sua forma espiralada e seus flagelos para se deslocar através da camada de muco até ao epitélio gástrico. Portanto, o complexo flagelar do

*H.pylori* é um importante fator de virulência que lhe permite aderir ao epitélio gástrico (EATON, 1994).

O complexo flagelar do *H. pylori* possui um número variável de elementos podendo ser constituído de 2 a 6 flagelos. Os flagelos são formados por dois tipos de flagelina, são elas: a Fla A (maior) e Fla B (menor), essas proteínas são codificadas pelos genes *flaA* e *flaB*. (SUERBAUM, 1993).

Outros genes estão envolvidos na construção do complexo flagelar, como o gene *flidH* que codifica a proteína HAP-2 necessária na montagem dos flagelos. O gene *flgK* que codifica a proteína Flg K, que não tem seu mecanismo de ação esclarecido. No entanto, estudos mostram que a mutação do gene *flgK* em cepas de *H.pylori* provoca a perda de todos os flagelos diminuindo assim a densidade de colonização da cepa mutante (WU, 2006).

### **1.6.2. Moléculas da membrana externa**

O *H. pylori* coloniza a mucosa gástrica por aderir às células do epitélio gástrico. A adesão às células gástricas é um passo crucial no estabelecimento de uma infecção bem sucedida, pois fornece proteção contra mecanismos de compensação, como o fluxo de líquido, movimentos peristálticos ou descamação da camada mucosa (TOMB, 1997).

A bactéria produz várias moléculas de membrana externa (OMS) que aderem aos receptores presentes no epitélio gástrico do hospedeiro (figura 2). Este medeia à evasão de imunidade do hospedeiro e promove a entrega de toxinas no epitélio (SHEU, 2010).

O *H.pylori* assim como outros bacilos gram-negativos apresenta em sua membrana externa lipopolissacarídeos (LPS). As LPS do *H.pylori* apresentam uma particularidade que é a modificação de sua estrutura lipídica que o torna 500 vezes menos endotóxico em comparação a outras bactérias gram-negativas (KHAMRI, 2005).

No início dos anos 90 foram identificadas moléculas de aderência presentes nas células epiteliais gástricas para o *H.pylori*, entre elas temos a Le<sup>b</sup> que posteriormente ficou denominada como adesina de ligação ao antígeno (Bab A). Foram identificados dois genes babA são eles: babA1 e babA2, mas apenas o gene babA2 mostrou ser funcionalmente ativo (ILVER, 1998).

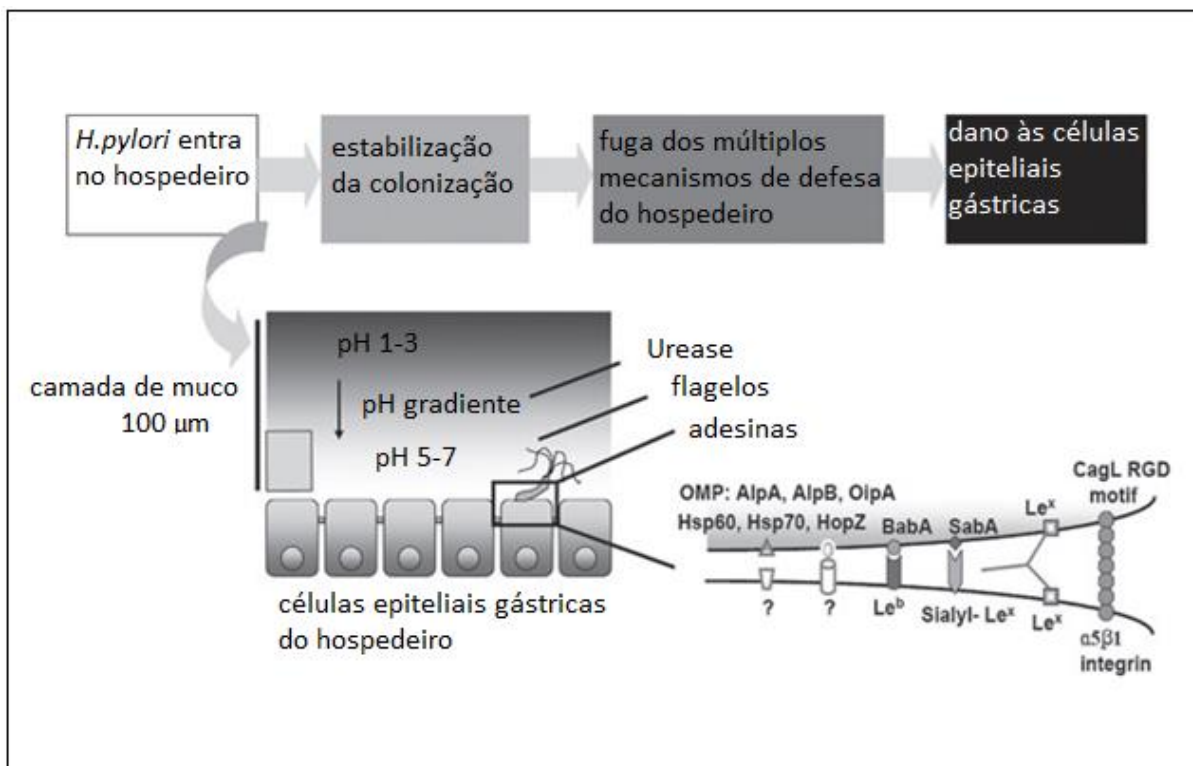


Figura 2: Diagrama esquemático de colonização do *H. pylori*. Fonte: adaptação feita apartir da referência (wu 2006).

A bactéria depois de ultrapassar a camada de muco, conseguiu aderir firmemente ao antígeno do grupo sanguíneo de Lewis fucolisado (figura 2) através da proteína de adesão Bab A. Essa proteína de membrana externa da bactéria tem peso molecular 78 k Da (PORTAL-CELHAY, 2006).

Vários estudos mostram que pacientes infectados com cepas de *H. pylori* que apresentam o gene babA tem maior risco de desenvolver doenças gastrointestinais mais graves (STYER, 2010).



## **1.7. Resposta imunológica ao *H. pylori***

A resposta imunológica para agentes bacterianos patogênicos pode ser dividida em: resposta inata e adaptativa. A resposta inata é geralmente um processo inicial não específico, que reage rapidamente contra várias moléculas bacterianas para sinalizar um processo infeccioso, com o objectivo de matar as bactérias. Em contraste, a resposta adaptativa é retardada e específica, que leva a ativação das células T e B. Essa resposta adaptativa serve também para modular a resposta imunológica inata (PORTAL-CELHAY, 2006).

### **1.7.1. Resposta imunológica inata ao *H. pylori***

A resposta imune inicial à infecção pelo *H. pylori* em adultos se dá por uma intensa infiltração de neutrófilos, associada a períodos de acloridria. Cepas *cagA* positivas (*Cag A*<sup>+</sup>) induzem a produção de níveis elevados de citocinas pro-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-8. A injeção da proteína *Cag A* nas células epiteliais gástricas está associada com a liberação de IL-8 que funciona como fator quimiotático para neutrófilos e leucócitos mononucleares, como macrófagos e monócitos para o sítio da infecção (RAD, 2002). Nesta fase existe uma redução na produção de ácido, o que facilita a colonização da bactéria no estômago (KONONOV, 2006).

A persistente migração de neutrófilos mostra-se ineficaz para a erradicação da bactéria, pois o *H. pylori* possui mecanismos enzimáticos de proteção que neutralizam a ação efetora das células imunológicas. Algumas enzimas que participam deste mecanismo de proteção são a catalase e a superóxido dismutase (KONONOV, 2006).

As células mononucleares e os neutrófilos liberam espécies reativas de oxigênio (ERO) que, juntamente com a redução nos níveis de substâncias antioxidantes, levam ao stress oxidativo das células epiteliais gástricas. Tal processo pode ser o responsável pela lesão e, posterior, modificação da molécula de DNA. Essa modificação estrutural pode causar um desequilíbrio no sistema de transdução de sinais das células epiteliais gástricas, que é

considerado um importante fator para o desenvolvimento do câncer de estômago (RIBEIRO, 2003).

### 1.7.2. Resposta imunológica adquirida ao *H. pylori*

Embora a resposta imune inata seja predominante na infecção pelo *H. pylori*, é observada uma resposta imune humoral, sistêmica e estável, com produção, principalmente, de anticorpos do tipo Ig G. Na infecção crônica observa-se, também, a presença de anticorpos específicos do tipo Ig A contra o patógeno. Estes anticorpos têm sido usados como indicadores específicos da presença de infecção por *H. pylori* em métodos sorológicos de diagnóstico (SHIMOYAMA; CRABTREE, 1998).

A produção de anticorpos não conduz a erradicação da infecção, mas pode contribuir para danos no epitélio gástrico. Alguns pacientes infectados apresentam resposta autoimune direcionada contra a H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP ase das células parietais gástricas, que está relacionada com o aumento da atrofia do corpo gástrico (NEGRINI; SAVIO; APPELMELK, 1997).

Células imaturas T-helper (Th0) expressão CD4, que podem se diferenciar em dois subtipos funcionais. As células Th1, que são secretoras de IL -2 e interferon-  $\gamma$  (IFN  $-\gamma$ ), e as células Th2, que secretam IL-4, IL-6, IL-5 e IL-10. Células Th1 e Th2 estimulam diferentemente a resposta das células B contra os microrganismos invasores. As células Th1 estimulam respostas a agente patógenos intracelulares e as células Th2 apresentam resposta a patógenos extracelulares (BAMFORD, 1998).

A resposta imune à maioria das bactérias que se fixam no ambiente extracelular dá-se através do recrutamento de clones de células T, que expressam resposta T-helper 2 (Th-2). No entanto, o *H. pylori* provoca no hospedeiro uma resposta diferenciada para um patógeno extracelular, uma vez que a maioria dos clones de células T CD4<sup>+</sup> isoladas de pacientes infectados com *H. pylori* e portadores de gastrite crônica secretam altos níveis de interferon (IFN  $-\gamma$ ), e secretam em menor quantidade IL-4, o que indica um perfil de resposta T-helper

(Th1) (HARRIS, 2000). Estudos também mostraram que o *H. pylori* induz a produção de IL-12, citocina que também está relacionada à resposta Th1 (ISRAEL; PEEK, 2001).

Um estudo genético em camundongos mostrou que as citocinas produzidas pelas células Th1 promovem gastrite, enquanto que as de origem Th2 têm um papel protetor contra a inflamação gástrica (SMYTHIES, 2000). A resposta do tipo Th1 combinada com apoptose mediada por clone de células T específicas contra o *H.pylori*, podem favorecer a infecção crônica por esta bactéria (WANG, 2001).

## **1.8. Métodos diagnósticos para detectar infecção por *H. pylori*.**

São conhecidos vários métodos para o diagnóstico do *H. pylori*, e estes podem ser divididos em dois grupos, invasivos e não invasivos. Os invasivos são aqueles que necessitam de uma endoscopia para serem realizados, pois precisam de coleta de biópsia. Temos como exemplo: histológico, cultura, teste da urease e PCR. Para os métodos não invasivos podemos citar os métodos sorológicos, teste respiratório com ureia marcada com isótopos de carbono ( $^{13}\text{C}$  e  $^{14}\text{C}$ ) (CUTLER, 1998), e também mais recentemente o Enteroteste que é uma alternativa para coleta de material biológico (GARCÍA; GISBERT, 2006; GONÇALVES, 2010).

### **1.8.1. Métodos Invasivos.**

#### **Histológico**

Este método consiste da visualização direta da bactéria em um fragmento da mucosa gástrica. Além da identificação da bactéria, também pode ser verificado o grau de inflamação do tecido. Possui alta sensibilidade e especificidade, mas não está ausente de erros. A bactéria pode ser identificada por diversas colorações histológicas, por exemplo, Giemsa, hematoxilina e eosina Warthin-Starry, Steiner e carbolfucsina.

Pode se ter resultado falso negativo quando há falhas na visualização da bactéria ou quando a coleta do fragmento foi feita em local inadequado, pois a bactéria possui uma distribuição irregular na mucosa gástrica (ROCHA, 1996).

## **Cultura**

O *H. pylori* é uma bactéria microaerófila que necessita de condições especiais para seu crescimento. Portanto, alguns fatores podem afetar a sua viabilidade. São de extrema importância os cuidados com a temperatura, meio e tempo de transporte da biópsia. Vários meios podem ser utilizados para o cultivo do *H. pylori*, como o Brain Heart Infusion (BHI) ágar, Brucella ágar, Columbia Agar ou Skirrow's Agar suplementado com sangue de cavalo, soro de cavalo, ou sangue de carneiro. A utilização de agentes antimicrobianos no meio de cultura torna-o mais seletivo para o *H. pylori*, pois as amostras podem vir contaminadas por outras bactérias e fungos, que iram competir com o *H. pylori*, e dificultar seu isolamento. Na incubação o *H. pylori* necessita de uma atmosfera microaerofílica com 5-6% de O<sub>2</sub>, 8-10% de CO<sub>2</sub>, 80-85% de N<sub>2</sub>, realizada em jarra específica para crescimento deste tipo de microrganismo. O crescimento é observado em aproximadamente sete dias. São necessários coloração de Gram e testes bioquímicos (uréase, catalase e oxidase) para finalizar a identificação do *H. pylori*. A cultura é o método mais específico para identificação e o único utilizado para determinação da sensibilidade a antimicrobianos (MALFERTHEINER, 2002). Este método é caro, e geralmente realizado em laboratórios especializados. Nos estudos dos fatores de virulência e tipagem genética tem um papel relevante (TONELLI; FREIRE, 2000).

## **Teste Rápido da Urease.**

O Teste Rápido da Urease (TRU) baseia-se na característica que o *H. pylori* tem de hidrolisar a uréia em amônia, CO<sub>2</sub> e água, através da enzima urease. Um fragmento de biópsia do antro ou um do antro e outro corpo gástrico são colocados, imediatamente após a coleta, em uma solução de uréia com indicador de pH (vermelho fenol). Se houver presença de *H. pylori* iniciará a quebra da uréia com consequente formação de amônia, que torna o pH da solução alcalina, o aumento do pH faz com que o indicador passe da cor amarela para rosa, mostrando assim que há presença de *H. pylori* na biópsia. Se a mudança ocorrer nas primeiras 24 horas, o teste é considerado positivo (ORNELLAS, 2000). Alguns fatores podem

influenciar na acurácia do TRU, por exemplo, tamanho das biópsias, temperatura durante a leitura (LAINE, 1996), tempo e temperatura de estocagem (NG, 1997). Existem alguns inconvenientes para este método, como a contaminação por bactérias produtoras de uréase, por exemplo, *Proteus sp* e *Pseudomonas sp*, que podem alterar a cor da solução durante a estocagem (NG, 1997). Recomenda-se o preparo diário da solução de uréia ou estocagem a 4°C para realização do teste, para que sejam mantidas a sensibilidade e especificidade do método. O TRU é muito usado na clínica por apresentar baixo custo, e ter uma boa acurácia (ORNELLAS, 2000).

### **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).**

O PCR apresenta uma alta sensibilidade e especificidade para a identificação do *H. pylori*. São amplificadas sequências específicas do DNA da bactéria, com a finalidade de reproduzir uma quantidade suficiente de um fragmento para ser avaliado. É uma técnica muito utilizada para identificação de microrganismos de difícil cultivo *in vitro*. Como o *H. pylori* requer condições microaerofílicas, o PCR se torna menos oneroso que a identificação por cultura (VALENTINE, 1991). Na amplificação do material genético são utilizados oligonucleotídeos sintéticos, que agem como “primers” para a replicação enzimática da sequência de DNA definida (CLAYTON, 1992).

### **1.8.2. Métodos Não-Invasivos.**

#### **Teste Respiratório com ureia marcada com isótopos de carbono (TRU- $^{13}\text{C}$ ou $^{14}\text{C}$ ).**

Este método diagnóstico fundamenta-se no mesmo princípio do TRU, com a diferença que a uréia utilizada contém isótopo  $^{13}\text{C}$  ou  $^{14}\text{C}$  de carbono na sua estrutura molecular, o que possibilita a identificação de  $\text{CO}_2$  produzido pela hidrólise da uréia, realizada pelo *H. pylori* com o auxílio da urease. O paciente ingere uma solução com ureia marcada e o  $\text{CO}_2$  produzido pela ação da urease é absorvido pelo pulmão. Após um determinado tempo o paciente expira em um balão, nesta amostra de ar pode ser identificada a presença do carbono marcado, por cintilação ou espectrografia (PETERSON, 2001). O  $^{14}\text{C}$  é radioativo e contra

indicado seu uso em crianças e mulheres grávidas. O método possui uma alta sensibilidade e especificidade, e por não ser invasivo é utilizado para o acompanhamento da eficácia do tratamento com antimicrobianos. Também é utilizado em estudos epidemiológicos (CARDINALI, 2003). No estudo de validação realizado em Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, o teste respiratório da ureia marcado com  $^{13}\text{C}$  se mostrou com alta sensibilidade (94,3%) e especificidade (100%), mesmo para crianças com idade inferior a seis anos (CARDINALI, 2003). Em outro estudo para avaliar o teste rápido de antígeno do *H. pylori* em fezes, o TRU- $^{13}\text{C}$  foi usado com padrão ouro, o que mostra a grande eficiência do método em diagnosticar a presença da infecção pelo *H. pylori* (SILVA, 2010).

### **Enteroteste.**

Trata-se de uma técnica alternativa à endoscopia digestiva alta, para obtenção de material biológico do estômago. Foi primeiramente proposta por Perez-Trallero *et al.* (1995).

A técnica consiste na ingestão de uma cápsula contendo um fio no seu interior. Ao final de um determinado tempo a cápsula é digerida e o fio entra em contato com o suco gástrico, e absorve o mesmo. O fio é retirado, a partir do suco gástrico obtido pode-se detectar o *H. pylori* por cultura e PCR.

Esta técnica apresentou altos valores de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico do *H. pylori*, em alguns países onde ela foi realizada (TORRES, 2001).

No Brasil, em Fortaleza estado do Ceará, o Enteroteste, utilizando cultura e PCR, foi validado e apresentou valores de sensibilidade de 86% e 77%, respectivamente, e especificidade de 100% em ambos os testes (GONÇALVES, 2010).

### **Sorológicos.**

A infecção pelo *H. pylori* é crônica, pois a bactéria pode ficar aderida ao epitélio do estômago do hospedeiro por toda sua vida, com uma abundante liberação de substâncias

altamente imunogênicas. A resposta imunológica do hospedeiro é intensa, mas insuficiente para eliminar a bactéria. Os principais anticorpos produzidos em resposta ao *H. pylori* são Ig G, Ig A e Ig M (LEAL, 2008). Inicialmente temos um aumento transitório de Ig M, seguido de um aumento de Ig G e Ig A, onde estes dois últimos persistem durante toda a infecção. Como os anticorpos Ig M são expressos transitoriamente, eles tem uma baixa importância para os testes diagnósticos (HERBRINK, 2000). A maioria dos métodos sorológicos para o diagnóstico do *H. pylori* baseiam-se na identificação de anticorpos específicos Ig G ou Ig A contra a bactéria. Podemos destacar duas técnicas ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e o *Immunoblotting*.

### **ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).**

É um teste imunoenzimático, baseado na ligação específica entre anticorpo e antígeno. Os antígenos específicos são fixados em uma placa de poliestireno, daí o método segue em três etapas. Primeira, contato do soro a ser analisado com os antígenos (primeiro anticorpo). Segunda, lavagem para retirada do primeiro anticorpo que não foram incorporados, e terceiro tratamento com o anticorpo secundário, que se constitui de um anticorpo para o anticorpo primário (anti Ig G humana), e que possui uma enzima acoplada a sua estrutura que produzirá uma substância colorida. Após a ligação do anticorpo secundário ao primário, a coloração só aparecerá quanto à enzima encontrada no anticorpo secundário é tratado com um substrato para o aparecimento da coloração. Pela intensidade da coloração é possível quantificar e verificar a substância de interesse.

Estudos realizados em países desenvolvidos com adultos, o método sorológico ELISA apresentou alta sensibilidade e especificidade (EVANS, 1989). Entretanto outros estudos realizados com crianças mostram baixa sensibilidade e especificidade para esta técnica diagnóstica (CZINN, 1999).

No Brasil, Oliveira *et. al.* (1999), mostrou que o método ELISA apresenta baixa sensibilidade e especificidade para crianças com idade abaixo de 12 anos de idade. Outro

estudo, também realizado com crianças e adolescentes, para avaliar a acurácia de um kit comercial de ELISA, para o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*, mostrou que para crianças com menos de 10 anos, a sensibilidade é 71,4% com ponto de corte de 5 U/mL e 75,6% para 7 U/mL e especificidade de 70,2% e 75,6% com ponto de corte de 5 U/mL e 7 U/mL, respectivamente. No grupo com idade maior que 10 anos a sensibilidade e especificidade com ponto de corte de 5 U/mL foi de 96,8% e 61,9%, para 7 U/mL 90,6% e 71,0%, respectivamente (PORTORREAL e KAWAKAMI, 2002).

Um estudo realizado na Europa, envolvendo indivíduos adultos infectados e não infectados por *H.pylori*, revelou que a prevalência de sorologia negativa diminuiu de 18,2% pelo ELISA para 6,8% pelo *Immunoblot*, ou seja, o método ELISA apresenta menor sensibilidade quando comparado com o immunoblotting (GONZÁLEZ, 2011).

### **Western Blotting**

O método sorológico Western Blotting evoluiu das técnicas de DNA (Southern) blotting e RNA (Northern) blotting (KURIEN & SCOLFIELD, 2003; 2006).

O western blotting (WB) também conhecido como protein blotting ou immunoblotting, é um poderoso e importante método utilizado para imunodeteção de proteínas após a separação destas por eletroforese em gel e transferência para membrana adsorvente. Esta técnica permite detectar, caracterizar e quantificar múltiplas proteínas, principalmente aquelas que estão em baixas quantidades em determinada amostra (KURIEN & SCOLFIELD, 2003).

Desde a década de 80 o Immunoblotting vem sendo usado na pesquisa, atualmente apresenta-se como uma importante ferramenta para o estudo epidemiológico da infecção pelo *H. pylori*, avaliando as taxa de prevalência da infecção, principalmente, em indivíduos assintomáticos (LEAL, 2008). Com uma maior relevância para os anticorpos Ig G, pois em um estudo realizado na Turquia, ensaios utilizando Ig A, se mostraram com baixa sensibilidade para a identificação da infecção pelo *H. pylori*. (YILMAZ, 2006).



Como a maioria dos métodos sorológicos utilizados para determinação da infecção pelo *H. pylori*, o Immunoblotting não é indicado para monitoramento da erradicação recente da bactéria, após tratamento com antimicrobianos, pois os anticorpos mesmo com a eliminação da bactéria ficam circulantes no sangue (BLECKER, 1994), podendo apresentar falsos positivos. Portanto, o Immunoblotting reflete o contato crônico com a bactéria e não a infecção aguda.

O immunoblotting possui uma grande vantagem que é a possibilidade de avaliação de diferentes perfis antigênicos específicos, tanto para antígenos de baixo peso molecular como os de alto peso. Os de baixo peso molecular podem ser observados na resposta imune de crianças e os de alto peso molecular em pacientes crônicos. Dessa forma o immunoblotting consegue revelar um perfil imunológico mais fidedigno dos indivíduos infectados (LEAL, 2008).

Um estudo realizado no laboratório de gastroenterologia da IBIMED, Fortaleza CE, avaliou o perfil da resposta imune humoral à infecção pelo *H.pylori* em uma comunidade urbana de Fortaleza e mostrou que o Immunoblot *in house* pode muito bem ser utilizado como método diagnóstico primário, pois apresentou alta sensibilidade (OLIVEIRA, 2012).

## **1.9. *H.pylori* e o câncer gástrico**

Há vários indícios de que a infecção por *H. pylori* é adquirida desde a infância. E que indivíduos infectados com cepas que possuem o gene *cagA* podem levar ao desenvolvimento de úlcera duodenal e carcinoma gástrico (QUEIROZ, 2000; OLIVEIRA, 2003; ROCHA, 2005).

No Brasil, tem sido realizados estudos os quais sugerem que cepas *cagA* positivas podem ter relevância clínica, com prevalência variando de 61 a 83% nas populações estudadas (MARTINS, 2005).

O risco de desenvolvimento de câncer gástrico é maior para o paciente colonizado com cepas mais agressivas do *H. pylori* como as que possuem o gene *cagA*, com expressão dos sítios de fosforilação EPIYA, e o gene *vacA* com o alelo *s1/m1* (ATHERTON, 1995).

A infecção pelo *Helicobacter pylori* é um importante fator no desenvolvimento do câncer, mesmo sendo essa neoplasia uma doença multifatorial. Estudos têm demonstrado que a infecção pelo *H. pylori* juntamente com uma predisposição genética e fatores ambientais, aumentam o risco de câncer gástrico (DANESH, 1999).

Um estudo realizado no laboratório de gastroenterologia da IBIMED, Fortaleza CE, investigou a prevalência dos genes *cagA* e *vacA* nas cepas de *H.pylori* presentes em indivíduos portadores e não portadores de câncer gástrico, e observou que a presença dos genes *cagA* e *vacAs1m1*(mais agressivo) é significante nos indivíduos com câncer gástrico (CAVALCANTE, 2010).

### **1.10. *H.pylori* e histórico familiar de câncer de estômago**

É grande a correlação entre carcinoma gástrico e histórico familiar de câncer de estômago. Estudos relataram que 10-15% dos casos de carcinoma gástrico advinham de pessoas com histórico familiar de câncer gástrico. O risco de três vezes de desenvolver o câncer gástrico em parentes de primeiro grau foi constatado em outro estudo (LISSOWSKA, 1999).

A predisposição familiar ao desenvolvimento do carcinoma gástrico é bem reconhecida, especialmente nos casos de mais de um familiar acometido, quando comparado os indivíduos infectados sem histórico de câncer gástrico na família (OGAWA, 1985; ZANGHIERI, 1990).

A associação da presença do *H. pylori* e histórico familiar de câncer gástrico eleva este risco para oito vezes maior no desenvolvimento do câncer gástrico (BRENNER, 2000).

Com relação à predisposição genética, foi verificado em um estudo, que condições pré-neoplásicas (atrofia, hipocloridia e metaplasia intestinal) ocorrem em 1/3 dos familiares de pacientes com câncer gástrico e infectados pelo *H. pylori* (CARNEIRO, 1993).

Um estudo realizado no laboratório de gastroenterologia da IBIMED, Fortaleza CE, correlacionou o genótipo para *cagA* e *vacA* em indivíduos dispépticos com e sem histórico

familiar de câncer gástrico e mostrou que o gene *cagA* é mais prevalente nos familiares de câncer gástrico (SILVA, 2009).

Contudo, no Brasil não existe trabalhos científicos analisando e comparando o perfil de imunorreatividade dos portadores de câncer e não portadores de câncer gástrico com e sem histórico familiar de câncer de estômago. Sendo necessário dessa forma uma investigação e comparação entre esses perfis de imunorreatividade.

## 2. Justificativa

Vários trabalhos já relataram os perfis de imunorreatividade de indivíduos com e sem câncer gástrico. Contudo, não há relatos na literatura sobre a comparação entre os perfis de imunorreatividade de portadores de câncer gástrico, familiares de câncer gástrico e não portadores de câncer gástrico sem histórico familiar de câncer de estômago.

Logo, existe uma necessidade de se realizar um estudo do perfil de imunorreatividade desses grupos no Brasil.

## 3. Objetivos

### 3.1. Objetivo Geral

- Estudar através do immunoblotting *in house* o perfil da resposta humoral contra os antígenos do *H. pylori* nos pacientes portadores de câncer gástrico, pacientes não portadores de câncer gástrico com e sem histórico de câncer de estômago na família.

### 3.2. Objetivos específicos

- Analisar a imunorreatividade aos antígenos do *H.pylori* em pacientes portadores de câncer gástrico, pacientes não portadores de câncer gástrico com e sem histórico de câncer de estômago na família.

- Avaliar se existe diferença no perfil de imunorreatividade a determinados antígenos do *H.pylori* entre os grupos estudados.
- Comparar a imunorreatividade dos grupos e verificar se existe diferença na prevalência de anticorpos (Ig G) contra a proteína Cag A.
- Analisar a prevalência de anticorpos (Ig G) contra a proteína Cag A por faixa etária e gênero.

## **4. Materiais e Método**

### **4.1. Casuística**

Foram selecionados 174 indivíduos infectados com *H.pylori*, 58 com câncer gástrico e 116 sem câncer gástrico. Dos 116 indivíduos sem câncer gástrico, 76 eram familiares de pacientes com câncer e 40 não tinham histórico de câncer de estômago na família. Esses pacientes são acompanhados no ambulatório da gastroenterologia do HUWC.

O estudo foi realizado no HUWC. O trabalho foi submetido à análise e, posteriormente, aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa – CONEPE da Universidade Federal do Ceará – UFC. Todos os participantes e/ou responsáveis por estes, receberam informações sobre o estudo em questão, fornecendo consentimento por escrito para a realização do mesmo.

### **4.2. Desenho do Estudo**

- Estudo prospectivo.

### **4.3. Seleção dos Participantes**

**Foram critérios de inclusão:**

- Participantes ou, responsável legal, que assinaram o termo de consentimento informado.
- Indivíduos que tinham diagnóstico de *H. pylori* através do PCR e teste da urease.

**Foram critérios de exclusão:**

- Indivíduos portadores de doenças prévias, tais como, Insuficiência Renal, Insuficiência Hepática e Insuficiência Cardíaca Congestiva.
- Indivíduos que se rejeitaram a participar do estudo.

#### **4.4. Critérios de positividade para a infecção pelo *H. pylori*.**

São considerados positivos para a infecção os indivíduos que apresentarem teste da urease positivo segundo Ornellas et al, (2000) e positivo pelo PCR para o gene ureA descrito por Clayton et al, (1992).

#### **4.5. Produção e doseamento de antígenos**

As cepas de *H.pylori* foram obtidas a partir da biópsia de 5 pacientes infectados e com algum tipo de doença gastrointestinal. Dentre os indivíduos temos: portadores de câncer gástrico, gastrite e ulcera péptica.

As biópsias foram transportadas em meio PBS, com temperatura entre 2 e 8°C. As biópsias foram maceradas com bisturi, em condições assépticas. Em seguida, o macerado foi inoculado em meio de cultura sólido, *Brain Heart Infusion* (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England), adicionado de 5% de sangue de carneiro e *Skirrow* SR069 (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England). Posteriormente, as placas foram incubadas em condições microaerófilas, em jarra de Gaspak, utilizando atmosferas Probac<sup>®</sup> (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>) à temperatura de 37°, por 7 dias.

A manutenção do ambiente microaerófilico foi mantida através da troca das atmosferas a cada 2 dias. Foram realizados vários repiques para obtenção de colônias puras de *H. pylori*. Selecionaram-se as colônias que apresentaram morfologia característica. As cepas foram submetidas aos seguintes testes de identificação, morfologia da colônia, coloração de Gram, testes bioquímicos urease, catalase e oxidase.

Para a Preparação do *pool* de antígenos as cepas foram suspensas em água destilada estéril, em seguida a suspensão foi sonicada por 6 (seis) vezes, seguindo o ciclo de 30 segundos de sonicação e 15 segundos de banho de gelo. Após a sonicação a suspensão foi centrifugada por 40 minutos a 10000 RPM. Finalmente o sobrenadante, que contém as proteínas solúveis, foi separado para ser utilizado como antígenos.

A dosagem das proteínas foi realizada utilizando-se o kit BCA<sup>TM</sup> Protein Assay (Pierce<sup>®</sup>), onde foi construída uma curva de calibração, como padrões de Albumina, utilizando espectrofotômetro Eppendorf<sup>®</sup> Biophotometer Plus (Eppendorf<sup>®</sup> - Hamburg, DEU). A concentração final de proteínas encontrado foi de 657,5 ug/mL.

## 4.6. Western Blotting

### 4.6.1. Eletroforese dos antígenos (SDS-PAGE)

Em ensaios prévios foi definido que a concentração a ser usada em cada poço era de 10 ug. O poço ficou com um volume final de 25,2 ul, com 15,2 ul de solução de antígenos e 10 ul de tampão de diluição. Posteriormente a amostra foi centrifugada, em seguida aquecida a 100°C por 5 minutos, para que ocorra a completa desnaturação das proteínas, novamente a amostra é centrifugada, a partir daí a amostra está pronta para ser inoculada no poço do gel de poliacrilamida.

A eletroforese foi realizada no equipamento Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra System (Bio-Rad). A corrida dos antígenos de *H. pylori* foi feita em gel de bis-acrilamida, onde a concentração do gel de cima (*stacking gel*) foi de 3% e o gel de corrida (*Running gel*) foi de 12%. O tampão de corrida utilizado era composto de Tris-base, glicina e SDS (*Sodium*

*dodecyl sulfate*). A tensão utilizada no gel de cima foi 120 V, em seguida ela foi aumentada para 180 V no início do gel de corrida e foi mantida até final. O padrão de proteína utilizado para marcação dos pesos moleculares foi *Precision Plus Protein Standards (Kaleidoscope)* (*Bio-Rad Laboratories, Inc.*).

#### 4.6.2. Eletrotransferência

Para a eletrotransferência, também foi usado o Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra System (*Bio-Rad*). Foi utilizada membrana de nitrocelulose 0,45µm (*Bio-rad Laboratories*). Nesta etapa foi montado um “sanduíche” com a membrana de nitrocelulose e o gel onde estão os antígenos separados por peso molecular. A montagem é feita a partir do ânodo (+) com uma esponja, um papel de filtro, a membrana de nitrocelulose, o gel, outro papel de filtro e outra esponja que ficará em contato com o cátodo (-), de acordo com a figura 1. A eletrotransferência se deu em tampão de transferência Tris/Glicina, com a seguinte constituição tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol a 20% (v/v), em temperatura de mais ou menos 4°C a 100 V por 01 hora. Em seguida a membrana foi broqueada com leite desnatado a 3%.

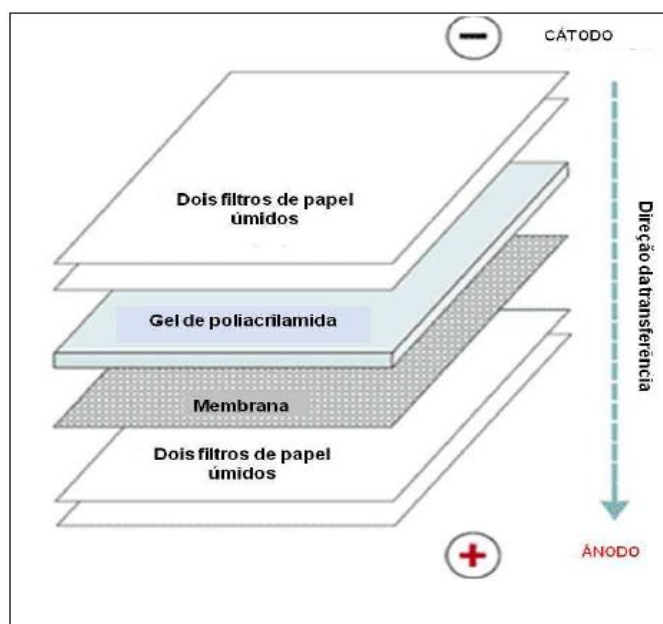


Figura 3: Transferência de proteínas de gel para membrana com o método de transferência horizontal. Fonte: <http://www.fermentas.com/techinfo/Electrophoresi/pproteintransfer.htm>.

## 4.7. Immunoblotting

Nesta etapa é onde haverá propriamente dita as interações antígeno-anticorpo. A membrana broqueada foi toda cortada em fitas, onde cada fita é o que correspondem a um poço onde os antígenos foram inoculados e separados por peso molecular no processo de eletroforese. Cada fita foi utilizada para soros de diferentes indivíduos. As fitas foram incubadas em tampão Tris-Buffered Saline (TBS), tris 20 mM, cloreto de sódio 500 mM, 0,3% Tween 20 e pH 7,5 (*Bio-Rad Laboratories, Inc*). A concentração de soro (1º anticorpo) foi de 1:100, com período de incubação de 18 horas à temperatura de mais ou menos 4°C em constante agitação. Após contato do 1º anticorpo com os antígenos de *H. pylori*, foi realizada uma sequência de cinco lavagens para retirada do excesso de soro. Posteriormente foi incubado, também em TBS, o anti-IgG humana (2º anticorpo), o anti-IgG utilizado foi o *Goat Anti-Human Ig G (H+L) AP conjugate (Bio-Rad Laboratories, Inc)*. O 2º anticorpo foi incubado com as fitas de nitrocelulose na concentração de 1:400 por 2 horas. Em seguida, a fita foi lavada com tampão substrato (Tris, cloreto de sódio e cloreto de magnésio) por 10 minutos.

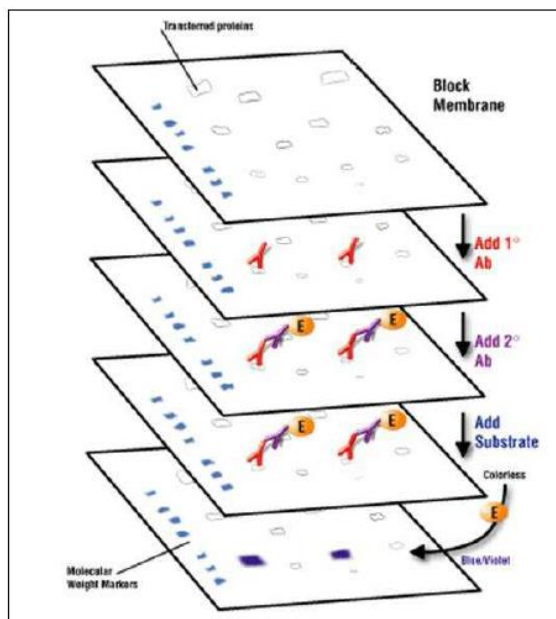


Figura 4: Técnica de Western Blotting evidenciando a adição de anticorpos. Fonte: <http://www.chemicon.com/resource/ANT101/a2B.asp>.



A revelação das bandas proteicas se deu com tampão de revelação contendo 5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl Phosphate (BCIP) e Nitro Blue Tetrazolium (NBT). As fitas ficaram em contato com o tampão de revelação por cinco minutos, em seguida a reação de revelação foi interrompida com água destilada.

Para controle das reações inespecíficas com a membrana de nitrocelulose, foram realizados testes em branco, um com uma fita com antígenos e sem soro e outro com uma fita sem antígeno e com soro.

#### **4.8. Interpretação da imunorreatividade**

Para interpretação dos resultados, foi seguido o critério utilizado por Lepper *et. al.* (2004), onde são considerados positivos para infecção pelo *H. pylori* pelo Immunoblotting *in house* os soros que apresentarem pelo menos uma banda de alto peso molecular: 120 ou 87 k Da e/ou uma combinação de pelos menos duas bandas de peso molecular  $\leq 33$  k Da.

As bandas proteicas 120 (Cag A) k Da e 87 (Vac A) k Da no sistema de Lepper *et. al.* (2004) equivalem as bandas encontradas entre 150 e 100 kDa e 100 e 75 kDa, respectivamente. Tal critério também foi adotado no atual estudo.

Para as bandas abaixo de 66 k Da, foram categorizadas em: 55-50, 45-40, 33-30 e 26-24 k Da, para facilitar a análise das tiras do immunoblotting.

#### **4.9. Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SPSS 16.0 *for Windows*. A comparação da imunorreatividade entre pacientes portadores e não portadores de câncer gástrico foi feita pelo cálculo do Qui-quadrado ( $X^2$ ) e do índice de significância ( $p$ ). A comparação entre a média do número de bandas entre os grupos foi feita pelo T-teste de Student.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. caracterização da amostra para avaliação da resposta humoral em pacientes com e sem câncer gástrico.

Foram avaliados pelo immunoblotting os soros de 174 indivíduos infectados por *H.pylori*. Em relação ao gênero, (65/174) 37% correspondiam ao gênero masculino. A média da idade foi de  $49 \pm 17$  anos e variou de 17 a 86 anos.

Dos 174 indivíduos infectados, 58 (33%) eram pacientes portadores de câncer gástrico (PC), onde (37/58) 64% correspondiam ao gênero masculino. A idade média foi de  $60 \pm 15$  anos e variou de 22 a 86 anos.

Dos 174 indivíduos infectados, 116 não eram portadores de câncer gástrico (PSC), onde (28/116) 24% correspondiam ao gênero masculino. A idade média foi de  $43 \pm 14$  anos e variou de 17 a 81 anos.

Os indivíduos dispépticos sem câncer gástrico foram divididos em dois grupos: 77 indivíduos com histórico de câncer gástrico na família (PFC) e 40 indivíduos sem histórico de câncer gástrico na família (PNFC).

A idade dos PFC variou de 17 a 74 anos, com uma média de  $43 \pm 11$  anos. O gênero masculino correspondeu a (16/76) 20% dos indivíduos.

A idade dos PNFC variou de 17 a 81 anos, com uma média de  $43 \pm 18$  anos. O gênero masculino correspondeu a (13/40) 32% dos indivíduos. A distribuição dos grupos por faixa etária está representada na figura 5.

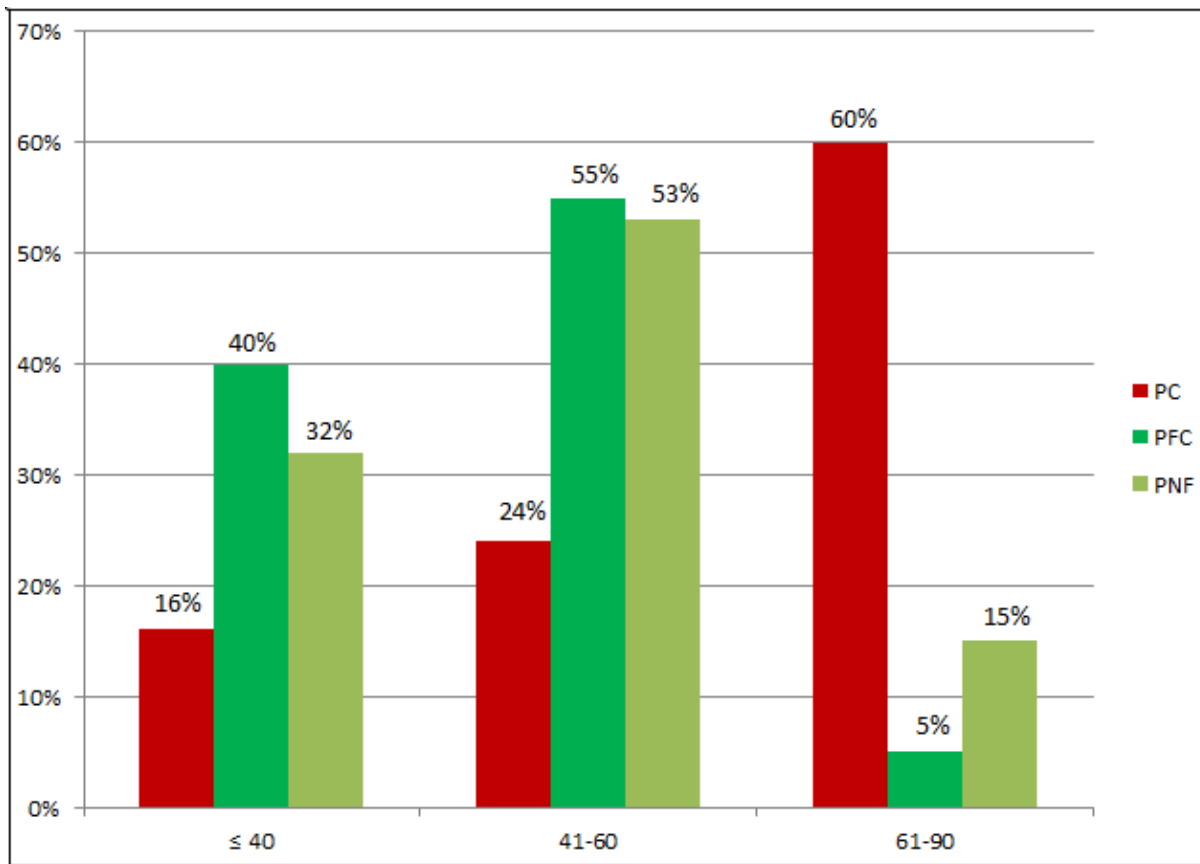


Figura 5: Distribuição dos grupos por faixa etária.

A maioria dos indivíduos portadores de câncer gástrico tem idade superior a 60 anos, com um percentual correspondente à (34/58) 60%. Já no grupo dos não portadores de câncer gástrico, a maioria dos indivíduos tem idade inferior a 60 anos, onde o percentual correspondente é de (73/76) 96% e de (35/40) 87% para os PFC e PNFC, respectivamente.

## 5.2. Análise da prevalência de anticorpos contra antígenos do *H.pylori* em pacientes com e sem câncer gástrico.

A imunorreatividade analisada nos grupos foi contra os antígenos do *H.pylori* de peso molecular: 120 (Cag A), 87 (Vac A), 66 (Ure B), 55-50 (complexo flagelar), 45-40, 33-30, 26-24 (Ure A) e 19,5 (moléculas externas de membrana).

Comparando os perfis imunológicos dos PC e PSC, se observou que existe diferença entre os mesmos como é mostrado na tabela 1.

**Tabela 1: Comparação da resposta humoral frente aos antígenos do *H.pylori* em pacientes com e sem câncer gástrico.**

Imunoreatividade(kDa)	Portadores de CA gástrico	Não portadores de CA gástrico	p valor
	absoluto/(%) (n=58)	absoluto/(%) (n=116)	
120	54/93	80/68	<0,0001
87	58/100	113/96	0,055
66	58/100	116/99	1
55-50	58/100	108/92	0,055
45-40	58/100	107/91	<0,0001
33-30	58/100	106/90	<0,0001
26-24	58/100	108/92	0,019
19,5	54/93	83/71	0,001

Temos em destaque os anticorpos presentes nos soros dos PC contra proteínas de peso molecular: 120 kDa, 45-40 kDa, 33-30 kDa e 19,5 kDa. Mostrando uma diferença estatisticamente significativa entre os PC e PSC em relação à imunorreatividade contra as mesmas.

Analisando o percentual da imunorreatividade contra as proteínas de peso molecular 87, 55-50 e 66 kDa, observamos que a prevalência é praticamente a mesma em ambos os grupos, o que resultou em um índice de significância maior que 0,05, ou seja, sem relevância estatística.

Quando a análise é feita estratificando a amostra de indivíduos dispépticos e não portadores de câncer em: PFC e PNFC, e comparamos a imunorreatividade contra os antígenos do *H.pylori*, obtemos os seguintes resultados apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Comparação da resposta humoral contra antígenos do *H.pylori* entre PC, PFC (Grupo 1) e PNFC (Grupo 2).

Imunoreatividade(kDa)	Portadores de CA gástrico	Grupo 1	Grupo 2	p valor 1	p valor 2
	absoluto/(%) (n=58)	absoluto/(%) (n=77)	absoluto/(%) (n=40)		
120	54/93	60/78	20/50	0,003	<0,0001
87	58/100	75/97	38/95	0,320	0,010
66	58/100	77/100	39/97	1	1
55-50	58/100	76/98	32/80	0,567	0,004
45-40	58/100	74/96	33/82	0,176	<0,0001
33-30	58/100	73/95	33/82	0,054	<0,0001
26-24	58/100	75/97	33/82	0,550	<0,0001
19,5	54/93	63/82	20/50	0,850	<0,0001

Diferenças são observadas nessa tabela, principalmente quando se compara PC com PNFC. Quase todas as bandas são diferenciadas nos PC em relação aos PNFC, com exceção da proteína 66 k Da. A imunoreatividade dos PC comparada com os PFC apresenta diferença estatística apenas com relação à proteína Cag A ( $p= 0,003$ ). A figura 6 mostra o percentual da prevalência da imunoreatividade contra antígenos do *H.pylori* entre os grupos.

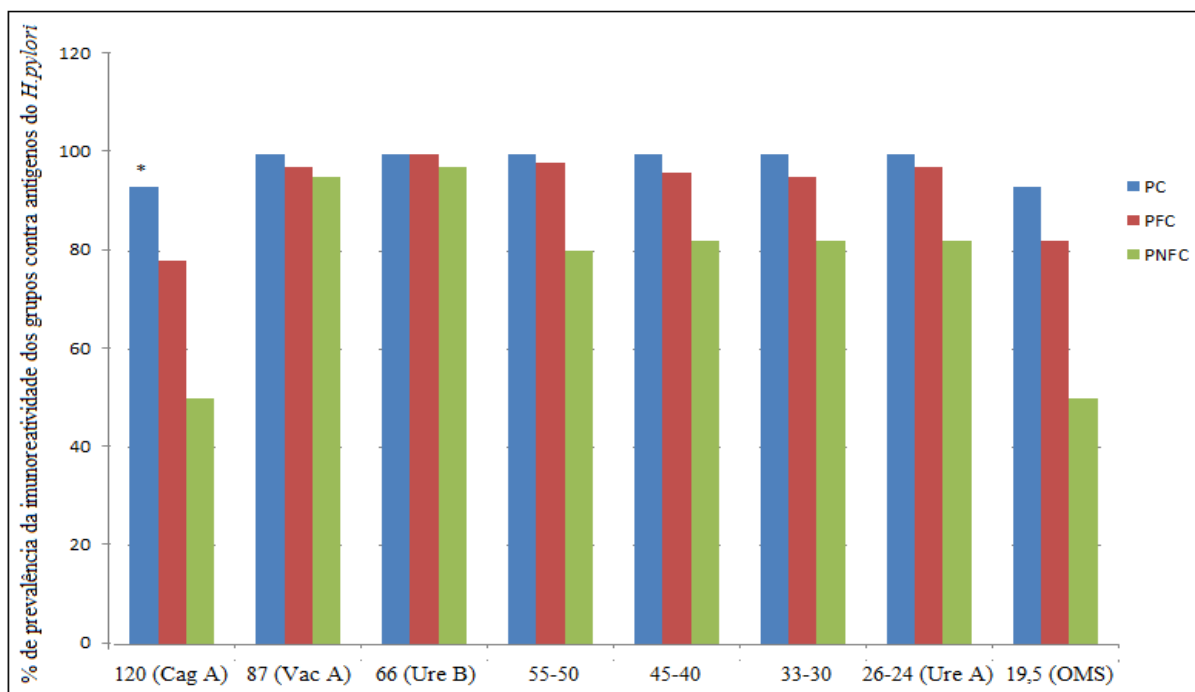


Figura 6: prevalência de anticorpos contra determinados antígenos do *H.pylori*. \* Nos PC a presença de anti-Cag A é estatisticamente significativa em relação a ambos os grupos (PFC e PNFC).

Quando avaliamos a diferença de imunorreatividade entre PFC e PNFC, observamos, praticamente, a mesma diferença encontrada quando comparamos a imunorreatividade entre PC e PNFC (Tabela 3).

**Tabela 3: Comparação da resposta humoral contra antígenos do *H.pylori* em pacientes com histórico familiar de câncer gástrico (Grupo 1) e pacientes sem histórico familiar de câncer gástrico (Grupo 2).**

Imunoreatividade(kDa)	Grupo 1	Grupo 2	p valor
	absoluto/(%) (n=76)	absoluto/(%) (n=40)	
120	60/78	20/50	0,010
87	75/97	38/95	0,047
66	77/100	39/97	1
55-50	76/98	32/80	0,007
45-40	74/96	33/82	<0,0001
33-30	73/95	33/82	<0,0001
26-24	75/97	33/82	<0,0001
19,5	63/82	20/50	<0,0001

Analisando a imunorreatividade dos grupos em fenótipos diferentes (tabela 4), podemos observar uma maior prevalência de anticorpos contra ambas as proteínas 19,5 e 30-33 k Da em todos os grupos. Tendo como destaque os PC que apresentam 93% de reatividade contra ambas as proteínas, os PFC apresentaram 74% de reatividade e os PNFC apenas 40%.

**Tabela 4: comparação dos diferentes perfis de imunorreatividade contra as proteínas 19,5 e 33 k Da com os grupos.**

Fenótipos	PC	PFC	PNFC
	absoluto/(%) (n=58)	absoluto/(%) (n=76)	absoluto/(%) (n=40)
19,5 (+)/30-33(+)	54/93 *	62/83 *	16/41
19,5 (+)/30-33(-)	0/0	0/0	02/05
19,5 (-)/30-33(+)	04/07	08/12	13/32
19,5 (-)/30-33(-)	0/0	04/05	09/22

\* a imunorreatividade contra as proteínas (19,5 e 33-30) foi estatisticamente significante nos PC e PFC em relação aos PNFC ( $p < 0,0001$ ). As significâncias permanecem mesmo quando as análises feitas levam em consideração o sexo e a idade dos grupos.

Analisando a imunorreatividade dos grupos em fenótipos diferentes (tabela 5), mas dessa vez foi avaliada a prevalência de anticorpos contra ambas as proteínas 19,5 e 120 k Da

em todos os grupos. Tendo como destaque os PC que apresentam 88% de reatividade contra ambas as proteínas, os PFC apresentaram 66% de reatividade e os PNFC apenas 25%.

**Tabela 5: comparação dos diferentes perfis de imunorreatividade contra as proteínas 19,5 e 120 k Da com os grupos.**

Fenótipos	PC	PFC	PNFC
	absoluto/(%) (n=58)	absoluto/(%) (n=76)	absoluto/(%) (n=40)
19,5 (+)/120 (+)	51/88 *	50/66 * *	10/25
19,5 (+)/120 (-)	03/05	11/13	08/20
19,5 (-)/120 (+)	03/05	08/10	10/25
19,5 (-)/120 (-)	01/02	07/09	12/30

\* a imunorreatividade contra ambas as proteínas 19,5 e 120 kDa foi significativa nos PC em relação aos PFC ( $p=0,003$ ) e aos PNFC ( $p<0,0001$ ). \*\* a diferença entre a imunorreatividade dos PFC e PNFC foi significativa ( $p<0,0001$ ). As significâncias permanecem mesmo quando as análises feitas levam em consideração o sexo e a idade dos grupos.

Analisando a imunorreatividade dos grupos em fenótipos diferentes (tabela 6), mas dessa vez foi avaliada a prevalência de anticorpos contra ambas as proteínas 120 e 87 k Da em todos os grupos. Tendo como destaque os PC que apresentam 93% de reatividade contra ambas as proteínas, os PFC apresentaram 73% de reatividade e os PNFC apenas 50%.

**Tabela 6: comparação dos diferentes perfis de imunorreatividade contra as proteínas 120 e 87 k Da com os**

Fenótipos	PC	PFC	PNFC
	absoluto/(%) (n=58)	absoluto/(%) (n=76)	absoluto/(%) (n=40)
120 (+)/ 87 (+)	54/93 *	57/73 * *	20/50
120 (+)/ 87 (-)	0/0	0/0	0/0
120 (-)/ 87 (+)	04/07	17/24	17/42
120 (-)/ 87 (-)	0/0	02/03	03/08

grupos

\* a imunorreatividade contra ambas as proteínas 120 e 87 k Da foi significativa nos PC em relação aos PFC ( $p=0,006$ ) e aos PNFC ( $p<0,0001$ ). \*\* a diferença entre a imunorreatividade dos PFC e PNFC foi significativa ( $p=0,014$ ).

### 5.3. Análise do número de bandas dos pacientes com e sem câncer gástrico.

Com relação ao número de bandas nos immunoblottings a média geral foi de  $9 \pm 3$  bandas, com o mínimo de 2 bandas e máximo de 14 bandas. Com relação aos PC a média foi

de  $10 \pm 2$  bandas, com o mínimo de 6 bandas e máximo de 14 bandas. Nos PSC a média foi de  $8,5 \pm 3$  bandas, com o mínimo de 2 bandas e máximo de 14 bandas. Os PFC tem média de  $9,5 \pm 3$  bandas, com o mínimo de 3 banda e máximo de 14 bandas, os PNFC tem média de  $6 \pm 2,5$  bandas, com o mínimo de 3 bandas e máximo de 12 bandas.

A diferença entre a média do número de bandas visualizadas no immunoblotting dos PC em relação aos PSC (tabela 7) é significativa ( $p= 0,012$ ).

**Tabela 7: Comparação da média do número de bandas entre pacientes com câncer gástrico e sem câncer gástrico.**

	Portadores de CA gástrico	Não portadores de CA gástrico	p valor
<b>Média do N° de bandas</b>	<b>10</b>	<b>8,5</b>	<b>0,012</b>

Quando essa análise se estende a uma comparação entre PC, PFC e PNFC (tabela 8), a diferença da média do número de bandas entre PC e PFC não é significativa ( $p=0,767$ ), já entre PC e PNFC a diferença é significativa ( $p < 0,0001$ ). Comparando a média do número de bandas entre PFC e PNFC se observou também uma diferença estatística significativa ( $p < 0,0001$ ).

**Tabela 8: Comparação da média do número de bandas entre PC, PFC (Grupo 1) e PNFC (Grupo 2).**

	Portadores de CA gástrico	Grupo 1	Grupo 2	p valor 1	p valor 2	p valor 1-2
<b>Média do N° de bandas</b>	<b>10</b>	<b>9,5</b>	<b>6</b>	<b>0,767</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>

## **5.6. Análise da prevalência de anticorpos contra Cag A por faixa etária e gênero.**

A distribuição por faixa etária nos PC mostra que a prevalência de cepas de *H.pylori* que expressam a proteína Cag A é maior com o aumento da idade (tabela 9). Onde os pacientes com idade  $\leq 40$  anos apresentam uma prevalência de 15%, enquanto pacientes com idade entre 41-60 anos apresentam 28% e pacientes com idade acima de 60 anos uma prevalência de 57%. No entanto, a análise estatística mostra que não existe diferença



significante entre as faixas etárias ( $p= 0,233$ ) com relação à prevalência de anticorpos contra a proteína Cag A.

**Tabela 9: Análise da prevalência de anticorpos contra Cag A por faixa etária nos PC.**

faixa etária	Imunoreatividade contra Cag A		PC total (n= 58) absoluto/(%)	p
	positiva (n= 54) absoluto/(%)	negativa (n= 4) absoluto/(%)		
≤ 40	8/15	0/0	8/14	0,233
41-60	15/28	0/0	15/26	
61-90	31/57	4/100	35/60	

Na tabela 10 é feita um cruzamento entre a prevalência de anticorpos contra Cag A e as faixas etárias nos pacientes não portadores de câncer gástrico. Dos 76 indivíduos imunorreativos contra a proteína Cag A, (73/76) 95% tem idade  $\leq 60$  anos. Contudo, essa diferença não teve relevância estatística ( $p= 0,360$ ).

**Tabela 10: Análise da prevalência de anticorpos contra Cag A por faixa etária nos PSC.**

faixa etária	Imunoreatividade contra Cag A		PSC total (n=116) absoluto/(%)	p
	positiva (n=76) absoluto/(%)	negativa (n= 40) absoluto/(%)		
≤ 40	31/41	15/37	46/40	0,360
41-60	41/54	20/50	61/52	
61-90	4/5	5/13	9/8	

Quando cruzamos a imunorreatividade contra a proteína Cag A e o gênero dos PC (tabela 11), se observou uma maior prevalência de indivíduos imunorreativos do sexo masculino (63%). No entanto, essa diferença não foi significativa estatisticamente ( $p= 0,54$ ).

**Tabela 11: Análise da prevalência de anticorpos contra Cag A por gênero nos PC.**

gênero	Imunoreatividade contra Cag A		PC	P
	positiva (n= 54) absoluto/(%)	negativa (n= 4) absoluto/(%)	total (n= 58) absoluto/(%)	
masculino	34/63	3/75	37/64	0,54
feminino	20/37	1/25	21/36	

Quando se compara imunorreatividade contra a proteína Cag A e gênero dos PSC (tabela 12), se observou uma maior prevalência de indivíduos imunorreativos do sexo feminino (69%). No entanto, essa diferença não foi significativa estatisticamente ( $p= 0,369$ ).

**Tabela 12: Análise da prevalência de anticorpos contra Cag A por gênero nos PSC.**

gênero	Imunoreatividade contra Cag A		PSC	P
	positiva (n=76) absoluto/(%)	negativa (n= 40) absoluto/(%)	total (n=116) absoluto/(%)	
masculino	23/31	11/27	34/30	0,369
feminino	53/69	29/73	82/70	

## 6. DISCUSSÃO

A análise da resposta humoral do soro dos pacientes infectados por *H. pylori* mostra indiretamente quais proteínas bacterianas estimularam o sistema imunológico do hospedeiro a produzir uma resposta imunológica. Os anticorpos presentes no soro (Ig G) dos indivíduos com e sem câncer gástrico que formam o complexo antígeno-anticorpo com as proteínas fixadas no papel de nitrocelulose podem indicar indiretamente algumas proteínas estruturais conhecidas (Ure A, Ure B, PCF, OMS) e desconhecidas da bactéria (100 kDa, 45-40kDa, 33-30kDa), ou exotoxinas produzidas pela mesma (Cag A, Vac A). A imunorreatividade é diretamente proporcional ao grau patogenicidade da bactéria (LEPPER, 2004). Portanto, a presença de várias bandas no immunoblotting indica que a bactéria apresenta vários fatores de virulência, o que pode representa ao indivíduo infectado por essa cepa um sério risco de lesões e/ou alterações das células epiteliais gástricas.

As bandas analisadas nesse estudo foram escolhidas por serem as mais relatadas nos artigos científicos (JANULAITYTE-GÜNTHER, 2007; YILMAZ, 2006; ROCHA, 2000; WANG, 1998), são elas: 120 (Cag A), 87 (Vac A), 66 (Ure B), 55-50, 45-40, 33-30, 26-24 (Ure A) e 19,5 (OMS) kDa. Algumas bandas apresentaram peso molecular oscilante, principalmente se tratando de um immunoblotting *in house* onde muitas variáveis podem interferir no resultado final do experimento, como: a não homogeneização dos antígenos, erros de pipetagem, reagentes contaminados, a trama formada pelo gel de poliacrilamida, desnaturação incompleta das proteínas, entre outros (LEPPER, 2004). Alguns autores mencionam a dificuldade da análise dos testes comerciais (helico blot 2.0) pela diferença de corrida de antígenos entre diferentes lotes do kit o que pode levar a diferentes conclusões sobre o peso molecular das bandas (ROCHA, 2000). Por isso, no nosso trabalho algumas bandas foram categorizadas: 55-50, 45-40, 33-30 e 26-24 k Da, com a finalidade de facilitar a análise das bandas no immunoblotting.

O perfil de imunorreatividade dos grupos analisados mostra que todos os indivíduos apresentam bandas características de infecção por *H.pylori*, segundo os critérios de Nilsson *et al.* (1997).

Na comparação entre o immunoblotting dos PC com os PSC, se encontrou diferenças na imunorreatividade contra quase todas as proteínas do *H.pylori*, com exceção das proteínas 87, 55-50 e 66 k Da. No entanto, quando comparamos o perfil de imunorreatividade dos três grupos se observou que os perfis dos PC e PFC são semelhantes entre si, e que ambos são diferenciados dos perfis de imunorreatividade dos PNFC, com exceção da banda 66 k Da (Ure B) que foi comum a todos os indivíduos infectados (CHOMVARIN, 2009).

Os atuais trabalhos comparam a imunorreatividade entre portadores de câncer e pacientes sem câncer gástrico e sem histórico familiar de câncer de estômago. Por esse motivo as referências mencionadas a seguir nessa discussão serviram como base para comparar apenas PC e PNFC, sendo os PFC um grupo diferenciado, ou seja, não são portadores de câncer gástrico, mas que tem o perfil de imunorreatividade semelhante aos PC.

Com relação à presença de anticorpos anti Cag A e anti Vac A nos PC, Mohammadi *et al.* (2013), relatam que a imunorreatividade contra as mesmas proteínas está relacionada com o adenocarcinoma gástrico. Esse resultado está de acordo com o nosso estudo, onde houve diferença estatisticamente significativa entre a prevalência de anticorpos contra as proteínas de peso molecular 120 (Cag A), 87 (Vac A) k Da entre PC e PNFC. Entretanto, Janulaityte *et al.* (2007), na Lituânia, estudando 115 indivíduos com câncer gástrico e 110 indivíduos sem câncer gástrico não encontraram diferença estatística com relação a imunorreatividade contra as proteínas Cag A e Vac A entre os grupos, mas encontraram com relação a proteína 30 (Ure A). Esse último resultado está de acordo com nosso estudo, que encontrou anticorpos contra a proteína de categoria: 33-30 k Da nos PC. Esse resultado é estatisticamente significativo frente os PNFC ( $p < 0,0001$ ).

Queiroz *et al.* (2004), no Brasil, analisaram através do helico blot 2.0 a imunorreatividade de 46 portadores de câncer gástrico e 118 não portadores de câncer gástrico e observaram diferença significativa com relação as bandas 116 kDa e 26 kDa. Tais bandas correspondem às bandas 120 k Da (Cag A) e 24-26 k Da (Ure A) do nosso estudo. No estudo realizado por O'Toole *et al.* (1991), no Canadá, observaram uma maior frequência da banda de peso molecular 26 k Da nos pacientes portadores de câncer gástrico do que nos não

portadores. Essas bandas também foram significantes no nosso trabalho quando comparamos PC com PNFC.

Chomvarin *et al.* (2009), na Tailândia, analisando a imunorreatividade de 22 pacientes com câncer de estômago e 67 pacientes sem câncer gástrico, observou que a presença de anticorpos contra ambas as proteínas de peso molecular 19,5 e 35 k Da está significativamente associado com os PC. No nosso estudo a banda correspondente a 35 é a banda 33 k Da. A presença de anticorpos contra ambas as proteínas foi também significativa nos PC em relação aos PNFC ( $p < 0,0001$ ). No entanto, a banda 33 kDa isoladamente não apresentou significância quando se leva em consideração o sexo e a idade. Esse resultado está de acordo com o encontrado por Mohammadi *et al.* (2013) que classificou a presença da banda 35 k Da como sendo protetora contra o câncer de estômago.

Analisando a imunorreatividade contra ambas as proteínas 120 e 19,5 k Da nos PC e PNFC, observamos uma diferença significativa nos PC ( $p < 0,0001$ ). Tal resultado já era esperado, pelo fato da imunorreatividade contra as proteínas 120 e 19,5 k Da, isoladamente, já apresentarem significância nos PC em relação aos PNFC.

Janulaityte *et al.* (2007), Mohammadi *et al.* (2013) e Correa *et al.* (2005), relataram que a imunorreatividade contra ambas as proteínas 120 (Cag A) e 87(Vac A) kDa é significativa nos PC em relação aos PNFC. No atual estudo, a presença de anticorpos contra ambas as proteínas também foi significativa ( $p < 0,0001$ ).

A comparação da média do número de bandas entre os grupos corrobora com os achados encontrados com relação à imunorreatividade nesse trabalho, a diferença da média do número de bandas é estatisticamente significativa nos PC em relação aos PNFC ( $p < 0,0001$ ). Essa comparação entre a média do número de bandas entre PC e PNFC não é relatada na literatura, não sendo possível uma comparação com outros trabalhos. Essa diferença entre número de bandas também é encontrada quando comparamos PFC e PNFC ( $p < 0,0001$ ).

Essa diferença na imunorreatividade também revela a presença de uma quantidade maior de fatores de virulência presentes nas cepas de *H.pylori* albergadas pelos PC e PFC do que nas cepas presentes nos PNFC. Tais fatores de virulência podem corresponder tanto a moléculas de adesão, como receptores de moléculas presentes na superfície de células epiteliais gástricas (Le<sup>b</sup>), como ainda moléculas de função desconhecida. Esses fatores seriam os responsáveis pelo sucesso da colonização e maior patogenicidade do *H.pylori* nos PC (MARKOVSKA, 2011).

Quando comparamos a imunorreatividade de PC e PFC, se observou que a principal diferença é a maior prevalência de anticorpos contra a proteína Cag A nos PC, essa diferença é significativa ( $p= 0,003$ ).

Quando a presença de anticorpos contra Cag A é comparada com relação aos gêneros e as faixas etárias, tanto nos PC como nos PFC não se observou diferença estatisticamente significativa em relação a nenhum dos gêneros ou das categorias de faixa etária.

Todas as comparações citadas acima entre a imunorreatividade dos PC em relação aos PNFC também pode ser atribuída aos PFC, ou seja, existe uma diferença entre o perfil de resposta humoral dos PFC em relação aos PNFC. Tal comparação não é relatada na literatura.

Nesse estudo, observamos que a resposta humoral dos PFC é mais semelhante aos PC do que os PNFC. Tal fato nos leva a sugerir duas hipóteses: Os PC e PFC albergam cepas semelhantes, mas com a diferença marcante da expressão da proteína Cag A na estirpe presente nos PC e/ou os PFC e PC apresentam uma alteração no perfil genético do sistema imunológico que acentua a resposta humoral desses indivíduos, provocando uma produção aumentada de anticorpos que, conseqüentemente, levará a um processo inflamatório mais intenso, aumentando assim as chances de alteração do DNA das células epiteliais gástricas desses indivíduos (CORREA, 2005).

As observações feitas nesse atual trabalho nos levam a novas perspectivas de pesquisa relacionadas com a genética dos indivíduos infectados com *H.pylori*. Averiguar se existe

algum polimorfismo genético nos pacientes portadores de câncer gástrico e familiares de câncer gástrico. Tal alteração seria responsável pela liberação de alguma Interleucina ou molécula capaz de modular a resposta imunológica e induzir os linfócitos da linhagem B a produzir mais anticorpos nesses indivíduos.

## 7. CONCLUSÃO

A análise da imunorreatividade (Ig G) através do immunoblotting *in house* mostrou que existe uma diferença na resposta humoral entre pacientes com câncer gástrico e pacientes sem câncer gástrico e sem histórico familiar de câncer de estômago.

A imunorreatividade contra as proteínas 19,5 e 120 k Da está significativamente associada com os pacientes portadores de câncer gástrico.

Os pacientes portadores de câncer gástrico e familiares de câncer gástrico apresentaram um perfil de imunorreatividade semelhante entre si com exceção da maior prevalência de anti Cag A nos portadores de câncer.

Não houve diferença estatística na imunorreatividade contra Cag A por faixa etária e gênero nos grupos estudados.



## 8. REFERÊNCIAS

ANNEMARIE C.; DE VRIES AND ERNST J. KUIPERS.: *Helicobacter pylori* infection and Nonmalignant Diseases. **Blackwell Publishing Ltd**, *Helicobacter* 15 (Suppl. 1): 29–33, 2010.

AKOPYANZ, N.S.; CLIFTON, S.W.; KERSULYTE, D.; CRABTREE, J.E.; YOUREE. B.E.; REECE C.A.; et al.: Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. **Mol Microbiol** 28: 37–53, 1998.

ATHERTON, J. C.; CAO, P.; PEEK, R. M.; TUMMURU, M. K. R.; 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.**, v. 270, p. 1771-1777, 1995.

BACKERT, S.; CHURIN, Y. AND MEYER T.F.: *Helicobacter pylori* type IV secretion, host cell signaling and vaccine development. **Keio J Med** 51 (Suppl. 2): 6–14, 2003.

BAMFORD, K.B.; FAN, X.; CROWE, S.E.; LEARY, J.F.; GOURLEY, W.K.; LUTHRA, G.K.; BROOKS, E.G.; GRAHAM, D.Y.; REYES, V.E.; ERNST, P.B.: Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. **Gastroenterology**; v.114: p.482-492, 1998.

BLECKER, U.; LANCIERS, S.; HAUSER, B.; VANDENPLAS, Y.: The prevalence of *Helicobacter pylori* positivity in a symptom-free population aged 1 to 40 years. **J Clin Epidemiol**; v.47: p.1095-8, 1994.

BRENNER, H.; BODE, G.; BOEING, H. *Helicobacter pylori* infection among offspring of patients with stomach cancer. **Gastroenterology**, v.118: p.31-35, Jan. 2000.

BUTI, L.; SPOONER, E.; VAN, A.G.; RAPPUOLI, R.; COVACCI, A.; PLOEGH, H.L.: *Helicobacter pylori* cytotoxic-associated gene A (Cag A) subverts the apoptosis-stimulating

protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A** **108**:9238–43, 2011.

CARDINALI, L. C. C. ; ROCHA, G. A. ; ROCHA, A. M. C. ; MOURA, S. B. ; SOARES, T. F. ; ESTEVES, A. M. B. ; NOGUEIRA, A. M. M. F. ; CABRAL, M. M. D. A. ; CARVALHO, A. S. T. ; BITTENCOURT, P. F. S. ; FERREIRA, A. R. ; QUEIROZ, D. M. M. .: Evaluation of [<sup>13</sup>C] urea breath test and Helicobacter pylori stool antigen test for diagnosis of H. pylori infection in children from a Developing Country. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 7, p: 3334-3335, 2003.

CARNEIRO, F.; TAVEIRA-GOMES, A. ; CABRAL-CORREA, A . *et al.* Characteristics of the gastric mucosa of direct relatives of patients with sporadic gastric carcinoma. **Eur. J. Cancer Prev.**, v.2: p.239-246, 1993.

CAVALCANTE, M.Q.F.: genótipos *cagA*, *vacA* e alelos de *H. pylori* em pacientes portadores de gastrite, ulcera e câncer gástrico. Fortaleza: UFC, 2010. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Programa de Pós-graduação em Cirurgia. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

CENSINI, S.; LANGE, C.; XIANG, Z.; CRABTREE, J.E.; GHIARA, P.; BORODOVSKY M.; et al.: *Cag*, pathogenicity island of *H. pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **93**: 14648–14653, 1996.

CHOMVARIN C.; OTTIWET O.; HAHNVAJANAWONG C.; INTAPAN P.M.; WONGWAJANA S.: Seroreactivity to specific antigens of Helicobacter pylori infection is associated with an increased risk of the dyspeptic gastrointestinal diseases. **International Journal of Infectious Diseases** 13, p: 647—654, 2009.

CHUNG, C.; et al.: Diversity of VacA intermediate region among *Helicobacter pylori* strains from several regions of the world. **J. Clin. Microbiol.** **48**:690–696, 2010.

CLAYTON, C.L.; PALLEN, M.J.; KLEANTHOUS, H., et al.: Nucleotide sequence of two genes from *Helicobacter pylori* encoding for urease subunits. **Nucl Acids Res**; v.18: p.362, 1990.

CORREA P.: New strategies for prevention of gastric cancer: *Helicobacter pylori* and genetic susceptibility. **J surg Oncol**. 2005 jun 1: 90(3):134-8; discussion 138.

CUTLER, A.F.; PRASAD, V.M.; SANTOGADE, P.: Four-year trends in *Helicobacter pylori* IgG serology following successful eradication. **Am J Med**. v.105: p: 18-20, 1998.

CZINN, S.: Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* in pediatric patients. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**; v.28: p: 132-134, 1999.

DANESH, J. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.13: p. 851-856, 1999.

EATON KA.; KRAKOWKA S.: Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. **Infect. Immun**. **62**: 3604–7, 1994.

EATON; K. A.; BROOKS; C. L.; MORGAN, D. R. AND KRAKOWKA, S.: Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. **Infect. Immun**. **59**: 2470–2475, 1991.

EVANS, D.J. JR; EVANS, D.J.; GRAHAM, D.Y.; KLEIN, P.D.: A sensitive and specific serological test for detection of *Campylobacter pylori*. **Gastroenterology**, v.96: p.1004-8, 1989.

FOSTER J. W.: When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. **Curr. Opin. Microbiol**. **2**, p: 170–174, 1999.

GARCÍA, A. J. P.; GISBERT, J. P.: Is the string test a useful alternative to gastroscopy with biopsy for *H. pylori* identification? **Rev Esp Enferm Dig**, Madrid, v.98, n° 7 p: 542-549, 2006.

GONÇALVES, M. H. R. B.: Genótipos das cepas de *H. pylori* vacA e alelos, cagA e sítios de fosforilação EPIYA em uma comunidade urbana de Fortaleza, utilizando método não endoscópico: Fortaleza: UFC, 2010. f.66. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Programa de Pós-graduação em Cirurgia. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

GONZÁLEZ, C.A. et al.: Helicobacter pylori infection assessed by ELISA and by Immunoblot and noncardia gastric cancer risk in a prospective study: the Eurgast-EPIC project. **Annals of Oncology Advance** Access published October 21, 2011.

HANDA O.; NAITO Y.; YOSHIKAWA T.: CagA protein of *Helicobacter pylori*: a hijacker of gastric epithelial cell signaling. **Biochem Pharmacol** **73**: 1697-1702, 2007.

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**; v.181: p.783-6, 2000.

HERBRINK, P.; VAN DOORN, L.J.: Serological methods for diagnosis of Helicobacter pylori infection and monitoring of eradication therapy. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**; v.19: p.164–173, 2000.

HIGASHI, H.; TSUTSUMI R.; FUJITA A.; YAMAZAKI S.; ASAKA M.; AZUMA T.; HATAKEYAMA M.: Biological activity of the Helicobacter pylori virulence factor Cag A is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **99**: 14428-14433, 2002.

HILDEBRAND, P.; BEGLINGER, C.: Nondispersive Infrared Spectrometry: A New Method

for the Detection of *Helicobacter pylori* Infection with the C 13 – Urea- Breath Test. **Clinical Infectious Diseases**; v.25: p.1003-1005, 1997.

HUYNH; K. K. AND GRINSTEIN, S.: Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** **71**: 452–462, 2007.

ILVER D.; ARNQVIST A.; OGREN J.; FRICK IM.; KERSULYTE D.; INCECIK ET.; et al.: *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. **Science** **279**: 373-377, 1998.

ISRAEL, D. A.; PEEK, R. M.: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* - induced gastric inflammation; **Aliment Pharmacol Ther**; v.15: p.1271-1290, 2001.

JANULAITYTE-GÜNTHER D.; KUPCINSKAS L.; PAVILONIS A.; VALUCKAS K.; WADSTRÖM T.; ANDERSEN LP.: Combined serum Ig G response to *Helicobacter pylori* Vac A and Cag A predicts gastric cancer. **FEMS Immunol Med Microbiol**; v (2):220-5, 2007.

JENNIFER M.; NOTO AND RICHARD M. PEEK JR.: The *Helicobacter pylori* *cag* Pathogenicity Island. **Published in final edited form as: Methods Mol Biol**; v (921): 41–50, 2012.

KHAMRI W.; MORAN AP.; WORKU ML.; et al.: Variations in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide to evade the innate immune component surfactant protein D. **Infect. Immun.** **73**: 7677–86, 2005.

KIM JM.; KIM JS.; JUNG HC.; SONG IS.; KIM CY.: Virulence factors of *Helicobacter pylori* in Korean isolates do not influence pro inflammatory cytokine gene expression and apoptosis in human gastric epithelial cells, nor do these factors influence the clinical outcome. **J. Gastroenterol** **35**: 898-906, 2000.

KOCH M.; MOLLENKOPF HJ.; KLEMM U.; MEYER TF.: Induction of microRNA-155 is TLR- and type IV secretion system-dependent in macrophages and inhibits DNA-damage induced apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A** **109**: E1153–62, 2012.

KONONOV, A.V.: Inflammation as a basis for *Helicobacter pylori*-associated diseases. **Arkh Patol**; v.68: p.3-10, 2006.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD R. H.: Protein blotting: a review. **Journal of Immunological Methods**. 274: p.01-15, 2003.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H.: Western blotting: Methods. **San Diego**. 38: p.283-293, 2006.

LAINE, L.; ESTRADA, R.; LEWIN, D.N.; COHEN, H.: The influence of warning on rapid urease test results: a prospective evaluation. **Gastrointest Endosc**; v.44: p.429, 1996.

LEAL, Y. A.; FLORES, L. L.; GARCÍA-CORTÉS, L. B.; CEDILLO-RIVERA, R.; TORRES J.: Antibody-Based Detection Tests for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Children: A Meta-Analysis. **Plos. one**; v. 3, 2008.

LEPPER, P.M.; MÖRICKE, A.; VOGT, K.; BODE, G. AND TRAUTMANN, M.: Comparison of Different Criteria for Interpretation of Immunoglobulin G Immunoblotting Results for Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, p: 569–576, 2004.

LETLEY, D. P.; J. L. RHEAD.; R. J. TWELLS.; B. DOVE AND J. C. ATHERTON.: Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **J. Biol. Chem.** **278**:26734–26741, 2003.

LISSOWSKA, J.; GROVES, F. D.; SOBIN, L. H. *et al.*: Family history and risk of stomach cancer in Warsaw, Poland. **Eur. J. Cancer Prev.**, v.8: p. 223-227, 1999. diated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells. **J. Biol. Chem.**, v. 276: p. 44856-44864, 2001.

VANNELLA, L.; EDITH LAHNER.; BRUNO ANNIBALE.: Risk for gastric neoplasias in patients with chronic atrophic gastritis: A critical reappraisal. **World J Gastroenterol**; v (12): 1279-1285, 2012.

MALFERTHEINER, P.; MÉGRAUD, F.; O'MORAIN, C. *et al.*: the European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht 2–2000 consensus report. **Aliment Pharmacol Ther**; v.16: p.167-80, 2002.

MANENTE, L.; *et al.*: The *Helicobacter pylori*'s protein Vac A has directs effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells. **J. Cell. Physiol.** **214**:582–587, 2008.

MARTINS, L. C.; CORVELO, T. C.; DEMACHKI, S.; ARAUJO, M. T.; ASSUMPÇÃO M. B.; VILAR, S. C.; FREITAS, F. B.; BARBOSA, H. P.; FECURY, A. A.; AMARAL, R. K.; DOS SANTOS, S. E. Clinical and pathological importance of *vacA* allele heterogeneity and *cagA* status in peptic ulcer disease in patients from North Brazil., **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.100, n. 8: p.875-881, dez. 2005.

MARKOVSKA, R.; BOYANOVA, L.; YORDANOV, D.; MITOV, G.G.I.: *Helicobacter pylori oipA* genetic diversity and its associations with both disease and *cagA*, *vacA s*, *m*, and *i* alleles among Bulgarian patients. **Diagnostic Microbiology and infectious** **71** (2011) 335-340.

MARCUS, E. A.; MOSHFEGH, A. P.; SACHS, G. AND SCOTT, D. R. The periplasmic alpha-carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. **J. Bacteriol.** **187**: 729–738, 2005.

MEYER, B.; WERTH, B.; BEGLINGER, C.; DILL, S.; DREWE J.; VISCHER, W. A.; R. H.; EGGERS, BAUER, F. E.; STALDER, G. A. *Helicobacter pylori* infection in healthy people: a dynamic process? **Gut**; v.32: p.347–350, 1991.

MONTECUCCO, C. AND RAPPUOLI, R.: Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol** 2: 457–466, 2001.

**Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**; v (11): 629–641, 2010.

MOHAMMADI M.; KARAMI N.; TALEBKHAN Y.; SABERI S.; ESMAEILI M.; OGHALAIE A.; ABDIRAD A.; MOSTAFAVI E.; HOSSEINI M.E.; MOHAGHEGHI M.A.: Seroreactivity to *Helicobacter pylori* Antigens as a Risk Indicator of Gastric Cancer. **Asian Pacific J Cancer Prev**, 14 (3), 1813-1817.

NEGRINI, R.; SAVIO, A.; APPELMELK B.J.: Autoantibodies to gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**; v.2: Suppl 1: p.S13-S16, 1997.

NILSSON, I.; LJUNGH A.; ALELJUNG P. AND WADSTRÖM T.: Immunoblot assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections. **J Clin Microbiol.** 1997 February; 35(2): 427–432.

OGAWA, H.; KATO, I.; TOMINAGA, S.: Family history of cancer among cancer patients. **Jpn. J. Cancer Res.**, v.76: p. 113-118, 1985.

OLIVEIRA, A. G.; SANTOS, A.; GUERRA, J. B.; ROCHA, G. A.; ROCHA, A. M.; OLIVEIRA, C. A.; CABRAL, M. M.; NOGUEIRA, A. M.; QUEIROZ, D. M. babA2- and cagA-positive *Helicobacter pylori* strains are associated with duodenal ulcer and gastric carcinoma in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 8: p. 3964-3966, Aug. 2003.

OLIVEIRA, F.J.A.: avaliação do perfil da resposta imune humoral a infecção pelo *H.pylori* em uma comunidade urbana de Fortaleza. Fortaleza: UFC, 2012. Dissertação (Mestrado em



Cirurgia) – Programa de Pós-graduação em Cirurgia. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

ORNELLAS, L.C.; CURY, M. DE S.; LIMA, V.M. DE; FERRARI, JR A.P. Avaliação do teste rápido da urease conservado em geladeira. **Arq Gastroenterol.** v.37: p.1555-157, 2000.

O'Toole, P.W., Logan, S.M., Kostrzynska, S.M., Wadström, T., Trust, T.J.: Isolation and biochemical and molecular analyses of a species specific protein antigen from the gastric pathogen. **Helicobacter pylori. J Bacteriol** 173: 505-513, 1991.

PANAYOTOPOULOU, E.G.; SGOURAS, D.N.; PAPADAKOS, K.; KALLIAROPOULOS, A.; PAPTAEODORIDIS, G.; MENTIS, A.F.; ARCHIMANDRITIS, A.J.: Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of Cag A protein in Helicobacter pylori clinical isolates. **J. Clin. Microbiol** 45: 488-495, 2007.

**PAOLUZI, O.A.; ROSSI, P.; MONTESANO, C.; BERNARDI, S.; CARNIERI, E.; MARCHIONE, O.P.; NARDI, F.; IACOPINI, F.; PICA, R.; PAOLUZI, P.:** Discrepancy between polymerase chain reaction assay and Western blot analysis in the assessment of CagA status in dyspeptic patients. **Helicobacter.** 2001 Jun;6(2):130-5.

PETERSON, W. L.; FENDRICK, A. M.; CAVE, D. R.; PENRA, D. A.; CARABEDIAN, R. S. M.; LAINE, L.: Doença relacionada ao Helicobacter pylori: Diretrizes para Diagnóstico e Tratamento. **JAMA Brasil.** 5, 1: 60-68, 2001.

PORTAL-CELHAY, C.; PEREZ-PEREZ, G.I.: Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. **Clin. Sci.**110: 305–14, 2006.

PORTORREAL, A.; KAWAKAMI, E. Avaliação do método imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes, **Arq Gastroenterol,** V. 39: p. 3, 2002.

QUEIROZ, D. M. M., MENDES, E. N., CARVALHO, A. S. T., ROCHA, G. A., OLIVEIRA, A.M. R., SOARES, T. F., SANTOS, A., CABRAL, M. M. D. A., NOGUEIRA, A. M. M. F. Factors associated with *Helicobacter pylori* infection by a *cagA*-positive strain in children. **J. Infect. Dis.**, v.181: p. 626-630, 2000.

QUEIROZ, D.M.M. ; ROCHA, A.M.C.; ROCHA, G.A.; LEITE, J.L.; LISBOA, R.L.L.; Silva, P.V.O.: Immunoblotting for the Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Brazilian Patients with and without Gastric Carcinoma. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 99(2): 189-193 March 2004.

RAD, R.; GERHARD, M.; LANG, R.; SCHONIGER, M.; ROSCH, T.; SCHEPP, W.; BECKER, I.; WAGNER, H.; PRINZ, C.: The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. **J Immunol**, v.168: p. 3033-3041, 2002.

RAFFAELE ZARRILLI; VITTORIO RICCI AND MARCO ROMANO.: Molecular response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*-induced cell damage. **Cellular Microbiology**, v (2), 93-99, 1999.

RAMELAH, M.; AMINUDDIN, A.; ALFIZAH, H.; ISA, M.R.; JASMI, A.Y. *et al.* *cagA* gene variants in Malaysian *Helicobacter pylori* strains isolated from patients of different ethnic groups. **FEMS. Immunol Med Microbiol**, v. 44: p. 239–242, 2005.

RIBEIRO, ML.; VITIELLO, L.; MIRANDA, MC.; BENVENGO, YH.; GODOY, AP.; MENDONCA, S.; PEDRAZZOLI JR.; J.: Mutations in the 23S rRNA gene are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Brazil. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, 2003.

RICCI, V.; SOMMI, P.; FIOCCA, R.; ROMANO, M.; SOLCIA, E.; VENTURA, U. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin accumulates within the endosomal-vacuolar

compartment of cultured gastric cells and potentiates the vacuolating activity of ammonia. **J. Pathol** **183**: 453-459, 1997.

ROCHA, A.F.G. *Helicobacter pylori* – Diagnóstico pelo teste Respiratório. **A C. Gastroenterol**, p.12: v. 4-13, 1996.

ROCHA, G.A.; OLIVEIRA, A.M.R.; QUEIROZ, M.M.D.; CARVALHO, A.S.T. AND NOGUEIRA, A.M.M.R.: Immunoblot Analysis of Humoral Immune Response to *Helicobacter pylori* in children with and without Duodenal Ulcer. **J Clin Microbiol**. 2000 May; 38(5): 1777-1781.

ROMANO, M.; RICCI, V.; ZARRILLI, R. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis implications for chemoprevention. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol** **3**: 622-632, 2006.

SHEU, B.; YANG, H.; YEH, Y. AND WU, J.: *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric epithelium: A bug's first step is a novel target for us. **Journal of Gastroenterology and Hepatology** **25**: 26–32, 2010.

SHIMOYAMA, T.; CRABTREE, J.E.: Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. **GUT**; v.43: p.S2-5S, 1998.

SILVA, J. M. K.; VILLARES, C. A.; MONTEIRO, M. S.; COLAÚTO, C.; SANTOS, A. F.; MATTAR R. Validação de teste rápido de antígeno fecal para diagnóstico de infecção por *Helicobacter pylori*, **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** v.52: n.3, São Paulo, 2010.

SILVA, C. I. S. M.: Genótipos *cagA*, *vacA* e alelos e sítios de fosforilação de tirosina da proteína Cag A do *H. pylori* em pacientes com e sem histórico de câncer gástrico. Fortaleza: UFC, 2009. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Programa de Pós-graduação em Cirurgia. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

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 IFN-gamma, gene-deficient mice. **J Immunol**; v.165: p.1022-9, 2000.

STYER, C.M.; HANSEN, L.M.; COOKE, C.L.; GUNDERSEN, A.M.;CHOI, S.S.; BERG, D.E.; et al.: Expression of the Bab A adhesin during experimental infection with *Helicobacter pylori*. **Infect Immun** **78**: 1593-1600, 2010.

SUERBAUM, S.; JOSEPHANS, C.; LABIGNE, A.: Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flaB* flagellin genes and construction of *H. pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange.

TELFORD, J.L.; GHIARA, P.; DELL'ORCO, M.; et al.: Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. **J Exp Med** **179**: 1653-1658, 1994.

TOMB, J.F.; WHITE, O.; KERLAVAGE, A.R.; CLAYTON, R.A.; SUTTON, G.G.; FLEISCHMANN, R.D.; et al.: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature** **388**: 539-547, 1997.

TONELLI, E.; FREIRE, L.M.S.; Doenças Infecciosas na Infância e Adolescência. São Paulo: **Meds**; p.656-657, 2000.

TORRES, J.; LEAL, H. Y.; PEREZ, P.G.; GOMEZ, A.; CAMORINGA,P.M.; CEDILLO,R.R.: A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. **J Infect Dis**; 178:1089-94 1998.

TRICOTTET, V.; BRUNEVALL, P.; VIRE, O.; et al.: Campylobacter-like organisms and surface epithelium abnormalities in active, chronic gastritis in humans: an ultrastructural study. **Ultrastructure Pathol** **10**: 113-122, 1986.

VALENTINE, J.; ARTHUR, R.; MOBLEY, H.; DICK, J.: Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**; v. 29: p. 689-695, 1991.

WANG, J.; BROOKS, E.G.; BAMFORD, K.B.; DENNING, T.L.; PAPPO, J.; ERNST, P.B. Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion. **J Immunol**; v.167: p.926-34, 2001.

WANG, J.T., CHANG, C.S., LEE, C.Z., YANG, J.C., LIN, J.T., WANG, T.H.: Antibody to a *Helicobacter pylori* species specific antigen in patients with adenocarcinoma of the stomach. **Bioch Bioph Res Commun** 244: 360-363, 1998.

WEEKS; D. L.; ESKANDARI S.; SCOTT. D. R. AND SACHS, G.: A H1-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. **Science** 287: 482–485, 2000.

WU, J.J.; SHEU B.S.; HUANG A.H.; LIN ST.; YANG H.B.: Characterization of *flgK* gene and Flg K protein required for *H. pylori* colonization from cloning to clinical relevance. **World J. Gastroenterol** 12: 3989–93, 2006.

YAMAOKA, Y.; OSATO MS.; SEPULVEDA AR.; GUTIERREZ O.;KIM JG.; KODAMA T.; KASHIMA K.; GRAHAM DY.: Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori*: separation of *H. pylori* from East Asian and non-Asian countries. **Epidemiol Infect** 124: 91-96, 2000.

YANG, H.B.; YEH, Y.C.; CHANG, W.L.; CHENG, H.C.; WU, J.J.; SHEU BS.: *H. pylori* cag L amino acid sequence polymorphism y58e59 induces a corpus shift of gastric integrin  $\alpha 5\beta 1$  related with gastric carcinogenesis. **Mol Carcinogen** 50:751–9, 2011.

YILMAZ, O.; SEN, N.; KÜPELIOĞLU, A.A.; SIMŞEK, I.: Detection of *H. pylori* infection by ELISA and Western blot techniques and evaluation of anti CagA seropositivity in adult Turkish dyspeptic patients. **World J. Gastroenterol.** 2006 Sep 7: 12(33):5375-8.

YAMAOKA, Y.: Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Jul 16, 2011.

ZANGHIERI, G.; DI GREGORIO, C.; SACCHETTI, C. *et al.*: Familial occurrence of gastric cancer in the 2-year experience of a population-based registry. *Cancer*, v.66: p. 2047-2051, Nov.1990.

ZHANG, Q. B.; NAKASHABENDI, I. M.; MOKHASHI, M. S.; DAWODU, J. B.; GEMMELL, C. G. AND RUSSELL, R. I.: Association of cytotoxic production and neutrophil activation by strains of *Helicobacter pylori* isolated from patients with peptic ulceration and chronic gastritis. *Gut* **38**: 841-845, 1996.

ZHOU, J.; XIE, Y.; ZHAO, Y.; WANG, S.; LI, Y.: Human gastrin mRNA expression up-regulated by *Helicobacter pylori* Cag A through MEK/ERK and JAK2-signaling pathways in gastric cancer cells. *Gastric Cancer* **14**: 322–31, 2011.

