



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

ELIANE DOS SANTOS PEREIRA

***Helicobacter pylori* - importância dos genes da ilha e de adesão no câncer
gástrico (Intestinal e Difuso) e em estudos de risco**

FORTALEZA-CE

2015

ELIANE DOS SANTOS PEREIRA

***Helicobacter pylori* - importância dos genes da ilha e de adesão no câncer gástrico (Intestinal e Difuso) e em estudos de risco**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Microbiologia Médica

Orientadora: Professora Dr^a. Sílvia Helena Barem Rabenhorst

FORTALEZA-CE

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

P49h Pereira, Eliane dos Santos.
 Helicobacter pylori: importância dos genes da ilha e de adesão no câncer gástrico (Intestinal e Difuso) e em estudos de risco/ Eliane dos Santos Pereira. – 2015.
 107 f. : il.

 Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2015.
 Orientação: Profa. Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst

1. Neoplasias Gástricas. 2. *Helicobacter pylori*. 3. Polimorfismo Genético. 4. Genótipo. I.
Título.

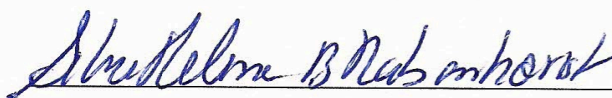
CDD 616.99432

ELIANE DOS SANTOS PEREIRA

***Helicobacter pylori* - importância dos genes da ilha e de adesão no câncer gástrico (Intestinal e Difuso) e em estudos de risco**

Aprovada em: 28/ 08/ 2015.

Banca Examinadora



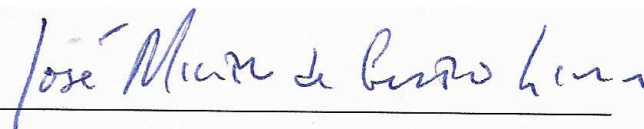
Profa Dra Silvia Helena Barem Rabenhorst (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC



Profa Dra Márcia Valéria Pitombeira Ferreir
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. João Paulo Pordeus Gomes
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. José Milton de Castro Lima
Universidade Federal do Ceará -UFC



Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro
Universidade São Francisco – UNIFAG

Dedico este trabalho

Aos meus pais , que me mostraram a existência do amor incondicional e das verdadeiras emoções, por me mostrarem o que realmente importa, por me estimularem no crescimento profissional, pessoal, apoiando-me sempre.

Aos meus irmãos pelo apoio incondicional pelo incentivo e compreensão.

Ao Caubi, companheiro inseparável, por me apoiar, entender minhas necessidades e prioridades, e permanecer ao meu lado;

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que plantou em mim um sonho que hoje se materializa;

Aos meus pais que foram o instrumento para concretizar o precioso dom que recebi do universo: “a vida” e por compreender minhas ausências e omissões;

Ao meu amado namorado Caubi, pelo carinho, dedicação, incentivo e ajuda direta nesse trabalho com as coletas do grupo controle . Enfim um agradecimento sincero que não cabe palavras;

A professora Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst, pela confiança , paciência e principalmente por ter sido companheira na orientação desta tese, na realização dos trabalhos apresentados a partir dela;

Aos participantes da banca, pela presteza em aceitar o convite, pela cuidadosa leitura e pelas valiosas contribuições;

A secretária do Programa de Microbiologia , Carol pelo apoio dado desde primeiro momento que a conheci ;

Ao programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica representado pelos professores e demais funcionários pelo empenho na formação científica dos pós graduandos;

A CAPES pelo suporte financeiro;

Aos pacientes incluídos nesse estudo e seus familiares;

Ao Hospital Universitário Walter Cantídeo, à Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza e Sobral, Hospital Geral Cesar Cals e HEMOCE por nos permitir o acesso para a execução desse estudo;

Ao Professor Dr. Rommel por ter cedido as amostras dos pacientes do estado do Pará incluídos nesse estudo;

A doutoranda Débora M.C., por sua amizade, ensinamentos, pela ajuda com o Excel e nas imensas análises dessa tese.

A Doutoranda Emanuele Oliveira, por sua amizade, por todas as caronas, conversas e reflexões sobre a vida;

A aluna de iniciação científica, Aline pela ajuda na formatação da tese, pelo carinho e amizade;

A Doutoranda Ana Paula Santos do Carmo, por sua amizade, por todas as caronas, e dedicação à pesquisa.

A Dra. Isabelle J.L. Silva Fernandes, por seu bom-humor e dedicação à pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular – LABGEM, Paulo , Anderson, Isaac, Maira, Morgana, Helder, Fabiane, Icaelle pelo apoio e pela convivência sempre agradável;

Finalmente, a todos que fizeram parte desta longa e salutar jornada, os meus mais sinceros agradecimentos, que Deus em sua infinita misericórdia derrame suas bênçãos, como raios de luz sobre todos. Muito obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

O câncer gástrico (CG) é a terceira causa de morte por câncer no mundo. A etiologia do CG é multifatorial sendo bem estabelecida a associação com a infecção por *Helicobacter pylori*. A susceptibilidade genética ao CG é postulado pela exposição de uma grande proporção da população a fatores de risco, mas somente um grupo desenvolve essa neoplasia. Por outro lado, o caráter patogênico de *H. pylori* é dado pela presença da ilha de patogenicidade *cagPAI* (*cytotoxin associated gene pathogenicity island - cagPAI*) bem como a variação alélica *vacA s1m1*. Pelo lado do hospedeiro, polimorfismos genéticos têm sido relacionados com o risco de CG, indicando que estas alterações são marcadores potenciais de susceptibilidade genética nestes tumores, entretanto, poucos SNPs de enzimas de reparo são estudadas. No contexto da carcinogênese gástrica, há ainda que se considerar as diferenças com respeito a histopatologia, idade e gênero. Assim o objetivo deste trabalho é verificar a associação dos SNPs em genes de reparo do DNA, *APE1* 2197(T>G) e *MLH1* -93(G>A), adicionadas aos SNPs de *CDH1* -160 (C>A) e -347 (G>GA) por ser uma proteína associada ao câncer difuso hereditário, com a susceptibilidade genética. Os subtipos histológicos, idade e sexo foram dados importantes considerados para as análises. O genótipo de *H. pylori*, foi determinado pela presença dos genes *cagA*, *cagE*, *cagG*, *cagT*, *virB11*, *vacA*, *oipA* e *hopQII* sendo os genótipos de *H. pylori* considerado no estudo de risco e individualizada no último estudo. Para isso, foram incluídos 285 pacientes com câncer gástrico e 391 controles saudáveis pareados por idade e sexo (1:1ou 1:2) de duas regiões diferentes do Brasil: Ceará e Pará. Positividade para *H. pylori* em 87,71% dos casos. Foi observado no estudo de risco uma proteção para os tumores intestinais foi associado ao alelo G de *APE1* (T>G) em mulheres com <55 anos e o alelo GA de *CDH1* -347 (G>GA) para homens com ≥ 55 anos de idade. Nos tumores difusos, o grupo com < 55 anos, o alelo A de *MLH1* -93 (G>A) foi associado à proteção e o alelo G de *APE1* (T>G) foi associado com o risco em homens neste grupo de idade. O alelo G de *APE1* (T>G) também foi associado à ausência de metástase a distância e o alelo A de *MLH1* (G>A) com ausência de metástase em linfonodos regionais. No subtipo intestinal, pacientes portadores do alelo G de *APE1*(T>G) foram significativamente infectados por cepas menos virulentas. No estudo com as cepas de *H. pylori* a maioria dos casos possuiu a ilha completa independente do subtipo histológico. Os genes *cagA* e *cagE* estavam presentes na maioria das cepas. Segundo as análises através do método da árvore de classificação, alguns genes como *cagG* e *cagE* (em cepas *vacAs1*) se mostraram fundamentais na separação dos subtipos histológicos de CG. A presença dos genes *cagG* e *cagE* concomitantemente, ou ausência de *cagG* in *H. pylori* parece classificar o tumor em intestinal. Enquanto que a presença do gene *cagG* associado a ausência de *cagE* classifica os tumores em difusos. O genótipo *cagM* (+) *cagG* (+) com a presença do gene *cagE* classifica o tumor em intestinal, já na ausência de *cagE*, classifica os tumores em difusos. Em relação aos genes de adesão houve uma maior frequência do gene *oipA*, seguido de *hopQI* e *hopQII*. Em resumo, estes dados indicam que o genótipo de *H. pylori*, subtipo histológico, idade e gênero são importantes fatores a serem considerados em análises com polimorfismos. E apesar da complexidade de explicar quais são os fatores que contribuem para a separação das cepas nos subtipos intestinal e difuso, é notório que existem vias diferentes associadas a essas cepas. E que estes genes podem ser potenciais marcadores de diferentes subtipos histológicos.

Palavras chave: Neoplasias Gástricas. *Helicobacter pylori*. Polimorfismo Genético. Genótipo.

ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is the third cause of cancer death worldwide. The etiology of gastric cancer is multifactorial and it is being well established an association with infection by *Helicobacter pylori*. The genetic susceptibility to GC is postulated by exposure of a large proportion of the population to risk factors, but only part of this people develops the neoplasia. Furthermore, the *H. pylori* pathogenic character is given by the presence of cag-PAI pathogenicity island (cytotoxin associated gene pathogenicity island - cagPAI) as well as allelic variation *vacA s1m1*. About the host, genetic polymorphisms have been associated with the risk of GC, indicating these changes are potential genetic susceptibility markers in these tumors, however, few repair enzymes SNPs are studied. In the context of gastric carcinogenesis, it is necessary to consider the differences about histopathology, age and gender. So, the aim of this study is to investigate the association of SNPs in DNA repair genes, *APE1* 2197 (T>G) and *MLH1* -93 (G>A), added to *CDH1* -160 (C>A) and -347 (G>GA) SNPs. The *CDH1* protein is associated with hereditary diffuse cancer and genetic susceptibility. The histological subtypes, age and sex were important data considered to the analyses. *H. pylori* genotype was determined by the presence of genes. *cagA*, *cagE*, *cagG*, *cagT*, *virB11*, *vacA*, *oipA* and *hopQII*. The *H. pylori* genotypes considered at risk study and individualized in the latest study. For this, it were included 285 patients with gastric cancer and 391 healthy controls matched for age and sex (1: 1 or 1: 2) from two different regions in Brazil: Ceará and Pará. The positivity for *H. pylori* was observed in 87.71% of cases. In a risk study was observed a protection for intestinal tumors and it was associated with the G allele of *APE1* (T>G) in women <55 years and GA allele *CDH1* -347 (G>GA) for men aged ≥ 55 years. In diffuse tumors, the group aged <55, the A allele of *MLH1* -93 (G>A) was associated with protection and the G allele of *APE1* (T>G) was associated with risk in men in this age group. The G allele of *APE1* (T>G) was also associated with the absence of distant metastases and the A allele of *MLH1* (G>A) with absence of lymph nodes commitment. In the intestinal subtype, carriers patients G allele of *APE1* (T>G) were infected with significantly less virulent strains. In the study with *H. pylori* strains, most cases had the full island regardless of histologic subtype. The *cagA* and *cagE* genes were present in most strains. According to the classification tree method analysis, some genes as *cagG* and *cagE* (in *vacAs1* strains) proved fundamental in the separation of GC histological subtypes. The presence of *cagG* and *cagE* genes concomitantly or absence of *cagG* in *H. pylori* looks like classifies the intestinal tumor. While the presence of the *cagG* gene associated with the *cagE* absence classifies the diffuse tumors. The *cagM* (+) *cagG* (+) genotype with the presence of the *cagE* gene classifies the intestinal tumor, since in the absence of *cagE* the tumors are classified by diffuse type. Regarding adhesion genes, there was a greater frequency of *oipA* gene, followed by *hopQI* and *hopQII*. In summary, these data indicate that *H. pylori* genotype, histological subtype tumors, age and gender are important factors to be considered in polymorphisms analyzes. Despite the complexity to explain what are the factors that contribute to the separation of strains in intestinal and diffuse subtypes, it is clear that there are different pathways associated with these strains. And these genes may be potential markers of different histological subtypes.

Keywords: Stomach Neoplasms. *Helicobacter pylori*. Genetic Polymorphism. Genotype.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 CÂNCER GÁSTRICO | 11 |
| 1.1.1 Epidemiologia do Câncer Gástrico | 11 |
| 1.1.2 Características Histopatológicas | 13 |
| 1.1.3 Etiologia do Câncer Gástrico | 15 |
| 1.2 <i>HELICOBACTER PYLORI</i> | 16 |
| 1.2.1 Epidemiologia | 17 |
| 1.2.2 Características Microbiológicas | 20 |
| 1.2.2.1 Classificação taxonômica | 20 |
| 1.2.2.2 Estrutura e nutrição | 20 |
| 1.2.2.3 Transmissão | 21 |
| 1.2.2.4 Diversidade genética | 22 |
| 1.2.2.5 Variação Geográfica | 23 |
| 1.2.2.6 Fatores de virulência e patogênese da infecção por <i>H. pylori</i> | 25 |
| REFERÊNCIAS | 26 |
| ARTIGO 1 - PUBLICADO EM WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY .. | 33 |
| 1.3. PERGUNTAS DE PARTIDA | 57 |
| 1.4. HIPÓTESES | 57 |
| 2. OBJETIVOS | 57 |
| 2.1 GERAL | 57 |
| 2.2 ESPECÍFICOS | 57 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 58 |
| 3.1 CASUÍSTICA | 58 |
| 3.2 ASPECTOS ÉTICOS | 58 |
| 3.3 COLETA DE DADOS | 59 |
| 3.4 EXTRAÇÃO DO DNA | 59 |
| 3.5 GENOTIPAGEM DE <i>H. PYLORI</i> | 60 |
| 3.5.1 Presença e subtipos do gene <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> | 60 |
| 3.5.2 Detecção do gene <i>cagA</i> | 61 |
| 3.5.3 Detecção do gene <i>cagE</i> | 61 |
| 3.5.4 Detecção do gene <i>virB11</i> | 61 |
| 3.5.5 Detecção do gene <i>cagG</i> , <i>cagT</i> , <i>cagM</i> e <i>oipA</i> | 61 |
| 3.5.6 Detecção do gene <i>hopQI</i> e <i>hopQII</i> | 62 |
| 3.6 DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO HOSPEDEIRO | 62 |
| 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 64 |
| 4. RESULTADOS | 65 |
| ARTIGO 2 | 66 |
| ARTIGO 3 | 84 |
| APÊNDICES | 97 |
| APÊNDICE A - PROTOCOLO DE COLETA NO CENTRO CIRÚRGICO | 98 |
| APÊNDICE B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA | 99 |

| | |
|---|------------|
| APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO | 101 |
| APÊNDICE D – CADASTRO DE PACIENTES SUBMETIDOS À COLETA DE TECIDO DE PEÇA CIRÚRGICA | 102 |
| ANEXOS – PUBLICAÇÕES ORIGINADA A PARTIR DO TRABALHO | 104 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Gástrico

1.1.1 Epidemiologia do Câncer Gástrico

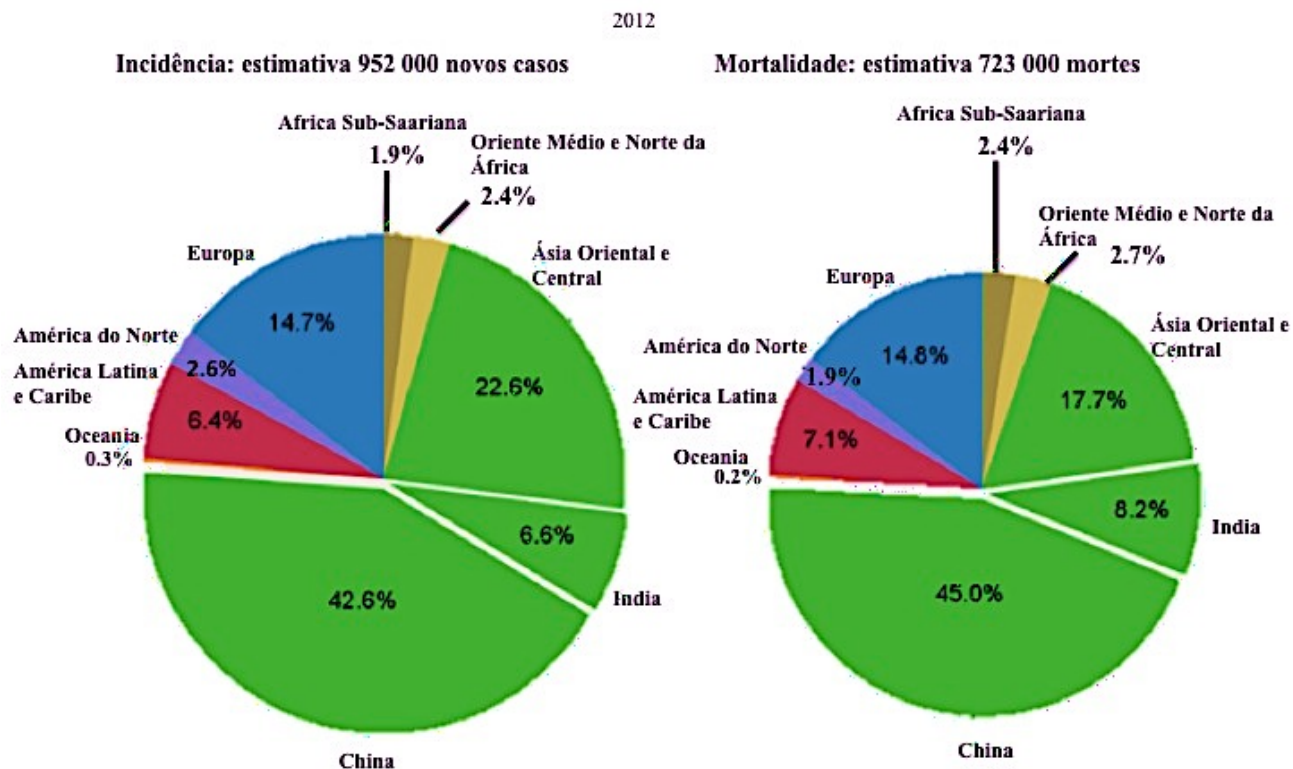
O câncer gástrico se configura como o quinto câncer mais frequente, depois dos cânceres de pulmão, mama, próstata e cólon, e a terceira causa de morte por câncer. A incidência de câncer gástrico varia de acordo com as diversas regiões do mundo, e no geral, é de duas a três vezes mais frequente nos países em desenvolvimento, além de ser mais comum em indivíduos do sexo masculino (FERLAY et al., 2015).

As estimativas mais recentes da GLOBOCAN 2012 indicam que cerca de 1 milhão novos casos de câncer gástrico e 700 mil mortes ocorreram em todo o mundo em 2012, representando 7% do total de novos casos de câncer e 9% das mortes totais de câncer. A Ásia contribuiu com cerca de 74% dos casos, sendo a China a detentora de quase metade dos casos mundiais (figura 1) (IARC-2014).

No Brasil, esses tumores aparecem em terceiro lugar na incidência entre homens e em quinto, entre as mulheres. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos novos de câncer de estômago no ano de 2014 foi de 20.390, sendo 12.870 homens e 7.520 mulheres (INCA, 2014). Esses valores correspondem a um risco estimado de 13,19 casos novos a cada 100 mil homens e 7,41 a cada 100 mil mulheres, (figura 2). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de estômago em homens é o segundo mais frequente nas regiões Norte (11,10/ 100 mil) e Nordeste (10,25/ 100 mil). Nas regiões Sul (16,07/ 100 mil) e Centro-Oeste (10,88/ 100 mil), é o quarto. Já na região Sudeste (14,99/ 100 mil), ocupa a quinta posição. Para as mulheres, é o terceiro mais frequente na região Norte (5,91/ 100 mil). Nas regiões Sudeste (8,20/ 100 mil) e Nordeste (6,39/ 100 mil), ocupa a quinta posição. Nas regiões Sul (8,43/ 100 mil) e Centro-Oeste (6,32/ 100 mil), ocupando a sexta posição (INCA, 2014).

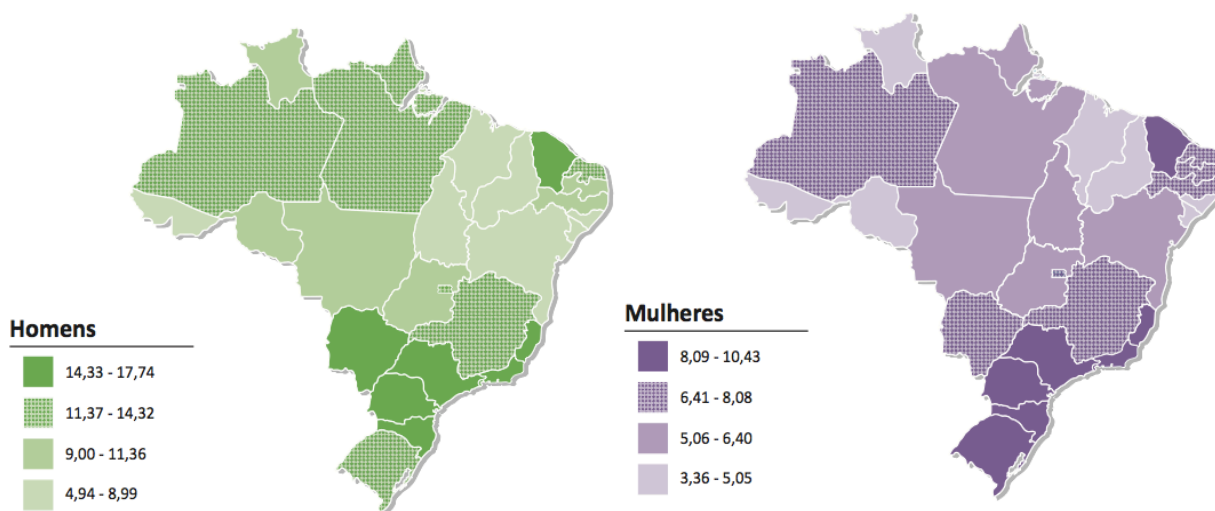
Apesar dos dados estatísticos revelarem um declínio da incidência do câncer gástrico nas últimas décadas, nos países desenvolvidos esta doença continua representando um grave problema de saúde pública (RESENDE et al., 2011).

Figura 1. Número estimado de novos casos de câncer gástrico e mortes em 2012, com proporções por grandes regiões do mundo, para ambos os sexos combinados.



Fonte: IARC 2014

Figura 2. Taxas brutas de incidência de câncer gástrico por 100.000 homens (a) ou mulheres (b) estimadas para o ano 2014 no Brasil.

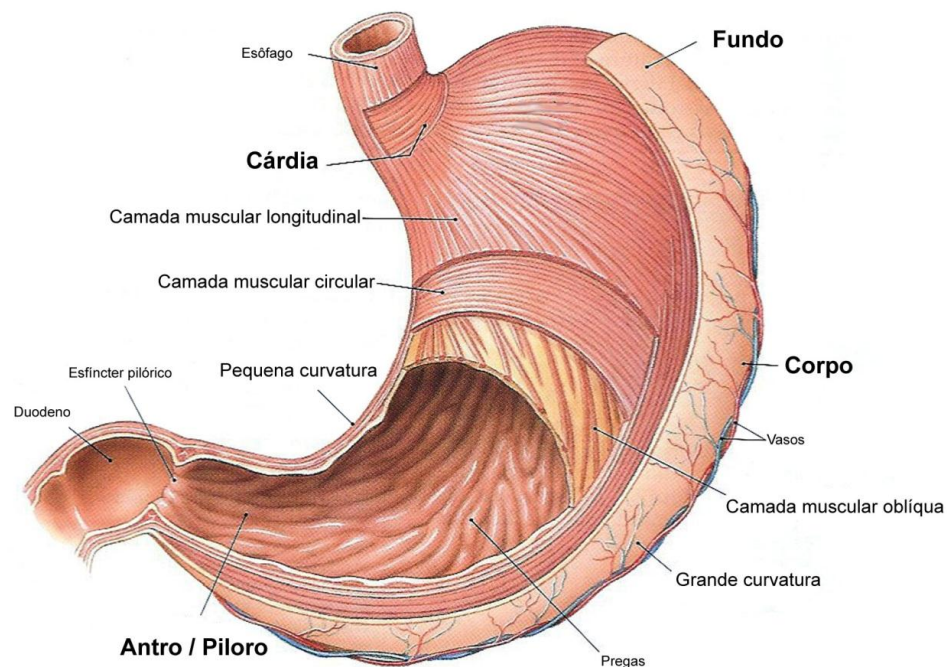


Fonte: INCA – Instituto Nacional do Câncer (2014).

1.1.2 Características Histopatológicas

Os tumores gástricos podem se localizar na região proximal do estômago, que corresponde à cárdia (junção gastro-esofágica) e o fundo gástrico, bem como pode ser observado na região distal, que engloba o antro gástrico e o piloro (Figura 3). A localização do tumor sugere que os cânceres de diferentes regiões gástricas apresentam-se como doenças distintas, inclusive com etiologias diferentes. Estes tumores diferem, ainda, quanto à incidência e o prognóstico, no qual os tumores proximais apresentam um aumento da incidência nas últimas décadas e apresentam pior prognóstico que os tumores distais (CONDEDUCAV et al., 2013; CREW et al., 2006). No ano de 2012, segundo a IARC, o número de casos na cárdia foi maior do que os cânceres gástricos não-cárdia na Ásia Oriental, Ásia Central e Noroeste da Europa, no entanto na Oceania o número de casos de câncer na cárdia foi bem pequeno (IARC- 2014).

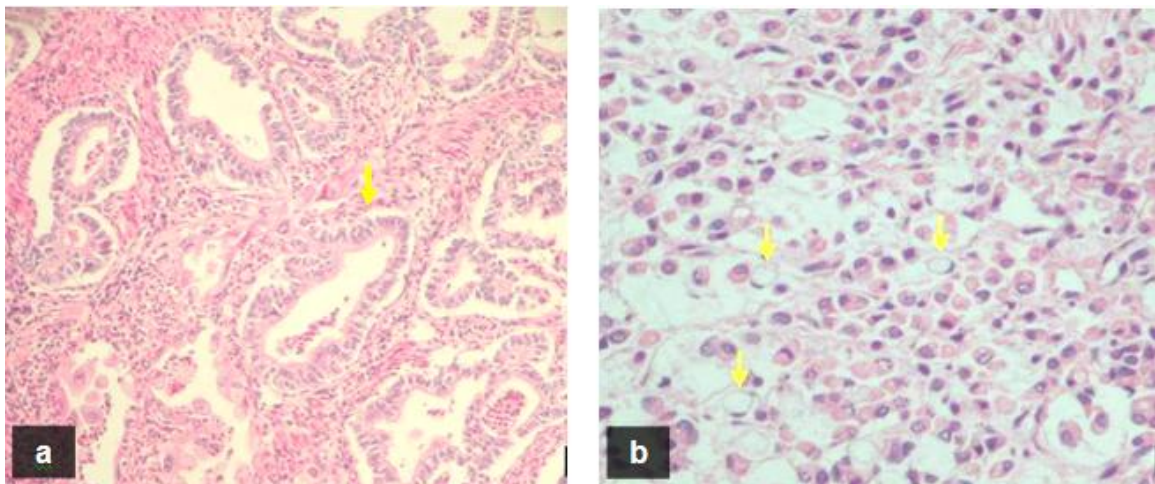
Figura 3. Anatomia do estômago.



Fonte: WVC (2006).

A classificação histológica do câncer gástrico divide esses tumores em dois tipos principais: não-epiteliais e epiteliais. Dentre os tumores epiteliais, estão incluídos os adenocarcinomas, que representam 90-95% dos casos de tumor gástrico (CORREIA et al., 2009). Devido à diversidade de arranjos histológicos, diferentes classificações baseadas em aspectos morfológicos foram propostas para os adenocarcinomas gástricos, dentre elas destacam-se as classificações da Organização Mundial de Saúde – OMS e a de Làuren (1965), sendo a última a mais utilizada nos países ocidentais. A classificação de Làuren dividiu-os em dois subtipos: intestinal e difuso. O tipo intestinal, que compreende principalmente tumores diferenciados, apresenta células com núcleos grandes e irregulares, os quais apresentam coesão celular a ponto de permitir a formação de estruturas tubulares do tipo glandular semelhantes a células intestinais. O tipo difuso, que em geral, inclui tumores pouco diferenciados, é constituído de pequenas células não coesas, difusamente dispersas, que não formam estruturas glandulares, podendo apresentar células com núcleos deslocados para a periferia do citoplasma devido a elevada produção de mucina, conferindo um aspecto de “anel-de-sinete” (ESPEJO e NAVARRETE, 2003; HARTGRINK et al., 2009). A figura 4 ilustra os subtipos segundo a classificação de Làuren.

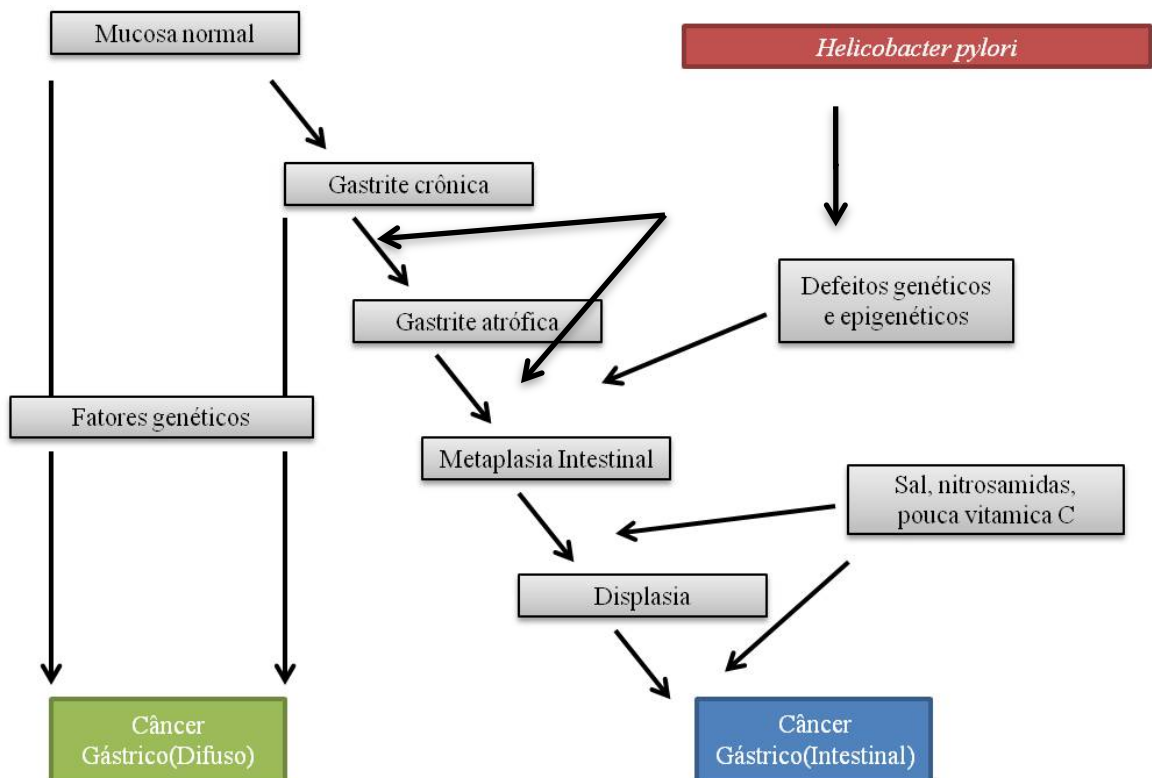
Figura 4. Características histopatológicas dos adenocarcinomas gástricos subtipo intestinal (a) e subtipo difuso (b). As setas em amarelo representam (a) células tumorais formando estruturas glandulares e (b) células tumorais em anel de sinete. Fonte: ESPEJO e NAVARRETE, 2003.



Os subtipos intestinal e difuso parecem ter base patogênica diferente. O tipo intestinal, mais comum em homens e em indivíduos mais velhos, é precedido de lesões pré-neoplásicas progressivas, como gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia, e mais frequentemente associado à infecção por *Helicobacter pylori*. A progressão dessas lesões gástricas que culmina no câncer gástrico é denominada “Cascata de Correa”

(CORREA et al., 1975) (figura 5) (SAHA et al., 2013). Quanto ao tipo difuso, é mais comum em mulheres e indivíduos jovens, podendo apresentar um caráter hereditário e ter como condição precursora gastrite com infecção por *H. pylori*, além disso, apresenta evolução clínica mais agressiva e pode prosseguir para metástase precoce (STADTLANDER et al., 1999; WERNER et al., 2001; CÉSAR et al., 2002; VAUHKONEN et al., 2006; CREW et al., 2006).

Figura 5. Representação esquemática da “CASCATA DE CORREA”. Fonte: Adaptado de Correa, 1992.



1.1.3 Etiologia do Câncer Gástrico

O câncer gástrico é uma doença de etiologia multifatorial na qual a interação entre fatores genéticos do hospedeiro e fatores ambientais desempenham um papel fundamental (KATO et al., 2004; QIU et al., 2005; CHAN, 2006; TAMURA, 2006; PAKSERESHT et al., 2011).

Dentre as alterações genéticas que podem influenciar no desenvolvimento do câncer gástrico podem-se destacar as que ocorrem no gene E-caderina (*CDH1*), cuja proteína

codificada está relacionada à adesão celular, como na síndrome do câncer gástrico familiar do tipo difuso (CALDAS et al., 1999; BRESCIANI et al., 2003; LYNCH et al., 2005; CHAN, 2006; TAMURA, 2006).

Dentre os fatores ambientais, pode-se destacar o consumo elevado de sal, que através da destruição da camada mucosa gera inflamação, erosão e degeneração epitelial (GLADE, 1999; LIU e RUSSELL, 2008); consumo excessivo de álcool, embora sua associação não tenha sido demonstrada (FRANKE et al., 2005); tabagismo, já identificado como um fator de risco (YOU et al, 2000; CÉSAR et al., 2002; LADEIRAS-LOPES et al., 2008); ingestão de alimentos em conserva, defumados, carnes curadas, peixes secos e outros alimentos conservados em sal (BRITO, 1997) são fatores fortemente associados ao risco (YOU et al, 2000; TEIXEIRA e NOGUEIRA, 2003).

A infecção por *H. pylori* é considerada o maior fator de risco conhecido para o desenvolvimento do câncer gástrico. É uma das infecções mais comuns em seres humanos e pode ser responsável por cerca de 60% dos casos de câncer gástrico no mundo. Nos países em desenvolvimento, a prevalência dessa infecção chega a 90%, sendo, em geral, adquirida na infância, persistindo ao longo da vida (HERRERA E PARSONNET, 2009). Entretanto, apenas uma pequena parte de indivíduos infectados desenvolve a neoplasia, e o risco da doença envolve a interação entre o patógeno e o hospedeiro, sendo esta, por sua vez, dependente de fatores cepa-específicos da bactéria, além de fatores intrínsecos do hospedeiro e de fatores ambientais, tais como, a dieta (MARSHALL, 2002; CREW e NEUGUT, 2006; PRINZ et al., 2006; PAKSERESHT et al., 2011).

A forte associação epidemiológica entre a infecção por *H. pylori* e o desenvolvimento de câncer gástrico fundamentaram que a *World Health Organization* (WHO) classificasse, no ano 1994, essa bactéria como um agente carcinogênico classe I (IARC, 1994; HONDA ET AL., 1998; WATANABE ET AL., 1998).

1.2 *Helicobacter pylori*

H. pylori foi descoberta em 1983 pelos pesquisadores australianos J. Robin Warren e Barry J. Marshall (MARSHALL E WARREN, 1984), foi um dos avanços mais importantes da gastroenterologia, tendo levado seus pesquisadores à premiação com o Nobel de Medicina no ano de 2005.

Bactérias semelhantes já haviam sido observadas em tecido gástrico por patologistas europeus mesmo antes de 1906 (KRIENTIZ, 1906), sendo também descritas por outros

pesquisadores posteriormente (DOENGES, 1938; FREEDBERG E BARRON, 1940; STEER, 1975), mas, por não terem sido isoladas, foram ignoradas e esquecidas por várias gerações. Em 1979, o microorganismo começou a ser observado por Warren como uma bactéria de formato curvo presente em amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia e submetidas a exame histológico (GOODWIN et al., 1987; BLASER, 1993; DUNN et al., 1997). Assim, apesar do ceticismo inicial demonstrado pelas comunidades médica e científica, o que fez com que Marshall infectasse a si próprio com a referida bactéria, ficou comprovada a associação de *H. pylori* com o desenvolvimento das doenças gástricas, como a gastrite, a úlcera duodenal e a úlcera gástrica (AHMED E SECHI, 2005).

A princípio, os microorganismos foram classificados como pertencentes ao gênero *Campylobacter*, composto por bactérias gram-negativas em forma de bastão curvado, oxidase e catalase positivas, que se locomovem através de flagelos polares. Dessa forma, foram primeiramente chamados de “gastric *Campylobacter* like organism”, recebendo, posteriormente, as denominações *Campylobacter pyloridis*, *Campylobacter pyloricus* e *Campylobacter pylori* (MARSHALL, 1984).

Finalmente, a partir de 1989, após estudos ultraestruturais e de análise da sequência de ácidos nucleicos, a bactéria recebeu a denominação *Helicobacter pylori*, diferenciando-se do gênero anteriormente chamado *Campylobacter* (bastão curvado) para o novo gênero *Helicobacter* (forma helicoidal). A espécie foi denominada ‘pylori’ devido ao fato de a bactéria ser mais comumente encontrada na mucosa do antro gástrico, próxima ao piloro (GOODWIN et al., 1989).

1.2.1 Epidemiologia

H. pylori coloniza o estômago de mais de 50% da população mundial, ou seja, mais de três bilhões de pessoas, mas sua prevalência varia muito entre países e entre grupos populacionais dentro do mesmo país (tabela 1). Essas diferenças entre os grupos étnicos são ocasionadas pelas intensidades maiores ou menores de exposição ao agente etiológico, tanto social como relativa à dieta alimentar e aos fatores ambientais (BARBOSA E SCHINONNI, 2011).

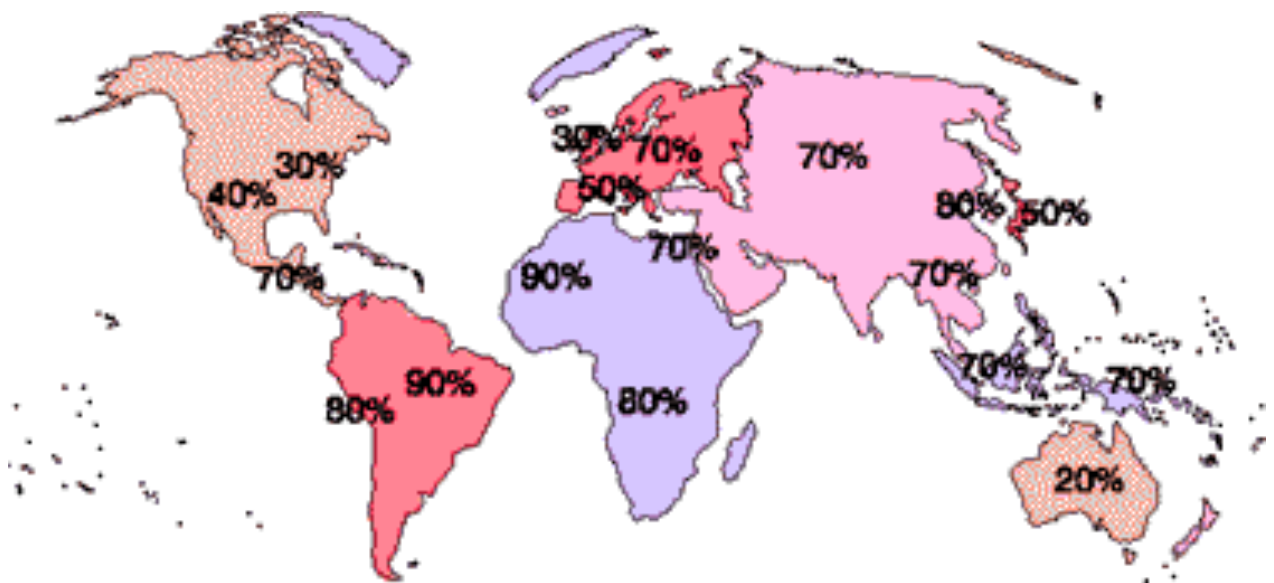
Estudos epidemiológicos apontam que a infecção por *H. pylori* também está relacionada com a idade, sendo que a aquisição desta bactéria é mais comum na infância do que na idade adulta (YAMAOKA, 2010). Um estudo efetuado recentemente em crianças no sul da Nigéria encontrou prevalência de 30,9%, verificando que a infecção era normalmente

adquirida na infância (ETUKUDO; IKPEME; EKANEM, 2012). Por outro lado, nos países desenvolvidos, verifica-se uma maior taxa da prevalência deste microorganismo em indivíduos adultos, podendo-se concluir que a manutenção de *H. pylori*, associada ao fator idade, está fortemente correlacionada com as condições socioeconômicas, falta de água potável e a uma alta densidade de habitantes em determinadas regiões do globo (KUSTERS et al., 2006).

No Brasil, pesquisas feitas com crianças na região nordeste, por exemplo, identificaram altas taxas de infecção pela bactéria em crianças, com valores de 22,2% na idade de meio a dois anos, 46,9% para três a quatro anos e 70,0% para cinco a seis anos, seguindo-se porcentagens também elevadas nas idades acima das citadas (PARENTE et al., 2006). Outros estudos realizados no país confirmam as evidências de que o nível social e de educação, além das condições sanitárias e familiares em que os indivíduos vivem, além da idade, são fatores determinantes na aquisição da infecção (SANTOS et al., 2005; ZATERKA et al., 2007).

Vários estudos têm mostrado que a prevalência da infecção por *H. pylori* está diminuindo em adultos e crianças em países desenvolvidos e em desenvolvimento (TONKIC et al., 2012). Isto evidencia as melhorias das condições socioeconômicas e conduta clínica voltada para o combate dessa bactéria. Apesar disso, uma grande proporção de indivíduos adultos permanece infectada, manifestando índices elevados para o câncer gástrico. Na figura 6, encontra-se representada a prevalência mundial da infecção por *Helicobacter pylori*.

Figura 6. Prevalência global da infecção pelo *Helicobacter pylori*. Fonte: The Helicobacter Foundation 2014.



| Tabela 1. Exemplos de diferenças na prevalência de <i>H. pylori</i> dentro e entre países representando países desenvolvidos e em desenvolvimento¹ | | | |
|--|----------------------------------|---------------------|--------------------|
| País | Número de casos estudados | Faixa etária | Prevalência |
| Brasil | | | |
| <i>Rural</i> | 40 (crianças) | < 20 anos | 77,5% |
| <i>Urbano</i> | 164 (adultos) | 20-90 anos | 84,7% |
| <i>Comunidade Urbana Pobre</i> | 363 | > 20 anos | 63,4% |
| Colômbia (rural) | 684 | 2-9 anos | 69% |
| China | | | |
| <i>Sudeste da China</i> | 1727 | N/A | 44,2% |
| <i>Hong Kong</i> | 397 | 36-65 | 58,6% |
| Egito | | | |
| <i>Alexandria (Nordeste)</i> | 169 mães | N/A | 88% |
| | 169 crianças | <1 ano | 13% |
| | | 1,5 anos | 25% |
| <i>Cairo (central)</i> | 52 | < 6 anos | 33% |
| | 56 | >6 anos | 60% |
| Índia | 238 | 3-70 anos | 79% |
| México | 11605 | 20-90 anos | 66% |
| Nepal (rural) | 1142 | 4-93 anos | 56,8% |
| Peru | 407 | 2meses-12 anos | 48% |
| | 104 | 0-17 | 50% |
| Rússia | 213 | 20-75 anos | 88% |
| Arábia Saudita | 557 | 5-10 anos | 40% |
| | | > 20 anos | 70% |
| Taiwan | 823 | 1-40 anos | 54% |
| Países Desenvolvidos | | | |
| Austrália | 273 | 19-47 anos | 23% |
| Dinamarca | 3589 | 30-60 anos | 25,9% |
| Alemanha | 260 | 18-61 anos | 39,2% |
| Israel (rural) | 377 | 30-90 anos | 72% |
| Japão | 4361 | 19-69 anos | 30% |
| Holanda | 254 | 11-89 anos | 27,2% |
| Nova Zelândia | 579 | 40-64 anos | 56% |
| Espanha | 332 | >18 anos | 43% |
| Coréia do Sul | 161 | 20-75 anos | 75% |
| Suiça | 176 | 10-20 anos | 7,3% |
| Reino unido | | | |
| <i>Inglaterra</i> | 267 | >18 anos | 41% |
| <i>Irlanda do Norte</i> | 4742 | 12-64 anos | 50,5% |
| Estados unidos | | | |
| <i>Carolina do Sul</i> | 938 soldados do exército | 17-26 anos | 26% |
| | 324 negros | | 44% |
| | 47 espanhóis | | 38% |
| | 536 brancos | | 14% |
| <i>Califórnia</i> | 556 | 20-39 anos | 27% |
| <i>Texas</i> | 246 negros | 15-80 anos | 70% |
| | 239 brancos | | 34% |

Traduzido de: KHALIFA et al., 2010

1.2.2 Características Microbiológicas

1.2.2.1 Classificação taxonômica

A espécie *Helicobacter pylori* pertence à seguinte classificação taxonômica (KONEMAN et al., 2008):

- Domínio: Bacteria;
- Reino: Eubacteria;
- Filo: Proteobacteria;
- Classe: Epsilonproteobacteria;
- Ordem: Campylobacterales;
- Família: Helicobacteraceae;
- Gênero: *Helicobacter*.

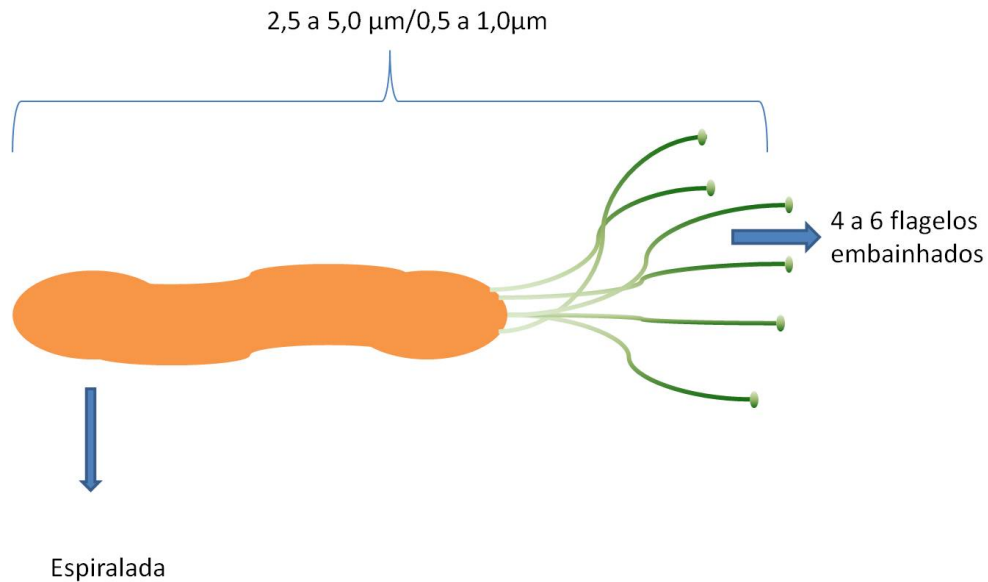
1.2.2.2 Estrutura e nutrição

H. pylori é uma bactéria em forma de espiral, não esporulada, medindo de 2,5 a 5,0 μM de comprimento e 0,5 a 1,0 μM de largura. É lofotríquia, com quatro a seis flagelos unipolares embainhados, com bulbo terminal, como representado na figura 7 (DUNN et al., 1997).

Esta bactéria é classificada como Gram negativa e, portanto, apresenta como tal uma membrana externa e outra membrana citoplasmática, separadas por um espaço periplasmático de aproximadamente 30 nm de espessura. Diferente de outras bactérias gram-negativas, a camada fina de peptidoglicano, com composição de muropeptídeo, é estruturalmente menos complexa (MOBLEY et al., 2001).

Com base em suas necessidades nutricionais, *H. pylori* é uma bactéria fastidiosa, heterotrófica e microaerófila apresentando, portanto, um crescimento ótimo sob baixa tensão de oxigênio (10% CO_2 , 5% de O_2 , 85% de N_2) e na presença de compostos orgânicos, além de fatores de crescimento (KONEMAN et al., 2008).

Figura 7. Representação estrutural externa de *H. pylori*.



1.2.2.3 Transmissão

O mecanismo exato de transmissão de *H. pylori* permanece indefinido, já que a bactéria tem praticamente como único reservatório o ser humano (MENDALL E NORTHFIELD, 1995; KUSTERS et al., 2006). Em raras ocasiões, o microorganismo foi detectado em animais domésticos, que podem, portanto, ser uma fonte de infecção (BROWN et al., 2001; DORE et al., 2001). No entanto, como não há uma conclusão acerca da possível transmissão por animais, novas infecções parecem ocorrer como consequência direta da transmissão entre humanos, através de duas vias principais: oral-oral e fecal-oral, ou de ambas (KUSTERS et al., 2006).

Considera-se que a infecção seja adquirida na infância, sendo a transmissão oral-oral a mais comum, especialmente devido a estudos que demonstraram que pessoas de uma mesma unidade familiar e indivíduos institucionalizados apresentam uma prevalência elevada da bactéria (BROWN, 2000; ALLAKER et al., 2002; KIVI et al., 2003; KONNO et al., 2005). Evidências primárias de que *H. pylori* pode ser transmitido pela saliva foram decorrentes de estudos que mostraram uma elevada contaminação entre crianças que ingeriram alimentos previamente mastigados pelas mães, o que é uma prática comum em alguns países da África (ALBENQUE et al., 1990).

Assim, a cavidade oral tem sido proposta como reservatório da infecção e também

das reinfecções por *H. pylori*, apesar de não ser claro se a bactéria é um habitante constante ou intermitente deste local (NGUYEN et al., 1995; MADINIER et al., 1997). As mais prováveis fontes de infecção oral incluem a saliva, a placa dental, o conteúdo do refluxo gástrico e o vômito (BROWN, 2000; SONG et al., 2000).

O DNA bacteriano também foi isolado através da análise das fezes de indivíduos infectados, demonstrando ser a rota fecal-oral um mecanismo também importante de transmissão (NAMAVAR et al., 1995; GRAMLEY et al., 1999; PARSONNET et al., 1999). A disseminação pela via fecal-oral pode ocorrer diretamente de uma pessoa infectada a outra ou em decorrência de situações ambientais que a favoreçam, como elevada densidade populacional no domicílio e precárias condições sanitárias e higiênicas (DOMINICI et al., 1999; MALATY et al., 2003, BRUCE E MAAROOS, 2008).

Diversos estudos também analisaram a possível transmissão através da água (QUERALT et al., 2005; BRUCE E MAAROOS, 2008), o que provavelmente reflete a contaminação desse recurso com DNA bacteriano degradado ou com o microorganismo morto (KUSTERS et al., 2006). Ainda, outra fonte de contaminação seriam os alimentos, já que há evidências de que a bactéria possa sobreviver por um tempo limitado em comidas refrigeradas (POMS E TATINI, 2001).

Com base nessas considerações, a transmissão pessoa-pessoa permanece como a forma mais provável de aquisição da infecção.

1.2.2.4 Diversidade genética

H. pylori exibe uma das maiores variabilidades genômicas conhecidas entre as bactérias, e é tão diversificada que é quase impossível encontrar duas estirpes independentes com perfis genômicos idênticos. Essa grande variabilidade genética é reflexo de sua alta taxa de mutação endógena (WANG et al., 1999), que ocorre devido à falta de um sistema de correção de pareamento de bases durante a replicação do DNA (TOMB et al., 1997); da sua alta competência para a aquisição de DNA exógeno, tanto de outras linhagens de *H. pylori* como de outras espécies bacterianas (SUERBAUM et al., 1998 e FALUSH et al., 2001). Além disso, *H. pylori* possui uma alta taxa de recombinação intragenômica devido basicamente à presença de um grande número de seqüências repetitivas de DNA (repetições homopoliméricas ou dinucleótidos) (ARAS et al., 2003).

H. pylori apresenta uma alta taxa de mutação endógena quando comparada à outras bactérias, tais como espécies da família Enterobacteraceae (BJORKHOLM et al., 2001;

SUERBAUM, 2007). A mutação é o principal mecanismo responsável pela alta variabilidade genética apresentada por essa bactéria. Além disso, o genoma de *H. pylori* não apresenta um sistema de correção de pareamento de bases, como o Sistema *mutHLS* de *E. coli*. (WANG et al., 1999). Esses mecanismos operando em conjunto contribuem para a geração e manutenção da diversidade genética apresentada por *H. pylori*.

H. pylori é um microorganismo naturalmente competente, capaz de captar, internalizar e incorporar DNA exógeno no seu genoma, através de processos de recombinação homóloga (SUERBAUM *et al.*, 1998). A competência natural permite que as várias amostras de *H. pylori* que coexistem no estômago de um mesmo indivíduo possam se recombinar, e como resultado, tem-se o aumento na diversidade genética intraespécie dentro do hospedeiro. Os múltiplos eventos de recombinação que *H. pylori* tem sofrido ao longo da sua evolução contribuíram para o caráter panmítico da estrutura de suas populações (KANG E BLASER, 2006).

Além da recombinação decorrente da aquisição de DNA exógeno, as células de *H. pylori* podem sofrer recombinação intragenômica, que pode ocorrer através de *slip-strand mispairing* em regiões de homonucleotídeos, dinucleotídeos ou longos pedaços de DNA repetitivo adjacentes (KANG E BLASER, 2006; ARAS et al 2003).

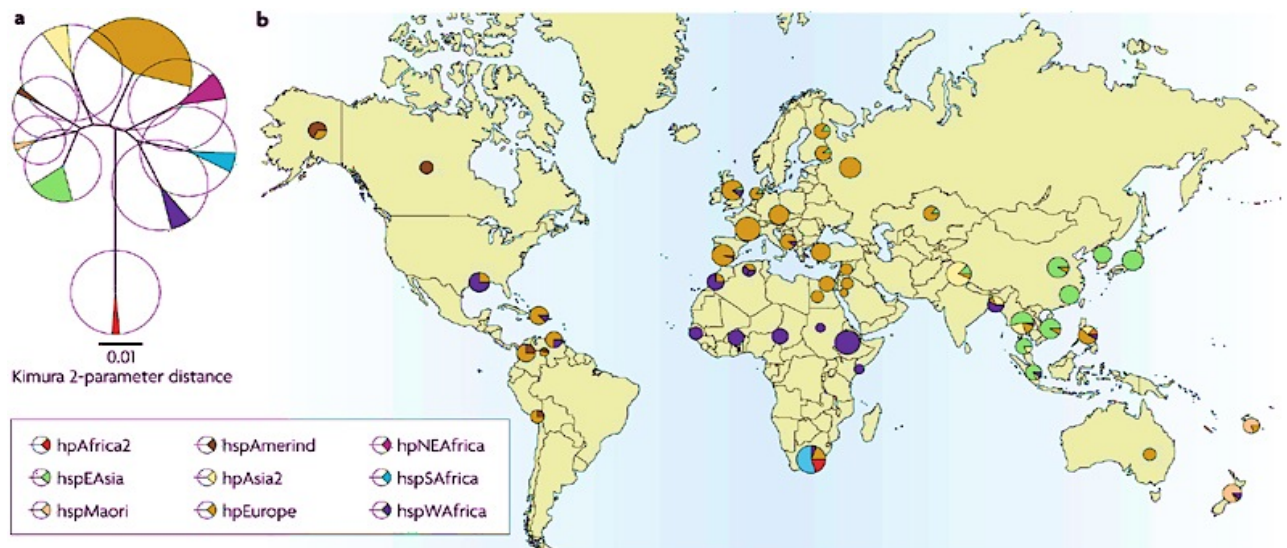
1.2.2.5 Variação Geográfica

Estudos também demonstram que existe uma variação geográfica entre cepas de *H. pylori* (ACHTMAN et al., 1999; WIRTH et al., 2004; LINZ et al., 2007; DEVI et al., 2007, YAMAOKA, 2009). Apesar da frequente taxa de recombinação, as espécies de *H. pylori* podem ser divididas em sete populações com distribuições geográficas distintas, baseado em duas grandes análises realizadas com 370 e 769 cepas de diversas fontes geográficas e étnicas (FALUSH et al., 2003; LINZ et al., 2007). Estas populações podem ser vistas na figura 8 e são designadas por *hpEurope*, que é comum na Europa e em países colonizados por Europeus; *hpAfrical*, composta pelas subpopulações *hspWAfrica* (África Ocidental, África do Sul e Américas) e *hspSAfrica* (África do Sul); *hpEastAsian*, constituída pelas subpopulações *hspMaori* (Polinésios, Melanésios e Nativos Tailandeses), *hspAmerind* (Índios Americanos) e *hspEAsia* (Ásia Oriental); *hpNEAfrica* (Nordeste África); *hpAfrica2*, que representa uma população da África do Sul muito distinta; e *hpAsia2*, que está localizada no Sul da Ásia e Ásia Central (SUERBAUM et al., 2007; LINZ et al., 2007). Mais recentemente, foi identificada a população *hpSahul* que é específica de Aborígenes da Austrália e de povos de

tribos da Nova Guiné (YAMAOKA et al., 2009; MOODLEY ET AL., 2009). Estas populações modernas são o resultado de dezenas de milhares de anos de vivência entre o homem e *H. pylori*, em conjunto com a migração das populações, o isolamento geográfico e a recombinação inter-estirpes. (SUERBAUM et al., 2007; LINZ et al., 2007; ATHERTON et al., 2009).

Estudos mostram que as cepas de *H. pylori* de diferentes regiões geográficas apresentam características diferentes e únicas, que levam à sua diferenciação filogenética de acordo com o seu histórico genético, no entanto, a data da associação entre esta bactéria e o homem é um assunto que ainda está por elucidar. Foi demonstrado que, em paralelo com o homem, a infecção por *H. pylori* disseminou-se do oeste Africano há cerca de 60,000 anos atrás (LINZ et al., 2007). Estes resultados mostram que o Homem anatomicamente moderno já se encontrava infectado com *H. pylori* antes das migrações da África e demonstram que desde então essa bactéria tem permanecido intimamente associada às populações hospedeiras.

Figura 8. Populações de *H. pylori* e a sua distribuição em todo o mundo. **A**, Árvore filogenética das populações e subpopulações de *H. pylori*, os diâmetros dos círculos representam a diversidade genética dentro de cada população e os ângulos dos arcos preenchidos são proporcionais ao número de isolados. **B**, Distribuição de nove populações e subpopulações entre 769 estirpes estudadas. (Fonte: Suerbaum et al., 2007).



1.2.2.6 Fatores de virulência e patogênese da infecção por *H. pylori*

Diversos fatores de virulência de *H. pylori* estão envolvidos na patogênese gástrica, sendo divididos de acordo com as funções que apresentam. Existem basicamente aqueles envolvidos na colonização, na adesão do epitélio gástrico, no dano tecidual e na sobrevivência da bactéria (MOBLEY et al., 2001).

A partir do levantamento bibliográfico sobre esses fatores de virulência foi gerado um artigo de revisão com os principais fatores de virulência de *H. pylori* citados na literatura e novos candidatos. O artigo está descrito a seguir.

REFERÊNCIAS

- ACHTMAN M, AZUMA T, BERG D E, ITO Y, MORELLI G, PAN Z J ET AL. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol* 1999; 32: 459-470.
- AHMED N, SECHI L A. *Helicobacter pylori* and gastroduodenal pathology: New threats of the old friend. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005; 4: 1-10.
- ALBENQUE M, TALL F, DABIS F, MÉGRAUD F. Epidemiological study of *Helicobacter pylori* transmission from mother to child in Africa. *Rev Esp Enferm Dig* 1990; 78: 4- 8.
- ALLAKER R P, YOUNG K A, HARDIE J M, DOMIZIO P, MEADOWS N J. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. *J Med Microbiol* 2002; 51: 312-317.
- ARAS, RA; KANG, J; TSCHUMI, AI; HARASAKI, Y; BLASER, MJ. Extensive repetitive DNA facilitates prokaryotic genome plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100: 13579-13584.
- ATHERTON J, BLASER M. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *Journal of Clinical Investigation* 2009; 119: 2475-2487.
- BARBOSA, J.A.; SCHINONNI, M. I. *Helicobacter pylori*: associação com o câncer gástrico e novas descobertas sobre os fatores de virulência. *Rev Ci Med Biol.* 2011; 10, 3: 254-262.
- BJORKHOLM, B; SJOLUND, M; FALK, PG; BERG, O; ENGSTRAND, L; ANDERSSON, DI. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 14607-14612.
- BRESCIANI, C.; PEREZ, R.O., GAMA-RODRIGUES, J. Familial gastric cancer. *Arq Gastroenterol* 2003; 40, 114-117.
- BROWN L M, THOMAS T L, MA J L, CHANG Y S, YOU W C, LIU W D ET AL. *Helicobacter pylori* infection in rural China: exposure to domestic animals during childhood and adulthood. *J Infect Dis* 2001; 33: 686-691.
- BROWN L M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev* 2000; 22: 283-297.
- BRUCE M G, MAAROOS H I. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2008; 13: 1-6.
- CÉSAR, A. C. G.; SILVA, A. E., TAJARA, E. H. Fatores Genéticos e Ambientais Envolvidos na Carcinogênese Gástrica. *Arq Gastroenterol* 2002; 39, 4: 253-259.
- CHAN, A.O.; E-cadherin in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2006; 12, 199-203.
- CORREA P, HAENSZEL W, CUELLO C, TANNENBAUM S, ARCHER M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 1975; 12, 2: 58-60.

CORREIA M, MACHADO JC, RISTIMÄKI A. Basic aspects of gastric cancer. *Helicobacter*. 2009; 14, 1: 36-40.

CREW KD, NEUGUT AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2006; 21, 12:354-62.

CONDEDUCAV, SANSONNO D, LAULETTA G, RUSSI S, INGRAVALLO G, DAMMACCO F. H. pylori infection and gastric cancer: state of the art (review). *Int J Oncol*. 2013 Jan;42(1):5-18. doi: 10.3892/ijo.2012.1701.

DEVI S M, AHMED I, FRANCALACCI P, HUSSAIN M A, AKHTER Y, ALVI A ET AL. Ancestral European roots of *Helicobacter pylori* in India. *BMC Genomics* 2007; 8: 184.

DOENGES J L. Spirochetes in gastric glands of *Macacus rhesus* and humans without definite history of related disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1938; 38: 536-538.

DORE M P, SEPULVEDA A R, EL-ZIMAITY H, YAMAOKA Y, OSATO K, MOTOTSUGU K ET AL. Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep – implications for transmission to humans. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1396-1401.

DOMINICI P, BELLENTANI S, DI BIASE A R, SACCOCCIO G, LE ROSE A, MASUTTI F ET AL. Familial clustering of *Helicobacter pylori* infection: population based study. *BMJ* 1999; 319: 537-541.

DUNN B E, COHEN H, BLASER M J. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Reviews* 1997; 10: 720-741.

ESPEJO, E.; NAVARRETE, S. J. Classification of stomach adenocarcinomas. *Rev. Gastroenterol.: Peru* 2003; 23, 3: 199-212.

ETUKUDO, O. M.; IKPEME, E. E.; EKANEM, E. E. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection among children seen in a tertiary hospital in Uyo, southern Nigeria. *Pan African Med J*. 2012; 12, 39: 237-244.

FALUSH, D; KRAFT, C; TAYLOR, NS; CORREA, P; FOX, JG; ACHTMAN, M; SUERBAUM, S. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98: 15056-15061.

FALUSH, D. ET AL. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 2003; 299: 1582–1585.

FRANKE, A.; TEYSSEN, S.; SINGER, M. V. Alcohol-related diseases of the esophagus and stomach. *Dig. Dis* 2005; 23: 204–213.

FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;1; 359-386.

FREEDBERG A S, BARRON L E. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. *Am J Dig Dis* 1940; 7: 443-445.

GLADE, M. J. Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/ World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. Nutrition. V 1999; 15: 523–526.

GOODWIN C S, MCCULLOCH R K, ARMSTRONG J A, WEE S H. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J Med Microbiol* 1987; 19: 257-267.

GOODWIN C S. *Campylobacter pylori* become *Helicobacter pylori*. *Int J Bacteriol* 1989; 39: 353-405.

GRAMLEY W A, ASHGAR A, FRIERSON H F JR, POWELL S M. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2236-2240.

HARTGRINK HH, JANSEN EPM, VAN GRIEKEN NCT, VAN DE VELDE CJH. Gastric cancer. *Lancet* 2009; 374: 477–90.

HERRERA V, PARSONNET J. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 971-976.

HONDA S, FUJIOKA T, TOKIEDAM SATOH R, NISHIZONO A, NASU M. Development of *Helicobacter pylori* induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res* 1998; 58: 4255-9.

IARC Working Group. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans.. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 61: 1–241.

INCA, Instituto Nacional do Cancer. www.inca.com.br KHALIFA, M., SHARAF, R., AZIZ, R. *Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen? *Gut. Pathogens* 2010; 2: 1-12.

KAMALI-SARVESTANI, E.; BAZARGANI, A.; MASOUDIAN, M.; LANKARANI, K.; TAGHAVI, A.R.; SABERIFIROOZI, M. Association of H pylori cagA and vacA genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5205-5210.

KANG, J & BLASER, MJ. Bacterial populations as perfect gases: genomic integrity and diversification tensions in *Helicobacter pylori*. *Nature* 2006; 4: 826-835.

KATO, A.; BANDO, E.; SHINOZAKI, S.; YONEMURA, Y.; AIBA, M.; FUKUDA, I.; HIZUKA, N.; KAMEYA, T . Severe hypoglycemia and hypokalemia in association with liver metastases of gastric cancer. *Intern Med* 2004; 43, 6: 824- 828.

KONEMAN, E.; WINN, J., W. ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Diagnóstico

microbiológico texto e atlas colorido, 2008.

KIVI M, TINDBERG Y, SORBERG M, CASSWALL T H, BEFRITS R, HELLSTROM P M ET AL. Concordance of *Helicobacter pylori* strains within families. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5604-5608.

KONNO M, FUJII N, YOKOTA S, SATO K, TAKAHASHI M, MINO E ET AL. Five-year follow-up study of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by a random amplified polymorphic DNA fingerprinting method. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2246-2250.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BIELANSKI, W.; KARCZEWSKA, E.; ZUCHOWICZ, M.; HARTWICH, A.; REHFELD, J.F.; GOETZE, J.P.; HAHN, E.G. Serum progastrin and its products, gastric acid secretion and serum pepsinogen I in gastric cancer. *Digestion* 2003; 68: 169-177.

KONTUREK PC, KONTUREK SJ, BRZOZOWSKI T. Gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. *J Physiol Pharmacol* 2006; 3:51-65.

KRIENTIZ W. Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form in Mageninhalt bei Carcinoma Ventriculi. *Dtsch Med Wochenschr* 1906; 28: 872.

KUSTERS, J. G.; VAN VLIET, A. H. M.; KUIPERS, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19, 449-490.

LAMARQUE, D.; M PEEK R JR. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003; 8: 21-30.

LAURÈN, P. Two Histological main types of Gastric Carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 1965; 64, 31-49.

LINZ B, BALLOUX F, MOODLEY Y, MANICA A, LIU H, = ROUMAGNAC P, FALUSH D, STAMER C, PRUGNOLLE F, VAN DER MERWE SW, YAMAOKA Y, GRAHAM DY, PEREZ-TRALLERO E, WADSTROM T, SUERBAUM S, ACHTMAN M. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 2007; 445: 915-918.

LINZ B, SCHUSTER S C. Genomic diversity in *Helicobacter* and related organisms. *Res Microbiol* 2007; 158: 737-744.

LYNCH, H.T.; GRADY, W.; SURIANO, G.; HUNTSMAN, D. Gastric cancer: new genetic developments. *J Surg Oncol.* 2005; 90, 114-133.

LIU, C.; RUSSELL, R. M. Nutrition and gastric cancer risk: an update. *Nutr. Rev* 2008; 66: 237-249.

MADINIER I M, FOSSE T M, MONTEIL R A. Oral carriage of *Helicobacter pylori*: a review. *J Periodontol* 1997; 68: 2-6.

MALATY H M, TANAKA E, KUMAGAI T, OTA H, KIYOSAWA K, GRAHAM D Y ET AL. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection and hepatitis A virus and the mode of

transmission of infection: a 9-year cohort study in rural Japan. *CID* 2003; 37: 1067-1072.

MARSHALL B J, WARREN J R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315.

MARSHALL B. *Helicobacter pylori*: 20 years on. *Clin Med*. 2002; 2:147-52.

MENDALL M A, NORTHFIELD T C. Transmission of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1995; 37: 1-3.

MOBLEY HLT, MENDZ GL, HAZELL SL. Editors In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Source Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC) ASM Press 2001.

MOODLEY Y, LINZ B, YAMAOKA Y, WINDSOR H, BREUREC S, WU JY, MAADY A, BERNHÖFT S, THIBERGE JM, PHUANUKOONNON S, JOBB G, SIBA P, GRAHAM D, MARSHALL B, ACHTMAN M. The peopling of the Pacific from a bacterial perspective. *Science* 2009; 323: 527-530.

NAMAVAR F, ROOSEDAAL R, KUIPERS E J, DE GROOT P, VAN DER BIJL M W, PENA A S ET AL. Presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity, esophagus, stomach and faeces of patients with gastritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 234-237.

NGUYEN A M, EL-ZAATARI F A, GRAHAM D Y. *Helicobacter pylori* in the oral cavity. A critical review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79: 705-709.

PAKSERESHT M, FORMAN D, MALEKZADEH R, YAZDANBOD A, WEST RM, GREENWOOD DC, CRABTREE JE, CADE JE. Dietary habits and gastric cancer risk in north-west Iran. *Cancer Causes Control* 2011; 22:725-36.

PARENTE J M L, SILVA B B, PALHA-DIAS M P, ZATERKA S, NISHIMURA N, ZEITUNE J M R. *Helicobacter pylori* infection in children of low and high socioeconomic status in Northeastern Brazil. *Am J Trop Hyg* 2006; 75: 509-512.

PARK, W.S.; OH, R.R.; KIM, Y.S.; PARK, J.Y.; SHIN, M.S.; LEE, H.K.; LEE, S.H.; YOO, N.J.; LEE, J.Y. Absence of mutations in the kinase domain of the Met gene and frequent expression of Met and HGF/SF protein in primary gastric carcinomas. *APMIS* 2000; 108: 195-200.

PARSONNET J, SHMUELY H, HAGGERTY T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA* 1999; 282: 2240-2245.

PERMIN, H.; ANDERSEN, L. P. Inflammation, immunity, and vaccines for *Helicobacter* infection. *Helicobacter* 2005; 10: 21-25.

POMS R E, TATINI S R. Survival of *Helicobacter pylori* in ready-to-eat food at 4 degrees C. *Int J Food Microbiol* 2001; 63: 281-286.

PRINZ C, SCHWENDY S, VOLAND P. *H pylori* and gastric cancer: shifting the global

- burden. *World J Gastroenterol*. 2006; 14: 12:5458-5468.
- QIU JL, CHEN K, ZHENG JN, WANG JY, ZHANG LJ, SUI LM. Nutritional factors and gastric cancer in Zhoushan Islands, China. *World J Gastroenterol* 2005 28;11:4311-6.
- QUERALT N, BARTOLOME R, ARAUJO R. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *J Appl Microbiol* 2005; 98: 889-895.
- RESENDE C, THIEL A, MACHADO JC, RISTIMÄKI A. Gastric cancer: basic aspects. *Helicobacter* 2011; 1: 38-44.
- ROBBINS & COTRAN (Eds.) *Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- SAHA AK, MAITRA S, HAZRA SC. Epidemiology of gastric cancer in the gangetic areas of west bengal. *ISRN Gastroenterol* 2013:823-483.
- SANTOS I S, BOCCIO J, SANTOS A S, VALLE N C J, HALAL C S, BACHILLI M C ET AL. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and associated factors among adults in Southern Brazil: a population-based cross-sectional study. *BMC Public Health* 2005; 5: 118-128.
- STADTLANDER, C. T. K-H.; WATERBOR, J. W. *Molecular Epidemiology, Pathogenesis and Prevention of Gastric Cancer*. *Carcinogenesis* 1999; 20, 12: 2195-2207.
- STEER H W. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J Clin Pathol* 1975; 28: 639-646.
- SONG Q, LANGE T, SPAHR A, ADLER G, BODE G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J Med Microbiol* 2000; 49: 349-353.
- SUERBAUM, S; SMITH, JM; BAPUMIA, K; MORELLI, G; SMITH, NH *ET AL*. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95: 12619.
- SUERBAUM S, JOSENHANS C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nature Reviews Microbiology* 2007; 5: 441– 452.
- TAMURA G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2006 14;12:192-8.
- TEIXEIRA, J.B., NOGUEIRA, M.S. Gastric cancer: risk factors in patients treated in tertiary care services of a municipality in the interior of the state of São Paulo. *Rev Lat Am Enfermagem* 2003;11: 43-48.
- TOMB J. F, WHITE, O, KERLAVAGE, A. R, CLAYTON, R. A; SUTTON, G. G, FLEISCHMANN, R. D, KETCHUM, K. A, KLENK, H. P, GILL, S, DOUGHERTY, D. A, NELSON, K, QUACKENBUSH, J, ZHOU, L, KIRKNESS, E. F, PETERSON, S, LOFTUS, B, RICHARDSON, D, DODSON, R, KHALAK, H. G; GLODEK, A, MCKENNEY, K,

FITZGERALD, L. M, LEE, N, ADAMS, M. D, VENTER, J. C. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1997; 388: 539-547.

TONKIC, A. et al. Epidemiology and diagnosis of helicobacter pylori Infection. Helicobacter 2012; 17, 1–8.

VAUHKONEN, M.; VAUHKONEN, H.; SIPPONEM P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2006; 20, 651-674.

WANG, GE; HUMAYUN, Z; TAYLOR, DE. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. Trend. Microbiol 1999; 7:488-492.

WATANABE T, TADA M, NAGAI H, , SASAKI S, NAKAO M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. Gastroenterology 1998; 115:642-8.

WERNER, M.; BECKER, K.F.; KELLER, G.; HÖFLER, H. Gastric Adenocarcinoma: Pathomorphology and Molecular Pathology. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2001; 127, 207-216.

WIRTH T, WANG X, LINZ B, NOVICK R P, LUM J K, BLASER J M ET AL. Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: lessons from Ladakh. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 4746-4751.

YAMAOKA Y. *Helicobacter pylori* typing as a tool for tracking human migration. Clinical Microbiology and Infection 2009; 15: 829-34.

YAMAOKA, Y. Mechanisms of Disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. Nat. Rev. Gastroenterol Hepatol 2010; 11: 7629-641.

YOU, W.C.; ZHANG, L.; GAIL, M.H.; CHANG, Y.S.; LIU, W.D.; MA, J.L.; LI, J.Y.; JIN, M.L.; HU, Y.R.; YANG, C.S.; BLASER, M.J.; CORREA, P.; BLOT, W.J.; FRAUMENI, J.F. JR.; XU, G.W. Gastric dysplasia and gastric cancer: *Helicobacter pylori*, serum vitamin C, and other risk factors. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 1607-1612.

ZATERKA S, EISIG J N, CHINZON D, ROTHSTEIN W. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. Helicobacter 2007; 12: 82-88.

Artigo 1 - Publicado em World Journal of Gastroenterology

What exists beyond *cagA* and *vacA* genes? Other *Helicobacter pylori* virulence factors in Gastric Diseases

Authors: Débora Menezes da Costa¹, Eliane dos Santos Pereira¹, Silvia Helena Barem Rabenhorst¹.

Affiliations:

¹ Department of Pathology and Forensic Medicine, Federal University of Ceará, Brazil.

Corresponding Author:

Rabenhorst, SHB. Molecular Genetics Laboratory, Department of Pathology and Forensic Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará. Street Coronel Nunes de Melo, 1315 – Rodolfo Teófilo – Fortaleza/Ceará/Brazil. CEP 60430-270. E-mail: srabenhorst@yahoo.com.br. Telephone: +55 85 99945689 Fax: +55 85 3267384

Abstract

The *Helicobacter pylori* infection is present in more than half of the world's population and it has been associated with several gastric disorders, as gastritis, peptic ulceration and gastric adenocarcinoma. The clinical outcome of this infection depends on host and bacterium factors where *H. pylori* virulence genes seem to play a relevant role. Until now, *cagA* and *vacA* genes were studied and established in the literature as determining factors in gastric pathogenesis. However, there are percentages of gastric cancer cases that are *cagA* negative. Several other virulence genes have been searched but these genes still remain in the shadow of *cagA* and *vacA*. Thus, this review aimed to bring up which genes have been suggested as potentially relevant virulence factors for *H. pylori* associated gastrointestinal diseases. We focused on the *cag*-pathogenicity island, genes with adherence and motility functions and *iceA* based on its relevance shown in several studies in the literature.

Keywords: *Helicobacter pylori*; virulence genes; Cag-PAI; motility genes; adhesion genes

1. Introduction

Helicobacter pylori is a Gram-negative spiral shaped bacterium that selectively colonizes the gastric mucous layer by adhering to the epithelial lining of the stomach. It is a urease, catalase and oxidase positive bacterium that possesses 4 to 6 polar flagella used for motility and several virulence factors which vary with the strains [1,2]. *H. pylori* was isolated by the first time in 1983 by Warren and Marshall from gastric biopsy samples of patients with chronic gastritis and peptic ulcer. However, the finding of spiral bacteria in the stomach of animals dates back to 1906 [3,4].

Evidence supports that the relationship between *H. pylori* and its human host exists for at least 60,000 years. One piece of evidence is the fact that the genetic diversity of bacteria evolved in parallel to the human species, showing that both have been evolving intimately ever since. Furthermore, the genetic diversity distribution of *H. pylori* is in consonance with the colonization of the earliest humans and with co-migration out of East Africa [5]. In 1994, the WHO recognized this bacteria as a type I (definite) carcinogen in humans, based in evidence that *H. pylori* is involved in the development of gastric adenocarcinoma [6]. The infection by *H. pylori* is present in more than half of the world's population. However, not all infected people exhibit diseases associated to this bacterium. It is the main cause of gastric disorders such as gastritis in about 20%, peptic ulceration in 10%, gastric adenocarcinoma in 1-2% and gastric MALT lymphoma in less than 0.1% of the people infected [7,8].

The clinical outcome of infection by *H. pylori* depends on the presence of bacterium virulence factors and on factors related to the host. Several virulence genes are well studied and established in the literature as determining factors in gastric pathogens such as *cagA* and *vacA* genes. Several other genes, although previously studied, still remain in the shadow of *cagA* and *vacA*. Thus, the objective of this review is to discuss about current knowledge of *H. pylori* virulence factors that bring out other genes of *cag* Pathogenicity Island – *cag*-PAI, genes that codifies outer membrane proteins (*babA*, *oipA*, *sabA*, *hopQ*), motility genes (*flaA* and *flaB*) and *iceA*, which are pointed out in the literature as potentially relevant for the development of more severe lesions.

2. Well Established Virulence Factors

The *cagA* (cytotoxin-associated gene A) and *vacA* (vacuolating cytotoxin A) genes are both well established and extensively studied *H. pylori* virulence factors. While not all *H.*

pylori strains possess the *cagA* gene, essentially, all strains possess the *vacA* gene. However, not all secrete a VacA product, which depends on the gene structure.

The *cagA* gene is a recognized marker for the presence of *cag*-PAI. This gene encodes a 121–145 kDa immuno-dominant protein (CagA) that once injected into the gastric epithelial cell cytoplasm interacts with host cell proteins, inducing cell morphological changes (hummingbird phenotype), pro-inflammatory and mitogenic responses. Several studies in cell culture and animal models indicate the importance of the *cagA* gene involvement in human gastric cancer, one of them showing that its deletion prevents the development of the disease in gerbil model [9-11]. Most of the *H. pylori* strains in East Asia have the *cagA* gene, regardless of the disease. Thus, the pathogenic difference in this region is difficult to explain in terms of the presence or absence of the *cagA* gene alone [12].

The CagA protein contains tyrosine phosphorylation motifs (glutamate-proline-isoleucine-tyrosine- alanine, EPIYA) within the carboxyl-terminal variable region of the protein. Studies show the existence of four EPIYA motifs (A, B, C e D). EPIYA-A and -B are present throughout the world, EPIYA-C is predominantly found in strains from Western countries and EPIYA-D is found almost exclusively in East-Asian strains (Japan, Korea and China). *H. pylori* strains containing EPIYA-D motifs induce significantly higher levels of IL-8 release from gastric epithelial cells when compared to strains containing the A-B-C-type of CagA [13,14].

The *vacA* gene is not part of the *cag*-PAI. It induces vacuolization and various cellular activities such as the formation of membrane channels, the release of cytochrome *c* from mitochondria leading to apoptosis and binding to cell receptors membrane, followed by a pro-inflammatory response [15,16]. Nonetheless, considerable differences in vacuolating activities are observed between strains according to variations in *vacA* gene structures within the signal (s), the middle (m), and intermediate (i) regions [17]. The ‘s’ and ‘m’ regions are stratified into s1 or s2 and m1 or m2 subtypes, and the possible combinations generate proteins with different cytotoxicity. In vitro experiments showed that *vacA* s1/m1 strains induce greater vacuolation than do s1/m2 strains, and there is typically no vacuolating activity in s2/m2 strains [17].

In agreement with in vitro data, studies in Middle East, Africa and Western countries showed that individuals infected with *vacA* s1 or m1 *H. pylori* strains have an increased risk of peptic ulcer or gastric cancer compared with individuals infected with s2 or m2 strains [18,19]. On the other hand, in East Asia, as most strains are *vacA* s1, the differences in pathogenesis cannot be explained by the type of ‘s’ region [20]. On its turn, the ‘m’ region in

East Asia shows variations suggesting that it may play a role in the regional difference. In northern East Asia there is a higher prevalence of strains *vacA* m1 and incidence of gastric cancer, whereas in the south of East Asia, where the strains *vacA* m2 are prevalent, the incidence of cancer is lower than in the north region [20,21]. A Brazilian study indicated that in the absence of *cagA*, there was a relevance *vacA* s1 in the development of gastric cancer, since most of the negative strains, had the *vacA* s1 gene [22].

3. Variability and Integrity of *cag* Pathogenicity Island

The *cag*-PAI is a segment of *H. pylori* DNA with 40 kilobase which contains 31 genes [23]. Most of these genes encode functional components of a type 4 bacterial secretion system (T4SS) used for the translocation of bacterial products directly into the host cell cytoplasm, including the *cagA* gene product [24]. The *cag*-PAI is found in about 60% of Western strains, whereas almost all of the East Asian strains isolated are *cag*-PAI positive [25]. The positive *cag*-PAI strains are more related to peptic ulcer and gastric cancer than the negative strains, showing that *cag*-PAI plays an important role in *H. pylori* pathogenesis [26,27].

A phylogeny study showed by sequencing that most *cag*-PAI genes were similar to those of housekeeping genes, indicating that the *cag*-PAI was probably acquired only once by *H. pylori*. Thus, *H. pylori* genetic diversity seems to reflect the isolation by distance that has shaped this bacterial species since modern humans migrated out of Africa. Carriage of the *cag*-PAI varies from almost universal presence in the strains hpEastAsia and hpAfrica1, through intermediate presence (hpEurope) to complete absence (hpAfrica2). When compared to other bacteria of the same genus, the absence of *cag*-PAI seems to be an ancestral state. Thus, the pathogenicity island would have been acquired by horizontal gene transfer from an unknown source after *H. pylori* had established itself in humans [11].

Initial studies on the integrity of *cag*-PAI analyzed sequences of *cagI* and *cagII* regions and genes present in these regions separately [28,29]. One study that analyzed *cag*-PAI integrity shows that rearrangement in this island is a prevalent phenomenon, with less rearrangement in the *cagE* and *cagT* genes than in the *cagA* gene. The *cag*-PAI was disrupted in the majority of isolated strains throughout the world. Conservation of *cag*-PAI was highest in Japanese isolates and minimal in European and African strains [30]. Infection with a strain containing a complete set of *cag*-PAI genes was associated to the development of ulcer disease, showing the importance of these genes to gastric diseases outcomes [31].

4. Other genes located in *cag*-PAI

Several Cag proteins have been detected as constituents of *H. pylori cag* T4SS apparatus and with important roles in the translocation of CagA [32]. These include CagE, VirB11, CagT, CagM and CagG, whose importance will be described below (Figure 1).

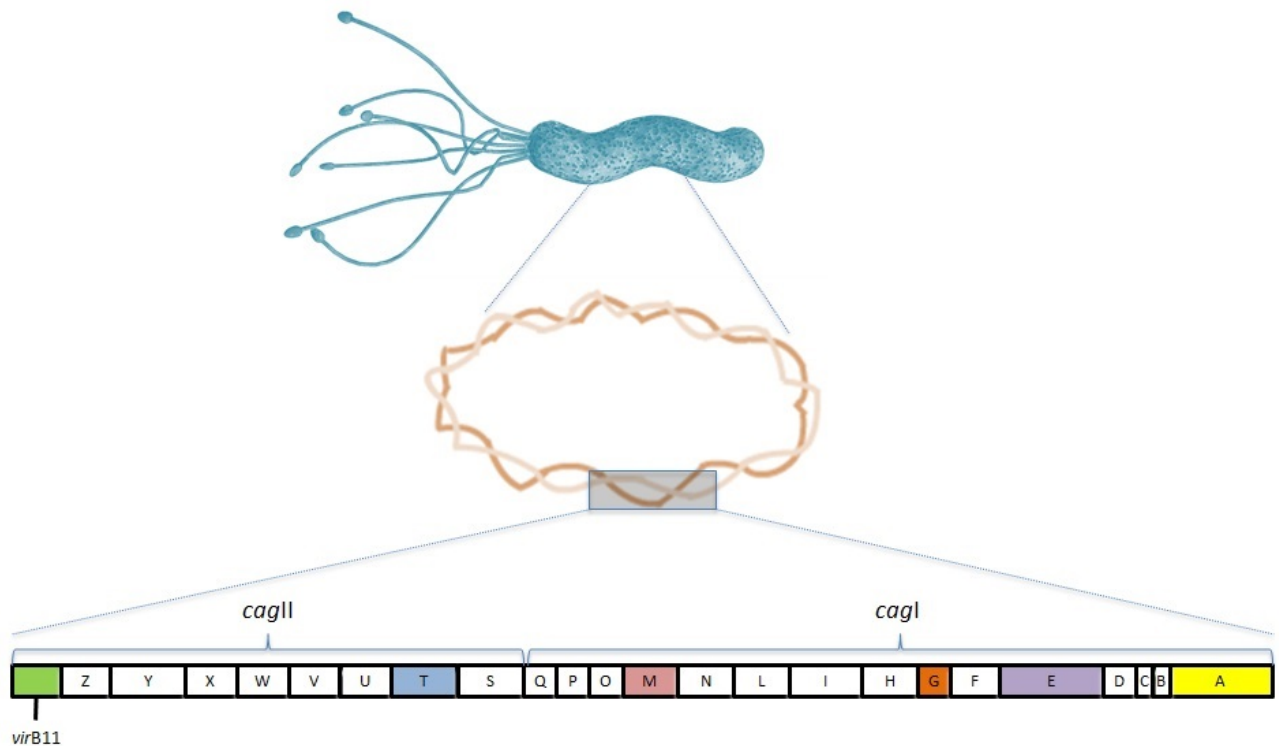


Figure 1. Schematic representation of the *cag*-PAI of *H. pylori* deduced from strain 26695. The localizations of *cag* I and *cag* II are shown. Highlighted squares represent genes cited in this review.

4.1 *cagE* and *virB11*

cagE is located in the right half of the *cag*-PAI and studies have suggested that this gene is a more accurate marker of an intact pathogenicity island and can be used as a *cag*-PAI marker with *cagA* [33,34]. *virB11* codifies a protein that has a ring-shaped structure composed of six monomeric units. These genes codify transmembrane proteins with ATPase activity that provides the energy for apparatus assembly and/or substrate transport [24,35].

Although there is a well-established relationship between *cagE* and *virB11* genes with gastritis, peptic ulcer and duodenal ulcer, few studies have described an association with gastric cancer [36-38]. Two of these studies show the presence of these genes in early tumor stages strains and its association with other virulence genes, showing that there is a participation of *cagE* and *virB11* with gastric carcinogenesis [34,39].

4.2 *cagT*

The *cagT* gene is a homologue of *A. tumefaciens virB7* and it has been reported to be a marker of the *cagII* region [40]. Some studies revealed that CagT localized in both inner and outer membranes play important roles in the induction of the proinflammatory cytokine IL-8 when localized in the outer membrane [41-43]. It may also interact with CagA and facilitate its translocation into host cells, acting as a chaperone-like protein localized in the inner membrane [44].

The expression of CagT in *H. pylori* is also closely associated with severe gastric disease [45]. Deletion frequencies of *cagT* genes were higher in benign cases compared with isolates from severe ulcers and gastric cancers [46,47]. Studies reported an association of *cagT* gene with the development of peptic ulcer disease, suggesting a high virulence gene in *H. pylori* [40,48,49]. The *cagT* gene, as well as the *cagA*, have been associated with other virulence factors, such as *vacA* s1, *vacA* m1 and the genotype *vacA* s1m1, occurring in smaller percentages concomitantly with *vacA* s2 strains, *vacA* m2 and *vacA* s2m2 [49,50]. Therefore, CagT seems to be a very important protein in *H. pylori*, not only for the integrity of the *cag*-PAI apparatus but also for determining disease severity.

4.3 *cagM*

The *cagM* gene has been reported to be a marker of the *cagI* region [51]. Some studies revealed that the protein encoded by this gene form a surface structure which acts as the NF- κ B-inducing agent, mediating IL-8 secretion [41,52,53]. It is also involved in the repression of H/K-ATPase transcription, which causes the downregulation of human gastric H/K-ATPase expression, significantly inhibiting acid secretion by gastric cells [54,55]. CagM expression may represent a first line of *H. pylori* defense against gastric acid, which may otherwise be upregulated by the presence of CagM-deficient Gram-negative bacteria.

Expression of CagM in *H. pylori* is also associated with severe gastric disease. Some studies revealed that the *cagM* gene is associated with the development of gastritis, peptic ulcers and gastric cancer [45,49,56,57]. Thus, CagM is a very important protein, not only for the integrity of the *cag*-PAI apparatus but also for determining disease severity and a line of *H. pylori* defense against gastric acid.

4.4 *cagG*

cagG is located in the right side of *cag*-PAI and it has been reported to be a marker of the *cagI* region. This gene is not a *vir* homologue, but it has weak homology to the flagellar

motor switch protein gene or toxin coregulated pilus biosynthesis protein gene [23,51,58]. It may also play an important role in the induction of the proinflammatory cytokine IL-8 [41,52].

Some studies suggest that *cagG* may have a function related to the adhesion to gastric epithelial cells. *cagG*-deleted strains adhere less to gastric epithelial cells, and these strains cause a reduction in the amount of IL-8 secreted from the cells [59,60]. The frequency of the *cagG* gene has been high in several gastrointestinal diseases, but such a specific disease related to it has not been found [51,61].

Given the above, we suggest that the integrity of *cag*-PAI seems to be more relevant than the presence of the gene individually. It is believed that only the presence of *cagA* is not enough to the pathogenicity of the bacteria, but the set of genes which form an efficient T4SS is.

5. Genes that Codify Outer Membrane Proteins (OMPs)

Approximately 4% of the *H. pylori* genome encodes a diverse repertoire of OMPs that have been grouped into five major families [62]. The *Helicobacter* outer membrane protein (Hop) family is the largest and includes adhesins such as BabA (HopS), SabA (HopP), OipA (HopH) and HopQ. Adherence of *H. pylori* to the gastric mucosa plays important roles in the initial colonization and long-term persistence on the gastric mucosa as well as in the intensity of the resulting inflammatory response [63].

5.1 *babA*

Blood group antigen binding adhesin (*babA*) is a 78-kDa outer membrane protein encoded by the *babA2* gene, which binds the fucosylated Lewis^b antigen (Le^b) on the surfaces of gastric epithelial cells and is the best described *H. pylori* OMP [64,65]. Although three *bab* alleles have been identified (*babA1*, *babA2*, and *babB*), only the *babA2* gene product is functionally active [66]. Analyses of binding characteristics of *H. pylori* strains worldwide suggest that the BabA adhesin has evolved in response to host mucosal glycosylation patterns to permit *H. pylori* to adapt to its host and to maintain persistent colonization [67].

Some researchers have demonstrated that *babA2* is associated with increased risk of duodenal ulcer disease and adenocarcinoma, and when found in conjunction with *cagA* and *vacA* s1 alleles, it leads to an even greater risk of developing more severe diseases [68,69]. BabA binding to Le^b is also important for the induction of DNA double-strand breaks in host

cell lines and may promote cancer-associated gene mutations [70]. Adherence via BabA also enhances the ability of the type IV secretion apparatus to contact host cells, leading to a stronger inflammatory response [71]. Therefore, BabA is important not only for *H. pylori* to adhere to the stomach surface but also to anchor the bacterial secretion system to the host cell surface so that bacterial factors can be effectively injected into the host cell cytosol.

5.2 *sabA*

The sialic acid-binding adhesin, SabA or HopP or OMP17 (~70 KDa) is the second best characterized adhesin of *H. pylori*, which binds sialyl-Lewis antigens that are expressed on inflamed gastric tissue [64,72]. *H. pylori* modulates the expression of the SabA ligand, the sialyl-dimeric-Le^x, in human gastric cell lines via the induction of a specific glycosyltransferase, β 3 GlcNAc T5 (β 3GnT5), involved in the biosynthesis of Lewis antigens, thereby strengthening the epithelial attachment necessary to achieve successful colonization [73].

The expression *sabA* gene is regulated at transcriptional level by some mechanisms. Indeed, the dinucleotide CT repeats present in the 5' coding region of *sabA* regulate their expression by phase variation through a slipped strand repair mechanism (SSM) [74,75] and the *sabA* promoter region modulates its transcriptional activity through a variable homopolymeric thymidine tract [76]. The frequent “on/off” switch of SabA expression suggests that SabA expression can rapidly respond to changes exerted by the gastric niche. SabA positive status was inversely related to the ability of the stomach to secrete acid, suggesting that its expression may be regulated by changes in acid secretion and/or in antigens expressed by the atrophic mucosa [67,75].

SabA-positive status was associated with the development of intestinal metaplasia, gastric atrophy and gastric cancer [65,68]. After *H. pylori* induced gastritis, neutrophils and monocytes infiltrated into the gastric mucosa. SabA of non-opsonized *H. pylori* strains specifically binds to neutrophils through sialylated carbohydrates. Consequently, the stimulated neutrophils produce reactive oxygen species causing oxidative damage of the gastric epithelium, showing that SabA is a virulence factor [72,77].

5.3 *oipA*

OipA (~34 kDa) was identified in 2000. It is one of the outer membrane proteins. It functions in adhesion and it is located approximately 100 kbp from the *cag*-PAI on the *H. pylori* chromosome [58,78,79]. The functional status of OipA is regulated by slipped strand

mispairing that is determined by the number of CT dinucleotide repeats in the 5' region of the gene (switch 'on' and OipA is functional; switch "off" and OipA is nonfunctional) [80].

H. pylori with the *oipA* functional status "on" has been associated with other virulence factors, as *cag* PAI, *vacA*, *iceA* and *babA* [65,68,81,82]. OipA "on"-status is significantly associated with more severe gastric diseases (duodenal ulcer and gastric cancer), high *H. pylori* density, and severe neutrophil infiltration and high mucosal IL-8 levels [83]. Researchers have demonstrated that OipA can induce inflammation and actin dynamics through the phosphorylation of multiple signaling pathways that usually interact with *cag*-PAI (CagA)-related pathways [84, 85]. *H. pylori*-related inflammatory signaling related to gastric carcinogenesis is regulated by the activation of the phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/Akt signaling pathway [86]. OipA regulates IL-8 secretion through PI3K/Akt and this regulation is dependent on forkhead transcription factors of class O (FoxO) 1/3a inactivation [87]. Inactivation of *oipA* also results in a decreased level of nuclear β -catenin *in vitro* and a reduced incidence of cancer in gerbils, indicative of the importance of this OMP in the virulence of *H. pylori* [10].

5.4 *hopQ*

The *hopQ* gene encodes HopQ, an outer membrane protein that attenuates the adherence of *H. pylori* strains to gastric epithelial cells and thus may play an important role in the initial colonization and long-term persistence of the bacterium in the stomach [88]. The *hopQ* gene is present in two forms: types I and II. Some studies have reported an association between the presence of type I *hopQ* alleles and other *H. pylori* virulence markers, including type s1 *vacA* alleles [89-92]. In Western patients, the inflammatory cell infiltration and atrophy scores were significantly higher in patients with *hopQ* type I strains than those with type II [63]. Only one study so far showed that the *hopQ*II genotype is frequently present in *H. pylori* strains isolated from gastric cancer patients [93].

A study conducted an analysis of 3000 *H. pylori* mutants and revealed that the *hopQ* gene affected NF- κ B nuclear translocation. HopQ was essential for CagA translocation and for CagA-mediated host cell responses such as formation of the hummingbird phenotype and cell scattering. It also showed that the deletion of *hopQ* reduced T4SS-dependent activation of NF- κ B, induction of MAPK signaling and secretion of interleukin 8 (IL-8) in the host cells, but it did not affect motility or the quantity of bacteria attached to host cells. Therefore, HopQ exhibits adhesive properties and could be useful to conferring contacts of *H. pylori*'s T4SS to the host cell surface. [94].

Although BabA and SabA are the most prominent adhesins described so far, it seems probable that additional adhesins described in this review are involved in the colonization process. The adhesins are important not only for *H. pylori* to adhere to the stomach surface but also to anchor the bacterial secretion system and consequently the delivery of virulence factors to host epithelial cells.

6. Motility genes

Flagella conferred the motility of *H. pylori* that possesses a unipolar bundle of 3 to 5 flagella, which are composed of three structural elements: the basal body, the hook, and the filament [67,95,96]. The filament acts as a propeller when rotated at its base and it is made of two flagellins: the major, FlaA, and the minor, FlaB [97]. Mutation of *flaA* results in flagellar truncation and decreased motility *in vitro* [98]. *In vivo*, FlaA and other proteins necessary for flagellar assembly are essential for persistent infection in rodent and gnotobiotic piglet models [99-101].

H. pylori flagellin filaments are post-translationally modified by glycosylation with a nine-carbon pseudaminic acid (Pse) sugar derivative that resembles sialic acid, which is typically found on mammalian cell surfaces [102]. The FlaA protein is modified with a total of seven *O*-linked pseudaminic acid (Pse5Ac7Ac) residues, while FlaB is modified with ten *O*-linked Pse5Ac7Ac residues. Deletion of genes responsible for the glycosylation process leads to loss of late flagellar structures (hook and filaments) and loss of motility [103,104]. Motility is essential for successful gastric colonization and may contribute to pathogenesis.

7. *iceA*

Another virulence gene designated *iceA* (induced by contact with epithelium) has been recently described. Some studies showed that *iceA* has two main allelic variants, *iceA1* and *iceA2*, but the function of these variants is not clear yet [105,106]. *iceA1* demonstrated sequence homology with a gene from *Neisseria lactamica*, *nlaIIIIR*, which encodes a CTAG-specific restriction endonuclease [107]. On the other hand, *iceA2* has no homology to known genes and the function of the *iceA2* product remains unclear. The expression of *iceA1* is upregulated on contact between *H. pylori* and human epithelial cells, and the *iceA1* genotype was linked with enhanced mucosal interleukin (IL)-8 expression and acute antral inflammation [61].

Some reports have associated the relationship between the *iceA* allelic types and clinical outcomes [108]. The *iceA1* variant was associated with peptic ulcer disease, while *iceA2* variants with gastritis [109,110]. However, this association varies among populations. In Brazil, for instance, *iceA1* allele is associated with gastritis [111]. Additionally, it was described in Cuba, Europe, Saudi Arabia, and Turkey that the *iceA2* allele is associated with non-peptic ulcer dyspepsia (NUD) as well as strains with more virulent types [109,112]. Thus, the *iceA* gene may be considered a useful marker in patients with gastroduodenal diseases.

Conclusion

The relationship between *H. pylori* and humans date back to 50,000 years ago and during this time these two species have co-evolved. During this evolution, there was a major change in the genome of this bacterium with the horizontal acquisition of the *cag* pathogenicity island, which seems to have been important in the colonization, although it was responsible for the development of gastric diseases. In spite of the fact that only the *cagA* gene is well defined as an *H. pylori* pathogenicity marker, over the course of our review it was observed that other genes are also essential components for a functional *cag* T4SS. Furthermore, the fact that some strain with an incomplete pathogenicity island in a more severe gastric lesion was observed, suggesting that there must be genes with overlapping function ensuring the functioning of the secretory apparatus. Besides, the product of some of these genes could be capable of stimulating an exacerbated inflammatory response which is characteristic of gastric lesions. Although there are several genes associated with the adhesion of the bacteria, the *babA* gene stands for a successful colonization.

References

1. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9:1-13 [PMID: 2406141]
2. Wen S, Moss SF. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 2009; 282: 1–8 [PMID: 19111390 DOI: 10.1016/j.canlet.2008.11.016]
3. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311–1315 [PMID: 6145023]
4. Siqueira JS, Lima PSS, Barreto AS, Quintans Jr L. Aspectos gerais nas infecções por *Helicobacter pylori*: Revisão. *Rev Bras Anal Clin* 2007; 39: 9-13
5. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 2007; 445: 915–918 [PMID: 17287725]
6. IARC, International Agency for Research on Cancer. Evaluation of carcinogenic risk to humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr. 1994; 61: 1-241.
7. Peek RM Jr, Crabtree JE. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J Pathol* 2006; 208: 233–248 [PMID: 16362989]
8. Oluwasola AO. Genetic Determinants and Clinico-Pathological Outcomes of *Helicobacter pylori* Infection. *Ann Ibd Pg Med* 2014; 12: 22-30 [PMID: 25332697]
9. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, Aburatani H, Akiyama T, Peek RM Jr, Azuma T, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA interacts with Ecadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* 2007; 26: 4617–4626 [PMID: 17237808]
10. Franco AT, Johnston E, Krishna U, Yamaoka Y, Israel DA, Nagy TA, Wroblewski LE, Piazeulo MB, Correa P, Peek RM Jr. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res* 2008; 68: 379–387 [PMID: 18199531 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0824]
11. Olbermann P, Josenhans C, Moodley Y, Uhr M, Stamer C, Vauterin M, Suerbaum S, Achtman M, Linz B. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *PLoS Genet* 2010; 6: e1001069. [PMID: 20808891 DOI: 10.1371/journal.pgen.1001069]
12. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 629-641 [PMID: 20938460 DOI: 10.1038/nrgastro.2010.154]

13. Argent RH, Hale JL, El-Omar EM, Atherton JC. Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *J Med Microbiol* 2008; 57: 1062–1067 [PMID: 18719174 DOI: 10.1099/jmm.0.2008/001818-0]
14. Backert S, Tegtmeyer N, Selbach M. The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis. *Helicobacter* 2010; 15: 163-176 [PMID: 20557357 DOI: 10.1111/j.1523-5378.2010.00759.x]
15. Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 320–332 [PMID: 15759043]
16. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 449–490 [PMID: 16847081]
17. Atherton J, Cao P, Peek RJ, Tummuru M, Blaser M, Cover T. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771–17777 [PMID: 7629077]
18. Sugimoto M, Zali MR, Yamaoka Y. The association of *vacA* genotypes and *Helicobacter pylori* related gastroduodenal diseases in the Middle East. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 1227–1236 [PMID: 19551413 DOI: 10.1007/s10096-009-0772-y]
19. Sugimoto M, Yamaoka Y. The association of *vacA* genotype and *Helicobacter pylori*-related disease in Latin American and African populations. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 835–842 [PMID: 19392900 DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02769.x]
20. Yamaoka Y, Orito E, Mizokami M, Gutierrez O, Saitou N, Kodama T, Osato MS, Kim JG, Ramirez FC, Mahachai V, Graham DY. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Lett* 2002; 517: 180–184 [PMID: 12062433]
21. Uchida T, Nguyen LT, Takayama A, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Matsuhisa T, Trinh TD, Ta L, Ho DQ, Hoang HH, Kishida T, Fujioka T, Moriyama M, Yamaoka Y. Analysis of virulence factors of *Helicobacter pylori* isolated from a Vietnamese population. *BMC Microbiol* 2009; 9: 175 [PMID: 19698173 DOI: 10.1186/1471-2180-9-175]
22. do Carmo APS, Rabenhorst SHB. Importance of *vacAs1* gene in gastric cancer patients infected with *cagA*-negative *Helicobacter pylori*. *APMIS* 2011; 119: 485–486 [PMID: 21635556 DOI: 10.1111/j.1600-0463.2011.02739.x]
23. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14648-14653 [PMID: 8962108]

24. Terradot L, Waksman G. Architecture of the *Helicobacter pylori* Cag-type IV secretion system. FEBS Journal 2011; 278:1213–1222 [PMID: 21352491 DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08037.x]
25. Sahara S, Sugimoto M, Vilaichone RK, Mahachai V, Miyajima H, Furuta T, Yamaoka Y. Role of *Helicobacter pylori* cagA EPIYA motif and vacA genotypes for the development of gastrointestinal diseases in Southeast Asian countries: a meta-analysis. BMC Infect Dis 2012; 12: 223 [PMID 22994150 DOI: 10.1186/1471-2334-12-223]
26. Nomura AMY, Perez-Perez GI, Lee J, Stemmermann G, Blaser MJ. Relation between *Helicobacter pylori* cagA status and risk of peptic ulcer disease. Am J Epidemiol 2002; 155: 1054–1059 [PMID: 12034584]
27. Matos JI, de Sousa HA, Marcos-Pinto R, Dinis-Ribeiro M. *Helicobacter pylori* CagA and VacA genotypes and gastric phenotype: a meta-analysis. Eur J Gastroenterol Hepatol 2013; 25: 1431-1441 [PMID: 23929249 DOI: 10.1097/MEG.0b013e328364b53e]
28. Audibert C, Burucoa C, Janvier B, Fauchere JL. Implication of the Structure of the *Helicobacter pylori* cag Pathogenicity Island in Induction of Interleukin-8 Secretion. Infect Immun 2001; 69: 1625–1629 [PMID: 11179336]
29. Owen RJ, Peters TM, Varea R, Teare EL, Saverymuttu S. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori* in England: prevalence of cag pathogenicity island markers and IS605 presence in relation to patient age and severity of gastric disease. FEMS Immunol Med Microbiol 2001; 30: 65-71 [PMID: 11172993]
30. Kauser F, Khan AA, Hussain MA, Carroll IM, Ahmad N, Tiwari S, Shouche Y, Das B, Alam M, Ali SM, Habibullah CM, Sierra R, Megraud F, Sechi LA, Ahmed N. The cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* is disrupted in the majority of patient isolates from different human populations. J Clin Microbiol 2004; 42: 5302-5308 [PMID: 15528729]
31. Talarico S, Gold BD, Fero J, Thompson DT, Guarner J, Czinn S, Salama NR. Pediatric *Helicobacter pylori* isolates display distinct gene coding capacities and virulence gene marker profiles. J Clin Microbiol 2009; 47: 1680-1688. [PMID: 19386830 DOI: 10.1128/JCM.00273-09]
32. Johnson EM, Gaddy JA, Voss BJ, Hennig EE, Cover TL. Genes required for assembly of pili associated with *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. Infect Immun 2014; 82: 3457-3470 [PMID: 24891108 DOI: 10.1128/IAI.01640-14]
33. Sozzi M, Tomasini ML, Vindigni C, Zanussi S, Tedeschi R, Basaglia G, Figura N, De Paoli P. Heterogeneity of cag genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. J Lab Clin Med 2005; 146: 262–270 [PMID: 16242525]
34. Lima VP, Silva-Fernandes IJF, Santos KKS, Rabenhorst SHB. Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (vacA, cagA, cagE and virB11) in gastric cancer in

- Brazilian's patients: an association with histopathological parameters. *Cancer Epidemiol* 2011; 35: e32-e37 [PMID: 21470935 DOI: 10.1016/j.canep.2011.02.017]
35. Kutter S, Buhrdorf R, Haas J, Schneider-Brachert W, Haas R, Fischer W. Protein Subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag Type IV Secretion System Revealed by Localization and Interaction Studies. *J Bacteriol* 2008; 190: 2161–2171 [PMID: 18178731 DOI: 10.1128/JB.01341-07]
 36. Chomvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripa B, Tor-Udom S, Vilaichone RK. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int J Infect Dis* 2008; 12: 30-36 [PMID: 17548220]
 37. Ramis IB, Vianna JS, Silva Junior LV, Von Groll A, Silva PE. *cagE* as a biomarker of the pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *ver Soc Bras Med Trop* 2013; 46: 185-189 [PMID:23740068 DOI: 10.1590/0037-8682-0054-2012]
 38. de Negreiros-Bessa P, Barbosa F, do Carmo A, Furtado G, Barroso F, Rabenhorst S. Presence of the Genes *cagA*, *cagE*, *virB11* and Allelic Variation of *vacA* of *Helicobacter pylori* Are Associated with the Activity of Gastritis. *Open J Gastroenterol* 2014; 4: 347-355 [DOI: 10.4236/ojgas.2014.411049]
 39. Lima VP, Lima MAP, Ferreira MVP, Barros MAP, Rabenhorst SHB. The relationship between *Helicobacter pylori* genes *cagE* and *virB11* and gastric cancer. *Int J Infect Dis* 2010; 14: e613–e617 [PMID: 20106696 DOI: 10.1016/j.ijid.2009.09.006]
 40. Mattar R, Marques SB, Monteiro MS, dos Santos AF, Iriya K, Carrilho FJ. *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. *J Med Microbiol* 2007; 56: 9–14 [PMID: 17172510]
 41. Fischer W, Püls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* 2001; 42: 1337–1348 [PMID: 11886563]
 42. Rohde M, Püls J, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R. A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori cag* type IV secretion system. *Mol Microbiol* 2003; 49: 219-234 [PMID: 12823823]
 43. Tanaka J, Suzuki T, Mimuro H, Sasakawa C. Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2003; 5: 395- 404 [PMID: 12780777]
 44. Ding H, Zeng H, Huang L, Dong Y, Duan Y, Mao X, Guo G, Zou Q. *Helicobacter pylori* Chaperone-Like Protein CagT Plays an Essential Role in the Translocation of CagA into Host Cells. *J Microbiol Biotechnol* 2012; 22: 1343–1349 [PMID: 23075784]

45. Lai CH, Perng CL, Lan KH, Lin HJ. Association of IS605 and *cag*-PAI of *Helicobacter pylori* Isolated from Patients with Gastrointestinal Diseases in Taiwan. *Gastroenterol Res Pract* 2013; 2013: 356217 [PMID: 23509448 DOI: 10.1155/2013/356217]
46. Ikenoue T, Maeda S, Ogura K, Akanuma M, Mitsuno Y, Imai Y, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* pathogenicity island. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 181-186 [PMID: 11139216]
47. Kauser F, Hussain MA, Ahmed I, Srinivas S, Devi SM, Majeed AA, Rao KR, Khan AA, Sechi LA, Ahmed N. Comparative genomics of *Helicobacter pylori* isolates recovered from ulcer disease patients in England. *BMC Microbiol* 2005; 5: 32-40 [PMID: 15916705]
48. Tiwari SK, Khan AA, Ahmed KS, Ali M, Habeeb A, Kauser F, et al. PCR based analysis of the *cag*-PAI of *Helicobacter pylori* from saliva: an approach for rapid molecular genotyping in correlation with disease status. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1560-1568 [PMID: 21896770 DOI: 10.1073/pnas.1100959108]
49. Pacheco AR, Proença-Módena JL, Sales AI, Fukuhara Y, da Silveira WD, Pimenta-Módena JL, de Oliveira RB, Brocchi M. Involvement of the *Helicobacter pylori* plasticity region and *cag* pathogenicity island genes in the development of gastroduodenal diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 1053–1059 [PMID: 18560912 DOI: 10.1007/s10096-008-0549-8]
50. Roesler BM. Detection and analysis of different genotypes of *Helicobacter pylori* strains obtained from patients with early and advanced distal type intestinal gastric adenocarcinoma. In: <<http://www.reposip.unicamp.br/xmlui/handle/REPOSIP/46567>>. Accessed on: 19 April 2015.
51. Hsu PI, Hwang IR, Cittelly D, Lai KH, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Kim JG, Osato MS, Graham DY, Yamaoka Y. Clinical Presentation in Relation to Diversity Within the *Helicobacter pylori cag* Pathogenicity Island. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2231-2238 [PMID: 12358238]
52. Glocker E, Lange C, Covacci A, Bereswill S, Kist M, Pahl HL. Proteins Encoded by the *cag* Pathogenicity Island of *Helicobacter pylori* are Required for NF- κ B Activation. *Infect Immun* 1998; 96: 2346–2348 [PMID: 9573128]
53. Smolka AJ, Backert S. How *Helicobacter pylori* infection controls gastric acid secretion. *J Gastroenterol* 2012; 47: 609–618 [PMID: 22565637 DOI: 10.1007/s00535-012-0592-1]
54. Saha A, Hammond CE, Beeson C, Peek RM Jr, Smolka AJ. *Helicobacter pylori* represses proton pump expression and inhibits acid secretion in human gastric mucosa. *Gut* 2010; 59: 874-881 [PMID: 20581234 DOI: 10.1136/gut.2009.194795]
55. Ling F, Wang X, Dai D, Yu M, Chen C, Qian J, Liu C, Zhang Y, Ding J, Guan XW, Shao S. The *Helicobacter pylori* protein CagM is located in the transmembrane

- channel that is required for CagA translocation. *Curr Microbiol* 2013; 67: 531-536 [PMID: 23736225 DOI: 10.1007/s00284-013-0402-x]
56. Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA. Conservation of the *cag* pathogenicity island is associated with *vacA* alleles and gastroduodenal disease in South African *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* 2001; 49: 11–17 [PMID: 11413104]
 57. Wang MY, Chen C, Gao XZ, Li J, Yue J, Ling F, Wang XC, Shao SH. Distribution of *Helicobacter pylori* virulence markers in patients with gastroduodenal diseases in a region at high risk of gastric cancer. *Microb Pathog* 2013; 59-60: 13-18 [PMID: 23583809 DOI: 10.1016/j.micpath.2013.04.001]
 58. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539–547 [PMID: 9252185]
 59. Mizushima T, Sugiyama T, Kobayashi T, Komatsu Y, Ishizuka J, Kato M, Asaka M. Decreased Adherence of *cagG*-Deleted *Helicobacter pylori* to Gastric Epithelial Cells in Japanese Clinical Isolates. *Helicobacter* 2002; 7: 22-29 [PMID: 1188647]
 60. Saito H, Yamaoka Y, Ishizone S, Maruta F, Sugiyama A, Graham DY, Yamauchi K, Ota H, Miyagawa S. Roles of *virD4* and *cagG* genes in the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* using a Mongolian gerbil model. *Gut* 2005; 54: 584–590 [PMID: 15831899]
 61. Xu C, Li ZS, Tu ZX, Xu GM, Gong YF, Man XH. Distribution of *cagG* gene in *Helicobacter pylori* isolates from Chinese patients with different gastroduodenal diseases and its clinical and pathological significance. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2258-2260 [PMID: 14562388]
 62. Alm RA, Bina J, Andrews BM, Doig P, Hancock REW, Trust TJ. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: Analysis of the outer membrane protein families. *Infect Immun* 2000; 68: 4155–4168 [PMID: 10858232]
 63. Ohno T, Sugimoto M, Nagashima A, Ogiwara H, Vilaichone RK, Mahachai V, Graham DY, Yamaoka Y. Relationship between *Helicobacter pylori* hopQ genotype and clinical outcome in Asian and Western populations. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 462-468. [PMID: 19226380 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05762.x.]
 64. Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 1993; 262: 1892–1895 [PMID: 8018146]
 65. Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Borén T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood

- group antigens revealed by retagging. *Science* 1998; 279: 373–377 [PMID: 9430586]
66. Pride DT, Meinersmann RJ, Blaser MJ. Allelic variation within *Helicobacter pylori* *babA* and *babB*. *Infect Immun* 2001; 69: 1160–1171 [PMID: 11160014]
 67. Wroblewski LE, Peek RM Jr, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 713-739 [PMID: 20930071 DOI: 10.1128/CMR.00011-10]
 68. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Borén T, Rad R, Schepp W, Miehle S, Classen M, Prinz C. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12778–12783 [PMID: 10535999]
 69. Torres LE, Melián K, Moreno A, Alonso J, Sabatier CA, Hernandez M, Bermúdez L, Rodríguez BL. Prevalence of *vacA*, *cagA* and *babA2* genes in Cuban *Helicobacter pylori* isolates. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 204–210 [PMID: 19132771]
 70. Toller IM, Neelsen KJ, Steger M, Hartung ML, Hottiger MO, Stucki M, Kalali B, Gerhard M, Sartori AA, Lopes M, Müller A. Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 14944-14949 [PMID: 21896770 DOI: 10.1073/pnas.1100959108]
 71. Ishijima N, Suzuki M, Ashida H, Ichikawa Y, Kanegae Y, Saito I, Borén T, Haas R, Sasakawa C, Mimuro H. BabA- mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *J Biol Chem* 2011; 286: 25256-25264 [PMID: 21596743 DOI: 10.1074/jbc.M111.233601]
 72. Oleastro M, Ménard A. The Role of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis. *Biology* 2013; 2: 1110-1134 [PMID: 24833057 DOI: 10.3390/biology2031110]
 73. Marcos NT, Magalhaes A, Ferreira B, Oliveira MJ, Carvalho AS, Mendes N, Gilmartin T, Head SR, Figueiredo C, David L, Santos-Silva F, Reis CA. *Helicobacter pylori* induces beta3GnT5 in human gastric cell lines, modulating expression of the SabA ligand sialyl-Lewis x. *J Clin Invest* 2008; 118: 2325–2336 [PMID: 18483624 DOI: 10.1172/JCI34324]
 74. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Imamura S, Ohno T, Sawai N, Ishimaru A, Imanishi J, Graham DY. *Helicobacter pylori* infection in mice: Role of outer membrane proteins in colonization and inflammation. *Gastroenterology* 2002; 123: 1992–2004 [PMID: 12454856]
 75. Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O, El-Zimaity HMT, Reddy R, Arnqvist A, Graham DY. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut* 2006; 55: 775–781 [PMID: 16322107]
 76. Kao CY, Sheu BS, Sheu SM, Yang HB, Chang WL, Cheng HC, Wu JJ. Higher motility enhances bacterial density and inflammatory response in dyspeptic patients infected with *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2012; 17: 411–416 [PMID: 23066970]

DOI: 10.1111/j.1523-5378.2012.00974.x]

77. Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergström J, Borén T, Danielsson D, Teneberg S. The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem* 2005; 280: 15390–15397 [PMD: 15689619]
78. Peck B, Ortkamp M, Diehl KD, Hundt E, Knapp B. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 3325-3333[PMID: 10454640]
79. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7533–7538 [PMCID: 16580 DOI: 10.1073/pnas.130079797]
80. Saunders NJ, Peden JF, Hood DW, Moxon ER. Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome. *Mol Microbiol* 1998; 27: 1091–1098 [PMID: 9570395]
81. Ando T, Peek RM, Pride D, Levine SM, Takata T, Lee YC, Kusugami K, van der Ende A, Kuipers AJ, Kusters JG, Blaser MJ. Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with *cagA* status. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 239–246 [PMID: 11773122]
82. Yamaoka Y, Kikuchi S, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS, Graham DY. Importance of *Helicobacter pylori oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology* 2002; 123: 414–424 [PMID: 12145793]
83. Kudo T, Nurgalieva ZZ, Conner ME, Crawford S, Odenbreit S, Haas R, Graham DY, Yamaoka Y. Correlation between *Helicobacter pylori* OipA protein expression and *oipA* gene switch status. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 2279–2281 [PMID: 15131212]
84. Lu H, Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence factors: facts and fantasies. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 653–659 [PMID: 16220040]
85. Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. OipA plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal re-organization. *Cell Microbiol* 2008; 10: 1008–1020 [PMID: 18067607]
86. Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* activate epidermal growth factor receptor- and phosphatidylinositol 3-OH kinase-dependent Akt and glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation. *Cell Microbiol* 2009; 11: 70–82 [PMID: 18782353 DOI: 10.1111/j.1462-5822.2008.01237.x]
87. Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori*-associated regulation of forkhead transcription factors FoxO1/3a in human gastric cells. *Helicobacter* 2012; 17:193–202 [PMID: 22515357 DOI: 10.1111/j.1523-5378.2012.00939.x]
88. Loh JT, Torres VJ, Algood HM, McClain MS, Cover TL. *Helicobacter pylori* HopQ outer membrane protein attenuates bacterial adherence to gastric epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 289: 53–58 [PMID: 19065710]

89. Cao P, Cover TL. Two different families of *hopQ* alleles in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4504–4511 [PMID: 12454143]
90. Cao P, Lee KJ, Blaser MJ, Cover TL. Analysis of *hopQ* alleles in East Asian and Western strains of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 251: 37–43 [PMID: 16102915]
91. Oleastro M, Santos A, Cordeiro R, Nunes B, Megraud F, Menard A. Clinical relevance and diversity of two homologous genes encoding glycosyltransferases in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2885–2891. [PMID: 20554820 DOI: 10.1128/JCM.00401-10]
92. Sicinschi LA, Correa P, Bravo LE, Peek RM Jr, Wilson KT, Loh JT, Yopez MC, Gold BD, Thompson DT, Cover TL, Schneider BG. Non-invasive genotyping of *Helicobacter pylori* *cagA*, *vacA*, and *hopQ* from asymptomatic children. *Helicobacter* 2012; 17: 96-106[PMID: 22404439 DOI: 10.1111/j.1523-5378.2011.00919.x]
93. Abadi ATB, Mobarez AM. High Prevalence of *Helicobacter pylori* *hopQ* II Genotype Isolated from Iranian Patients with Gastroduodenal Disorders. *J Pathog* 2014; 2014: 842469 [PMID: 24672729 DOI: 10.1155/2014/842469]
94. Belogolova E, Bauer B, Pompaiah M, Asakura H, Brinkman V, Ertl C, Bartfeld S, Nechitaylo TY, Haas R, Machuy N, Salama N, Churin Y, Meyer TF. *Helicobacter pylori* outer membrane protein HopQ identified as a novel T4SS-associated virulence factor. *Cell Microbiol* 2013; 15: 1896-1912 [PMID: 23782461 DOI: 10.1111/cmi.12158]
95. Geis G, Lying H, Suerbaum S, Mai U, Opferkuch W. Ultrastructure and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagella. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 436–441 [PMID: 2715319]
96. O'Toole PW, Lane MC, Porwollik S. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect* 2000; 2: 1207-1214.[PMID:11008110]
97. Blair DF. Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Lett* 2003; 545: 86-95 [PMID: 12788496]
98. Josenhans C, Labigne A, Suerbaum S. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol* 1995; 177: 3010–3020 [PMID: 7768796]
99. Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* 1996; 64: 2445–2448 [PMID: 8698465]
100. Kim JS, Chang JH, Chung SI, Yum JS. Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* *fliD* gene, an essential factor in flagellar structure and motility. *J. Bacteriol* 1999; 181: 6969–6976 [PMID: 10559162]

101. Kavermann H, Burns BP, Angermuller K, Odenbreit S, Fischer W, Melchers K, Haas R. Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J Exp Med* 2003; 197: 813–822 [PMID: 12668646]
102. Asakura H, Churin Y, Bauer B, Boettcher JP, Bartfeld S, Hashii N, Kawasaki N, Mollenkopf HJ, Jungblut PR, Brinkmann V, Meyer TF. *Helicobacter pylori* HP0518 affects flagellin glycosylation to alter bacterial motility. *Mol Microbiol* 2010; 78: 1130-1144 [PMID: 21091500 DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07393.x]
103. Josenhans C, Vossebein L, Friedrich S, Suerbaum S. The neuA/flmD gene cluster of *Helicobacter pylori* is involved in flagellar biosynthesis and flagellin glycosylation. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 210: 165–172 [PMID: 12044670]
104. Schirm M, Soo EC, Aubry AJ, Austin J, Thibault P, Logan SM. Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 2003; 48: 1579–1592 [PMID:12791140]
105. Forsyth MH, Atherton JC, Blaser MJ, Cover TL. Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun* 1998; 66: 3088-3094 [PMID: 9632570]
106. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, Quint W. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115: 58–66 [PMID: 9649459]
107. Peek RM Jr, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ, Miller GG. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 531–544 [PMID: 9824536]
108. Shiota S, Suzuki, R, Yamaoka Y. The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*. *J Dig Dis* 2013; 14: 341–349 [PMID: 23452293 DOI: 10.1111/1751-2980.12054]
109. Amjad N, Osman HA, Razak NA, Kassian J, Din J, bin Abdullah N. Clinical significance of *Helicobacter pylori cagA* and *iceA* genotype status. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4443–4447 [PMID: 20845512]
110. Boyanova L, Yordanov D, Gergova G, Markovska R, Mitov I. Association of *iceA* and *babA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains with patient and strain characteristics. *Antonie van Leeuwenhoek* 2010; 98: 343–350 [PMID: 20454856 DOI: 10.1007/s10482-010-9448-y]
111. Gatti LL, Módena JL, Payão SL, Smith Mde A, Fukuhara Y, Módena JL, de Oliveira RB, Brocchi M. Prevalence of *Helicobacter pylori cagA*, *iceA* and *babA2* alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. *Acta Tropica* 2006; 100: 232-240 [PMID: 17181989]

112. Tanih NF, McMillan M, Naidoo N, Ndip LM, Weaver LT, Ndip RN. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA* and *iceA* genotypes in South African patients with upper gastrointestinal diseases. *Acta Trop* 2010; 116: 68-73 [PMID: 20529658 DOI: 10.1016/j.actatropica.2010.05.011]

1.3. Perguntas de Partida

Existe algum genótipo de *H. pylori* influenciando na determinação dos subtipos histológicos em relação a ilha de patogenicidade e genes de adesão?

A virulência de *H. pylori* associada a polimorfismos em genes de determinadas enzimas de reparo e de E-caderina estariam envolvidas no processo carcinogênico?

1.4. Hipóteses

- ↻ Existem genótipos específicos de *H. pylori* para cada um dos subtipos histológicos.
- ↻ Polimorfismos em genes das enzimas de reparo e de E-caderina associados à virulência de *H. pylori* contribuem para o desenvolvimento do câncer gástrico.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- ↻ Determinar a integridade da ilha de patogenicidade (*cag*-PAI), pela presença dos genes *cagA*, *cagE*, *cagG*, *cagM*, *cagT* e *virB11*, além das variações alélicas do gene *vacA* e das adesinas *hopQ* e *oipA* de *H. pylori* e associar com os aspectos histopatológicos dos tumores gástricos, com enzimas de reparo e E-caderina.

2.2 Específicos

- ↻ Detectar a presença de *H. pylori* no tumor gástrico;
- ↻ Detectar a presença dos genes *cagA*, *cagE*, *cagG*, *cagM*, *cagT*, *virB11*, *vacA*, *oipA* e *hopQ* nos tumores *H. pylori* positivos;
- ↻ Associar os perfis genotípicos de *H. pylori*, com os tumores gástricos e de acordo com o subtipos histológicos;
- ↻ Associar os perfis genotípicos da *H. pylori*, com estudo de risco com genes de enzimas de reparo *APE1* e *MLH1*, e E-caderina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Um total de 285 amostras de tumores gástricos foram obtidos a partir de pacientes submetidos a gastrectomias totais ou parciais nos hospitais: Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (SCMF), Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC) e Hospital Geral César Cals (HGCC), Hospital Geral de Fortaleza e Hospital Ophir Loyola (Belém – PA). As amostras de DNA do grupo controle do estudo de risco foram obtidas de sangue coletadas no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), Santa Casa de Misericórdia de Sobral e Centro de Hematologia e Hemoterapia do Pará (HEMOPA).

Os espécimes tumorais frescos foram coletados nos centros cirúrgicos dos respectivos hospitais, imediatamente após a gastrectomia, obedecendo às condições ideais de assepsia, de acordo com o protocolo de coleta. As amostras foram retiradas sem comprometimento da investigação histopatológica da rotina hospitalar e em seguida foram transportadas rapidamente em compartimento contendo gelo para o Laboratório de Genética Molecular – LABGEM do Departamento de Patologia e Medicina Legal – DPML, onde foram mantidas em freezer a temperatura de -80°C , até o momento da extração do DNA. De cada amostra congelada foram feitos cortes histológicos, em micrótomo criostato, com uma espessura de aproximadamente $5\mu\text{m}$, corados com Hematoxilina-Eosina e avaliados quanto ao percentual de células tumorais pelo patologista do grupo de pesquisa. Apenas aquelas amostras que continham um percentual maior ou igual a 80% de células tumorais foram dirigidas para a extração do DNA genômico.

3.2 Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Hospital Geral de Fortaleza, sob protocolo nº 071002/10, e pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará, sob protocolo nº 220/12 observando as normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde de acordo com as resoluções 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05. Foram incluídos neste estudo apenas aqueles indivíduos submetidos à ressecção cirúrgica, que após serem informados sobre a pesquisa, concordaram em participar dela, assinando espontaneamente o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.3 Coleta de Dados

Os dados epidemiológicos e clínico-patológicos foram obtidos no momento da entrevista com o paciente, bem como por meio da consulta de prontuários sendo registrados em fichas estruturadas. Os dados histopatológicos tais como subtipos tumorais, profundidade da invasão, acometimento de linfonodos e/ou metástase à distância e estadiamento, foram extraídos dos laudos patológicos, presentes nos respectivos prontuários.

3.4 Extração do DNA

As amostras tumorais foram submetidas à extração do DNA genômico de alto peso molecular, utilizando-se o método de extração com CTAB descrito por Foster e Twell (1996). Neste método, fragmentos de aproximadamente 0,5g foram macerados com auxílio de bastão de vidro esterilizado, em tubo tipo Falcon de 15mL e em seguida, adicionou-se o tampão de extração (2% CTAB; 1,4M de NaCl; 20mM de EDTA; 100mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,2% de 2-Mercaptoetanol); obedecendo-se proporção de 6mL de tampão de extração para cada 0,5g de tecido tumoral e incubado em banho-maria a 60°C por 16 horas com algumas inversões. Após a incubação, adicionou-se volume igual de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), para purificação, seguido de centrifugação a 2.000 rpm por 15 min. Em seguida, a fase superior foi transferida para tubo tipo Falcon estéril de 15mL e o DNA foi precipitado com 2/3 do volume de isopropanol à 100%, centrifugado a 2.000 rpm por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado com NaCl 1M, para liberação do complexo DNA-CTAB. Em seguida adicionou-se 2,5 volumes de etanol 100% gelado e centrifugado a 2000 rpm por 5 min. Em seguida foi lavado com etanol 70% e colocado para secar à 37°C. Depois de seco, o DNA foi ressuscitado em 400µl de água Milli-Q estéril com DEPC 0,1% e armazenado em freezer à -14°C. Para avaliar a qualidade do DNA, cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo e observado sob transluminador de luz ultravioleta; Paralelamente, o DNA foi quantificado usando um espectrofotômetro NanoDropTM 3300 (Wilmington, DE, USA). Já a extração de sangue foi realizada pelo método salting-out descrito por Miller (1988).

3.5 Genotipagem de *H. pylori*

A detecção da presença de *H. pylori* e de seus respectivos genes foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A tabela 2 mostra as especificações de cada reação. Em todas as reações foram usados como controle negativo, um mix de PCR sem amostra de DNA foi usado para certificar-se de que o produto final da PCR estava livre de contaminação. A presença de *H. pylori* nas amostras estudadas foi detectada pela presença da região interna, específica para *H. pylori*, do gene que codifica a proteína urease (*ureC*) (LAGE, et al., 1995). A mistura para PCR foi composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®; 0,4 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; 0,4 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 25μL. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata.

3.5.1 Presença e subtipos do gene *vacA* de *H. pylori*

vacA s1 e s2

Os subtipos s1 e s2 foram amplificados em uma mesma reação. A mistura para PCR foi composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM); 0,1% Tween 20; 1,25 U de Go Taq® Flexi DNA Polimerase (PROMEGA); 0,24 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; 0,48 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 12,5 μL. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata.

vacA m1 e m2

Os subtipos m1 e m2 foram amplificados individualmente. Para amplificação do subtipo m1 a mistura para PCR foi composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 0,1% de Tween 20, 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®; 0,2 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; 0,4 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 25μL.

Para a amplificação do subtipo m2, foi feita a mistura para PCR contendo tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM); 0,1% de Tween 20; 1,25 U de Go Taq® Flexi DNA Polimerase (PROMEGA); 0,25 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de

MgCl₂; 0,32 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 12,5 μL.

Os produtos gerados nessas reações foram visualizados em gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata.

3.5.2 Detecção do gene *cagA*

O gene *cagA* de *H. pylori* foi amplificado em uma mistura para PCR composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM); 0,1% Tween 20; 1,25 U de Go Taq[®] Flexi DNA Polimerase (PROMEGA); 0,24 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; 0,48 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 12,5 μL. Os produtos gerados foram visualizados em gel de poliacrilamidas a 6% corado com nitrato de prata.

3.5.3 Detecção do gene *cagE*

O gene *cagE* de *H. pylori* foi amplificado em uma mistura para PCR composta por Master Mix 1X, 0,1% Tween 20, 0,48 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 20 μL. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

3.5.4 Detecção do gene *virB11*

O gene *virB11* de *H. pylori* foi amplificado em uma mistura contendo 10 μl de Go Taq Master Mix, 0,5 mM de MgCl₂; 0,3 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 20 μL. Os produtos que foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

3.5.5 Detecção do gene *cagG*, *cagT*, *cagM* e *oipA*

Os genes *cagG*, *cagT* e *cagM* e *oipA* de *H. pylori* foram amplificados em uma mistura para PCR composta por Master Mix 1X, 0,5 μM de cada oligonucleotídeo

iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 20 µL. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

3.5.6 Detecção do gene *hopQI* e *hopQII*

As variações alélicas do gene *hopQ* foram amplificadas individualmente. Para amplificação de ambas variações a mistura para PCR foi composta por Master Mix 1X, 0,6 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 20 µL. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

3.6 Detecção dos Polimorfismos Genéticos do Hospedeiro

A presença de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) nos genes que codificam as enzimas de reparo, APE-1, MLH1 e E-caderina, foram detectados por meio da análise do DNA genômico, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), que é a PCR seguida de restrição enzimática. Os resultados da genotipagem foram regularmente confirmados por regenotipagem de aproximadamente 10% das amostras. Os produtos de PCR foram gerados utilizando em cada reação um volume total de 20 µL de PCR contendo MasterMix 1X (Promega Madison WI), 0,4 mM de de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídeo sob luz UV e foram digeridos com as endonucleases de restrição apropriadas. As enzimas de restrição e o tamanho do fragmento está descrita na Tabela 2. Os fragmentos visualizados em gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata.

Figura 9. Fluxograma de Material e Métodos

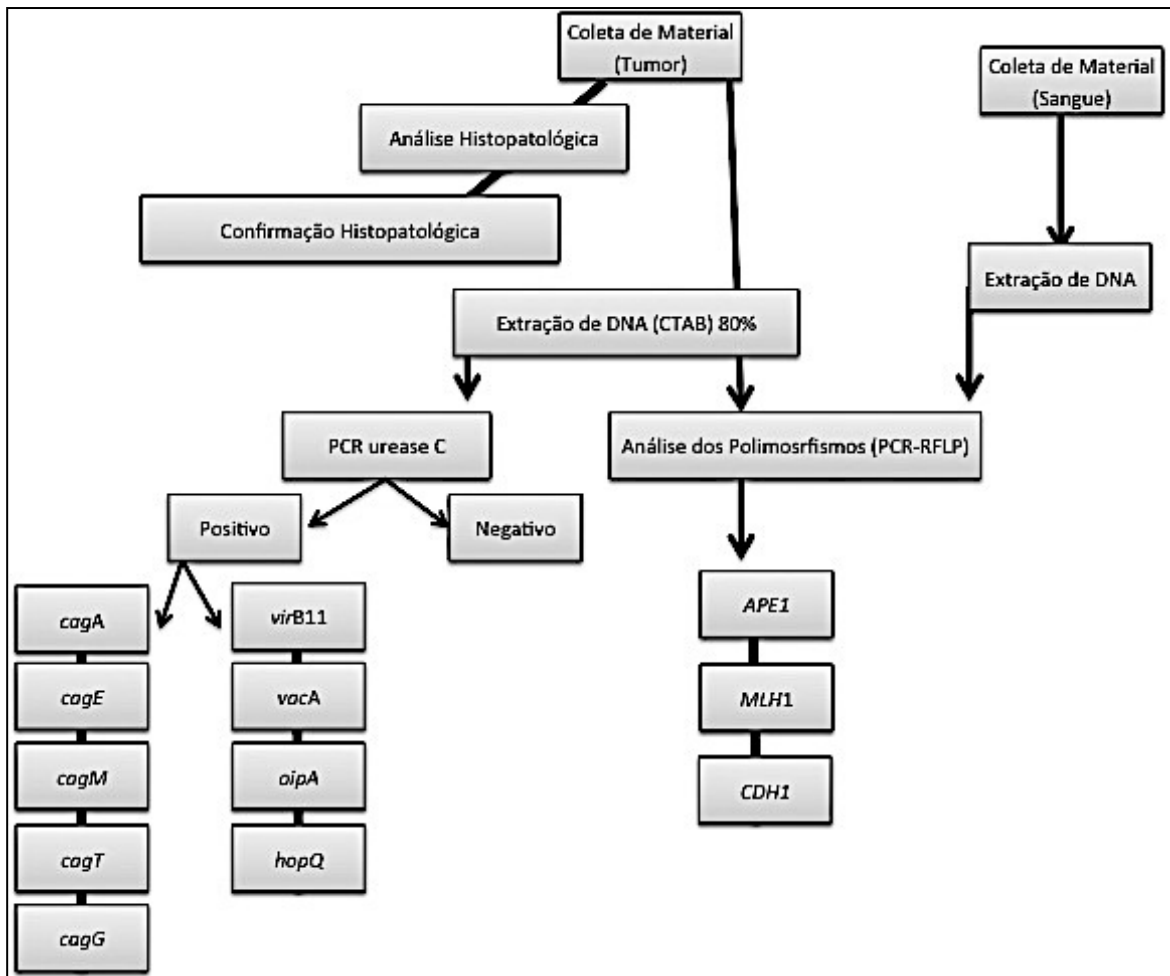


Tabela 2. Primers, temperatura de anelamento, tamanho dos produtos dos PCRs, enzimas de restrição e tamanhos dos fragmentos da restrição.

| Gene | Primer | Anelamento | Tamanho produto | Enzima de Restrição | Referências |
|----------------------------|--|------------|---------------------------------------|---------------------|------------------------|
| <i>ureC</i> | F- 5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' R- 5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3' | 55 °C | 294 bp | - | Lage AP et al., 1995 |
| <i>vacAs1/s2</i> | F- 5'-ATGGAAATACAACAACACAC-3' R- 5'-CTGCTGAATGCGCCAAAC-3' | 55 °C | 259/286 bp | - | Lima et al, 2011 |
| <i>m1</i> | F- 5'-GGTCAAAATGCGGTCATGG3' R- 5'-CCATTGGTACCTGTAGAAAC-3' | 55 °C | 290 bp | - | Lima et al, 2011 |
| <i>m2</i> | F- 5'-GGAGCCCCAGGAAACATTG-3' R- 5'-CATAACTAGCGCCTTGACAC-3' | 52 °C | 192 bp | - | Lima et al, 2011 |
| <i>cagA</i> | F- 5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3' R- 5'-TTAGAATAATCAACAACATAACGCCAT-3' | 56 °C | 297 bp | - | Lima et al, 2011 |
| <i>cagE</i> | F- 5'-TTGAAAACCTCAAGGATAGGATAGAGC-3' R- 5'-GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC-3' | 56 °C | 509 bp | - | Lima et al, 2011 |
| <i>virB11</i> | F- 5'-TTAAATCCTCTAAGGCATGCTAC-3' R- 5'-GATATAAGTCGTTTTACCGCTTC-3' | 49 °C | 491 bp | - | Lima et al, 2011 |
| <i>cagG</i> | F- 5'-GCCATGTTAACACCCCTAG-3' R- 5'-TTAATGCGCTAGAATAGTGC-3' | 52 °C | 497 bp | - | Hsu et al., 2002 |
| <i>cagM</i> | F-5'-ACAAATACAAAAAGAAAAGAGGC-3' R-5'-ATTTTCAACAAGTTAGAAAAGCC-3' | 52 °C | 587 bp | - | Hsu et al., 2002 |
| <i>cagT</i> | F-5'-TCTAAAAAGATTACGCTCATAGGCG-3' R-5'-CTTTGGCTTGATGTTCAAGTTGCC-3' | 52 °C | 490 bp | - | Hsu et al., 2002 |
| <i>hopQI</i> | F-5'-ACGAACGCGCAAAAACCTTA-3' R-5'-TTGCCAATTCTCATCGGTGTA-3' | 55 °C | 187 bp | - | Sicinschi et al., 2012 |
| <i>hopQII</i> | F-5'-ACAGCACCTCCAATCCAGAA-3' R-5'-AACCCACCGTGGATTTTAG-3' | 55 °C | 160 bp | - | Sicinschi et al., 2012 |
| <i>APE-1 2197 (T>G)</i> | F: 5'-CTGTTTCATTTCTATAGGCTA-3' R: 5'-AGGAACTTGCGAAAGGCTTC-3' | 48.5°C | T 164 bp G 144 bp e 20 bp | <i>Bfal</i> | Vodicka et al., 2007 |
| <i>MLH1 -93 (G>A)</i> | F-5'-AGTAGCCGCTTCAGGGA-3' R-5'-CTCGTCCAGCCGCCGAATAA-3 | 50°C | G125 e 34bp A259bp | <i>PvuII</i> | Chen et al., 2005 |
| <i>CDHI -160 (C>A)</i> | F- 5'-GCCCGACTTGCTCTCTAC-3' R- 5'-GGCCACAGCCAATCAGCA-3' | 61°C | C 446 bp A 368 e 68bp | <i>HincII</i> | Chien et al. (2011) |
| <i>CDHI -347 (G>GA)</i> | F- 5'-GCCCGACTTGCTCTCTAC-3' R- 5'-GGCCACAGCCAATCAGCA-3' | 61°C | G-263, 115 e 68 pb GA-331 e 115 pb | <i>BanII</i> | Chien et al. (2011) |

3.7 Análise Estatística

Os dados clínico-patológicos e os resultados das PCR's foram demonstrados através de gráficos e tabelas como auxílio dos programas computacionais Microsoft Office Excel[®] 2010 e Microsoft Office Word[®] 2010 (Microsoft[®], USA). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas estatísticos: Software Weka, EPINFO[®] versão 6.0 e SPSS[®] 12.0, realizando-se o Teste do χ^2 e Teste Exato de Fisher. Foram considerados estatisticamente significantes, valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Os resultados referentes a esta tese serão apresentados a seguir na forma de 2 artigos científicos.

Artigo 2

Impact of age and gender on Intestinal and Diffuse Gastric cancer risk related to polymorphisms in DNA repair enzymes and E-cadherin gene

Authors' names: Eliane dos Santos Pereira ^a, Isabelle Joyce de Lima Silva-Fernandes ^a, Débora Menezes da Costa ^a, Rommel Mario Rodriguez Burbano ^b, Silvia Helena Barem Rabenhorst ^a

Affiliations:

^a Department of Pathology and Forensic Medicine. Federal University of Ceará. Brazil.

^b Molecular Biology Laboratory, Institute of Biological Sciences

Corresponding Author:

Rabenhorst, SHB. Molecular Genetics Laboratory, Department of Pathology and Forensic Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará. Street Coronel Nunes de Melo, 1315 – Rodolfo Teófilo – Fortaleza/Ceará/Brazil. CEP 60430-270. E-mail: srabenhorst@yahoo.com.br. Telephone: +55 85 99945689 Fax: +55 85 32673840

Abstract

Intestinal and diffuse are two histological subtype of gastric carcinoma, with distinct epidemiology, carcinogenic pathways and clinic outcome. In spite of both are a disease more frequent in elderly population with higher occurrence in those over 50-55 years, the diffuse tumors is associated to younger and women individuals. Few polymorphisms of repair enzymes has been associated with the gastric cancer susceptibility. Thus, we evaluated the role of SNPs in DNA repair genes *APE1* 2197(T>G) and *MLH1* -93(G>A), as well as in *CDH1* at positions -160 (C>A) and -347 (G>GA) in gastric cancer risk, which have been less explored. This study included genotypic of 264 gastric cancer patients and 391 healthy controls matched by age and sex (1:1 or 1:2) from two different regions from Brazil: Ceará and Pará.. Analyzes were carried out considering the GC subtypes, age and gender. In intestinal subtype it was observed a protection associated to *APE1* 2197 (T>G) polymorphic allele for female patients aged <55 years old and *CDH1* -347 (G>GA) polymorphic allele for male aged \geq 55 years old. In diffuse tumors, in the <55 years old age group, the polymorphic allele of *MLH1* -93 (G>A) was associated to protection and the polymorphic allele of *APE1* 2197 (T>G) was associated with risk in males in this age group. Moreover, *APE1* 2197 (T>G) polymorphic allele was associated with the absence of distant metastasis and *MLH1* -93 (G>A) polymorphic allele with absence of regional lymph nodes metastasis. Considering *H. pylori* strains according to age group shows difference between intestinal and diffuse subtypes. In the intestinal subtype, patients carrying the *APE1* polymorphic allele were significantly infected by less virulence strains. In summary, our data show that these SNPs are potentials markers of susceptibility to the different subtypes of GC in older and young patients and that gender is also an important aspect to be considered at risk studies.

Key words: Gastric cancer, *Helicobacter pylori*, Polymorphism, Age, Gender.

Introduction

Gastric cancer (GC) is now the fifth most common malignancy in the world and the third leading cause of cancer death, been more frequent in man than women [1]. Adenocarcinoma is the most frequent GC and are classified in two histologically distinct types by Lauren: intestinal (well-differentiated) and diffuse (undifferentiated). They have distinct epidemiology, carcinogenic pathways and clinic outcome [2,3]. In common, both are a disease more frequent in elderly population, with higher occurrence in those over 50-55 years old. However, the rate of gastric cancer in young patients has increased over the past few decades [4-6]. *Helicobacter pylori* infection is the most important risk factor for gastric cancer, more associated to the intestinal subtype [7,8]. It is estimated that around 50% of the population worldwide is infected by this bacterium, however only 1% to 2% of those individuals develop gastric malignancies indicating association with genetic factors [9].

Genome-wide association studies have successfully identified human single nucleotide polymorphisms (SNPs) related to the risk of gastric cancer, indicating that these genetic alterations are potential targets for CG risk studies [10,11]. SNPs in DNA repair genes can result in reduced DNA repair capacity, which can consequently be important for GC susceptibility [12,13]. Moreover, studies have reported that the loss of E-cadherin (CDH1) expression has been associated with poor clinical outcome in GC. Wherefore SNPs in this gene can also contribute to GC development.

Four DNA repair pathways operate on specific DNA damage: base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), double-strand break repair (DSBR) and mismatch repair (MMR) [14]. Apurinic/apyrimidinic endonuclease/redox factor-1 (APE1/Ref-1) is an essential enzyme in the BER pathway involved in the excision of abasic sites formed in DNA cleavage by OGG1. The *MLH1* gene is considered one of the key members of the MMR pathway that repairs base-base mismatches that occur during DNA replication in proliferating cells, which are promoted by some chemical agents [15,16].

E-cadherin or CDH1 is an epithelial cellular junction protein expressed in almost all epithelial cells. It is an invasion-suppressor molecule, plays an important role in the maintenance of epithelial development, organization and cell integrity [17]. Diminished expression of CDH1 promotes malignant transformation, tumor invasion and metastasis [18,19]. Loss of function of the E-cadherin gene (CDH1) has been linked with diffuse gastric cancer susceptibility, and germline inactivating mutations in CDH1 characterize the hereditary diffuse gastric cancer (HDGC) syndrome [20].

Therefore, this study was designed to investigate the role of polymorphism SNPs in DNA repair genes involved in the BER (*APE1*, T>G) and MMR (*MLH1*, G>A) pathways, as well as in *CDHI* at positions -160 (C>A) and -347 (G>GA) in the susceptibility different histological subtypes of GC to older patients and young patients.

Methods

Subjects

This case–control study consisted of 264 patients with a diagnosis of gastric cancer, aged 23–92 years, who were recruited from four hospitals: Walter Cantídeo Hospital at the Federal University of Ceará, Santa Casa de Misericórdia, Fortaleza General Hospital in state Ceará and Hospital Ofir Loyola, Joao de Barros Barreto in the state Pará. The controls were composed by 391 healthy volunteers recruited from Ceará Hematology Center, Santa Casa de Misericórdia Hospital, in the state of Ceará and Pará Hematology Center, without any history of cancer. The control population was age and sex matched with the gastric cancer patients and 4 ml of blood were harvested for analysis.

All participants signed an informed consent and the study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Ceará and Ethics Committee of the Fortaleza General Hospital under the protocols n° 071002/10 and n° 220/12, respectively. According to the Resolution 306/04 of the National Council of Health, Ministry of Health/Brazil.

Genotype analysis

DNA isolation was performed according to the Salting-Out procedure [21] and cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method [22] extracted from frozen tumor tissue and whole blood respectively. The *APE1* (T>G), *MLH1* (G>A), *CDHI* -160 (C>A) and *CDHI* -347 (G>GA) polymorphisms were determined by PCR–RFLP-(restriction fragment length polymorphism) based method. PCR products were generated using in each reaction a total volume of 20µl containing PCR MasterMix 1X (Promega Madison WI), 0.4 mM each primer and 100 ng DNA template. All PCR products were verified by 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide and were digested with appropriate restriction endonucleases. The digested fragments were visualized in 8% polyacrylamide gels with silver stained. The reaction conditions, restriction enzymes and the fragment size are described in Table 1.

Table 1. PCR primer sets, annealing temperature and size of the PCR products used for genotyping polymorphism and *H. pylori*. F – forward; R – reverse.

| Gene | Primer sequence | Annealing | Size of PCR product | Restriction enzyme | Reference |
|-------------------------|---|-----------|---------------------------------------|--------------------|-----------|
| <i>ureC</i> | F – 5'-AAGCTTTTAGGGTGTAGGGTTT-3' R – 5'-AAGCTTACTTTCTAACACACGC-3' | 55 °C | 294 bp | - | [23] |
| <i>vacA</i> s1/s2 | F – 5'-ATGAAAATACAACAAACACAC-3' R – 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3' | 55 °C | 259/286 bp | - | [24] |
| m1 | F – 5'-GGTCAAATGCGGCATGG-3' R – 5'-CCATTGGTACCTGTAGAAAC-3' | 55 °C | 290 bp | - | [24] |
| m2 | F – 5'-GGAGCCCAGGAAACATTG-3' R – 5'-CATAACTAGCGCCTTGAC-3' | 52 °C | 192 bp | - | [24] |
| <i>cagA</i> | F – 5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3' R – 5'-TTAGAATAATCAACAAACATAACGCCAT-3' | 56 °C | 297 bp | - | [24] |
| <i>cagE</i> | F – 5'-TTGAAAACCTTCAAGGATAGGATAGAGC-3' R – 5'-GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC-3' | 56 °C | 509 bp | - | [24] |
| <i>virB11</i> | F – 5'-TTAAATCCTCTAAGGCATGCTAC-3' R – 5'-GATATAAGTCGTTTTACCGCTTC-3' | 49 °C | 491 bp | - | [24] |
| <i>APE-1</i> 2197 (T>G) | F: 5'-CTGTTTCATTTCTATAGGCTA-3' R: 5'-AGGAACCTTGGAAAGGCTTC-3' | 48.5°C | T 164 bp G 144 bp and 20 bp | <i>Bfal</i> | [27] |
| <i>MLH1</i> -93 (G>A) | F-5'-AGTAGCCGCTTCAGGGA-3' R-5'-CTCGTCCAGCCGCCGAATAA-3' | 50°C | G125 and134bp A259bp | <i>PvuII</i> | [28] |
| <i>CDH1</i> -160 (C>A) | F- 5'-GCCCCGACTTGTCTCTCTAC-3' R- 5'-GGCCACAGCCAATCAGCA-3' | 61°C | C 446 bp A 368 and 68bp | <i>HincII</i> | [29] |
| <i>CDH1</i> -347 (G>GA) | F- 5'-GCCCCGACTTGTCTCTCTAC-3' R- 5'-GGCCACAGCCAATCAGCA-3' | 61°C | G-263, 115 e 68 pb GA-331 e 115 pb | <i>BanII</i> | [29] |

The *H. pylori* infection was detected by amplification of the urease C gene using primers for PCR, as described by Lage *et al.*, [23]. For the *H. pylori*-positive samples, the presence of the *vacA* and alleles, *cagA*, *cagE* and *virB11* genes were identified using the primer sets from the published literature. These are shown in Table 1. PCR for amplification of *cagA*, *cagE*, *virB11* and *vacA* genes, were prepared as described by Lima *et al.*, [24]. PCR products were visualized in 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide or 8% polyacrylamide gels with silver stained.

Statistical analysis

The statistical analyses were conducted using the EPINFO1 6.0. Statistically significant differences were evaluated by the chi-square test (χ^2) and Fisher's exact test. A *p*-value less than 0.05 was regarded as statistically significant. In the calculation of the genotypes and allele frequencies, Hardy-Weinberg equality was tested.

Results

Among the 264 analyzed cases, the males were more frequent 174 (65.9%) than females 90 (34.1%). The mean age was 62, ranging from 23 to 92 years old been 62.3 for intestinal tumors and 59.2 for diffuse tumors. The intestinal subtype was slightly more frequent than the diffuse subtype (53% vs 47%, respectively). *H. pylori* infection was detected

in 248 out of 264 (93.9%) gastric adenocarcinomas. Analyzes were carried out considering the histological subtype (intestinal and diffuse) and cutoff age of 55 years old.

In intestinal subtype, among the patients <55 years old, (table 2) it was observed that the presence of *APE1* 2197 (T>G) homozygous polymorphic genotype and the polymorphic allele (G) were associated to a protection for the intestinal subtype development. The importance of the G allele was confirmed by the significance found in the dominant model analysis. On the other hand, in patients ≥ 55 years old, the protection was associated to the presence *CDHI* -347 (G>GA) polymorphic allele, confirmed in the dominant model analysis. There are no differences between patients ages groups (<55 vs ≥ 55 years old) considering the frequency of polymorphism genotypes studied. Taking in account the gender in the intestinal subtype, in male only among patients aged $55 \geq$ years old, *CDHI*-347 (G>GA) the heterozygous genotype and the dominant model for GA allele was associated with a protection [*CDHI*-347 (GGA vs GG: OR=0.50 ; CI: 0.25-1.0 ; p=0.036); (GGA+GAGA vs GG: OR=0.51 ; CI:0.2-1.0; p=0.034)]. No difference was found between the two ages groups in male. In females, only among patients aged <55 years old, a protection was observed for *APE1* 2197 (T>G) associated with polymorphic allele and the dominant model [*APE1* 2197 (G vs T: OR= 0.24; CI:0.04-1.2; p=0.046); (TG+GG vs TT: OR=0.13 ; CI:0.01-1.1; p=0.039)]. When the two ages groups were compared, a protection was associated with females at age <55 years old [*APE1* 2197 (G vs T: OR= 0.20; CI: 0.07-1.0; p=0.046)]. Comparing the gender, in patients aged $55 \geq$ years old , male patients had a tendency of lower frequency of *MLH1* -93 (G>A) homozygous polymorphic genotype than women [*MLH1* -93 (AA vs GG: OR= 0.1; CI: 0.01-1.4; p=0.059)].

In diffuse subtype, among the patients <55 years old (table 3), the *MLH1* -93 (G>A) heterozygous genotype was associated to a protection for diffuse tumors developing [*MLH1* -93 (GA vs GG: OR=0.41 ; CI:0.17-1.0 ; p=0.049)]. There are no differences between patients ages groups (<55 vs ≥ 55 years old). Taking in account the gender, among the males, an increase of 7 times risk was found for patients <55 years old associated to *APE1* 2197 (T>G) homozygous polymorphic genotype [*APE1* 2197 (GG vs TT: OR= 8.25; CI: 0.82-82; p=0.047)]. No significant risk results were found among the female. Also no difference was found between the two age patients groups for both gender. However, when the patients gender was compared, among the $55 \geq$ years old groups a risk was observed for male carrying the *CDHI* -347 (G>GA) the heterozygous genotype , in a dominant model and the polymorphic allele [*CDHI* -347 (GGA vs GG: OR= 2.7; CI:1.0-7.3; p=0.040); (GGA+GAGA vs GG: OR= 3.1; CI:1.1-8.2; p=0.018); (GA vs G: OR= 2.8; CI:1.1-6.6; p=0.015)].

Comparing the intestinal and diffuse tumors, only a tendency of risk was observed in patients <55 years old for diffuse subtype associated with homozygous polymorphic genotype and polymorphic allele of *APE1* 2197 (T>G) [*APE1* 2197 (GG vs TT: OR= 3.9; CI: 0.8-17; p=0.063); (G vs T: OR= 1.83; CI: 0.9-3.5; p=0.074)].

Table 2. Allelic and genotype frequencies for the polymorphisms of *APE1*, *MLH1* and *CDH1* considering the age and intestinal subtype.

| Polymorphism | Intestinal < 55 | | | | Intestinal ≥ 55 | | | |
|-------------------------|-----------------|---------|----|-------|-----------------|---------|-----|-------|
| | Case | Control | OR | p | Case | Control | OR | p |
| <i>APE1</i> (T>G) | 37 | 49 | | | 101 | 159 | | |
| T/T | 17 | 45,9% | 12 | 24,5% | 36 | 35,6% | 56 | 35,2% |
| T/G | 17 | 45,9% | 28 | 57,1% | 47 | 46,5% | 78 | 49,1% |
| G/G | 3 | 8,1% | 9 | 18,4% | 18 | 17,8% | 25 | 15,7% |
| T/T+T/G | 34 | 91,9% | 40 | 81,6% | 83 | 82,2% | 134 | 84,3% |
| T/G+G/G | 20 | 54,1% | 37 | 75,5% | 65 | 64,4% | 103 | 64,8% |
| Allelo T | 51 | 68,9% | 52 | 53,1% | 119 | 58,9% | 190 | 59,7% |
| Allelo G | 23 | 31,1% | 46 | 46,9% | 83 | 41,1% | 128 | 40,3% |
| <i>MLH1</i> -93(G>A) | 35 | | 49 | | 99 | | 159 | |
| G/G | 18 | 51,4% | 30 | 61,2% | 45 | 45,5% | 80 | 50,3% |
| G/A | 15 | 42,9% | 17 | 34,7% | 50 | 50,5% | 71 | 44,7% |
| A/A | 2 | 5,7% | 2 | 4,1% | 4 | 4,0% | 8 | 5,0% |
| G/G+G/A | 33 | 94,3% | 47 | 95,9% | 95 | 96,0% | 151 | 95,0% |
| G/A+A/A | 17 | 48,6% | 19 | 38,8% | 54 | 54,5% | 79 | 49,7% |
| Allelo G | 51 | 72,9% | 77 | 78,6% | 140 | 70,7% | 231 | 72,6% |
| Allelo A | 19 | 27,1% | 21 | 21,4% | 58 | 29,3% | 87 | 27,4% |
| <i>CDH1</i> -160 (C>A) | 37 | | 49 | | 100 | | 150 | |
| C/C | 20 | 54,1% | 29 | 59,2% | 49 | 49,0% | 76 | 50,7% |
| C/A | 11 | 29,7% | 15 | 30,6% | 41 | 41,0% | 64 | 42,7% |
| A/A | 6 | 16,2% | 5 | 10,2% | 10 | 10,0% | 10 | 6,7% |
| C/C+C/A | 31 | 83,8% | 44 | 89,8% | 90 | 90,0% | 140 | 93,3% |
| C/A+A/A | 17 | 45,9% | 20 | 40,8% | 51 | 51,0% | 74 | 49,3% |
| Allelo C | 51 | 68,9% | 73 | 74,5% | 139 | 69,5% | 216 | 72,0% |
| Allelo A | 23 | 31,1% | 25 | 25,5% | 61 | 30,5% | 84 | 28,0% |
| <i>CDH1</i> -347 (G>GA) | 37 | | 48 | | 100 | | 152 | |
| G/G | 21 | 56,8% | 26 | 54,2% | 68 | 68,0% | 78 | 51,3% |
| G/GA | 13 | 35,1% | 20 | 41,7% | 28 | 28,0% | 66 | 43,4% |
| GA/GA | 3 | 8,1% | 2 | 4,2% | 4 | 4,0% | 8 | 5,3% |
| G/G+G/GA | 34 | 91,9% | 46 | 95,8% | 96 | 96,0% | 144 | 94,7% |
| G/GA+GA/GA | 16 | 43,2% | 22 | 45,8% | 32 | 32,0% | 74 | 48,7% |
| Allelo G | 55 | 74,3% | 72 | 75,0% | 164 | 82,0% | 222 | 73,0% |
| Allelo GA | 19 | 25,7% | 24 | 25,0% | 36 | 18,0% | 82 | 27,0% |

Table 3. Allelic and genotype frequencies for the polymorphisms of *APE1*, *MLH1* and *CDH1* considering the age and diffuse subtype.

| Polymorphism | < 55 Diffuse | | | | | ≥ 55 Diffuse | | | | |
|-----------------------|--------------|----------|-----------------|--------|--|--------------|-----------|----------------|-------|--|
| | Case | Control | OR | p | | Case | Control | OR | p | |
| <i>APE1</i> (T>G) | 38 | 56 | | | | 83 | 127 | | | |
| T/T | 13 34,2% | 18 32% | 1 | - | | 33 39,8% | 43 33,9% | 1 | - | |
| T/G | 16 42,1% | 33 59% | 0.67(0.26-1.7) | 0.400 | | 39 47,0% | 66 52,0% | 0.77(0.42-1.4) | 0.394 | |
| G/G | 9 23,7% | 5 9% | 2.4(0.67-9.1) | 0.165 | | 11 13,3% | 18 14,2% | 0.79(0.33-1.9) | 0.610 | |
| T/T+T/G | 29 76,3% | 51 91% | 0.78(0.33-1.8) | 0.579 | | 72 86,7% | 106 83,5% | 0.88(0.51-1.5) | 0.659 | |
| T/G+G/G | 25 65,8% | 38 68% | 0.91(0.38-2.1) | 0.834 | | 50 60,2% | 84 66,1% | 0.77(0.43-1.3) | 0.384 | |
| Allelo T | 42 55,3% | 69 62% | 1 | - | | 105 63,3% | 152 59,8% | 1 | - | |
| Allelo G | 34 44,7% | 43 38% | 1.29(0.71-2.3) | 0.385 | | 61 36,7% | 102 40,2% | 0.86(0.57-1.2) | 0.483 | |
| <i>MLH1</i> -93(G>A) | 37 | 56 | | | | 82 | 126 | | | |
| G/G | 20 54,1% | 21 38% | 1 | - | | 46 56,1% | 63 50,0% | 1 | - | |
| G/A | 13 35,1% | 33 59% | 0.41(0.17-1.0) | 0.049* | | 31 37,8% | 56 44,4% | 0.75(0.42-1.3) | 0.349 | |
| A/A | 4 10,8% | 2 4% | 2.1(0.34-12) | 0.413 | | 5 6,1% | 7 5,6% | 0.97(0.29-3.2) | 0.971 | |
| G/G+G/A | 33 89,2% | 54 96% | 0.64(0.30-1.3) | 0.244 | | 77 93,9% | 119 94,4% | 0.88(0.55-1.4) | 0.618 | |
| G/A+A/A | 17 45,9% | 35 63% | 0.51(0.21-1.1) | 0.115 | | 36 43,9% | 63 50,0% | 0.78(0.44-1.3) | 0.389 | |
| Allelo G | 53 71,6% | 75 67% | 1 | - | | 123 75,0% | 182 72,2% | 1 | - | |
| Allelo A | 21 28,4% | 37 33% | 0.80(0.42-1.5) | 0.502 | | 41 25,0% | 70 27,8% | 0.86(0.55-1.3) | 0.531 | |
| <i>CDH1</i> -160 CA | 38 | 53 | | | | 83 | 124 | | | |
| C/C | 19 50,0% | 23 43,4% | 1 | - | | 40 48,2% | 53 42,7% | 1 | - | |
| C/A | 16 42,1% | 25 47,2% | 0.77(0.32-1.8) | 0.566 | | 34 41,0% | 60 48,4% | 0.75(0.41-1.3) | 0.338 | |
| A/A | 3 7,9% | 5 9,4% | 0.72(0.15-3.4) | 0.686 | | 9 10,8% | 11 8,9% | 1.0(0.41-2.8) | 0.870 | |
| C/C+C/A | 35 92,1% | 48 90,6% | 0.88(0.41-1.8) | 0.743 | | 74 89,2% | 113 91,1% | 0.86(0.52-1.4) | 0.581 | |
| C/A+A/A | 19 50,0% | 30 56,6% | 0.76(0.33-1.7) | 0.533 | | 43 51,8% | 71 57,3% | 0.80(0.45-1.4) | 0.439 | |
| Allelo C | 54 71,1% | 71 67,0% | 1 | - | | 114 68,7% | 166 66,9% | 1 | - | |
| Allelo A | 22 28,9% | 35 33,0% | 0.82(0.43-1.5) | 0.559 | | 52 31,3% | 82 33,1% | 0.92(0.60-1.4) | 0.710 | |
| <i>CDH1</i> -347 G/GA | 37 | 53 | | | | 83 | 122 | | | |
| G/G | 24 64,9% | 29 54,7% | 1 | - | | 50 60,2% | 78 63,9% | 1 | - | |
| G/GA | 10 27,0% | 23 43,4% | 0.52(0.20-1.3) | 0.167 | | 30 36,1% | 43 35,2% | 1.0(0.60-1.9) | 0.777 | |
| GA/GA | 3 8,1% | 1 1,9% | 3.6(0.35-37) | 0.336 | | 3 3,6% | 1 0,8% | 4.6(0.47-46) | 0.148 | |
| G/G+G/GA | 34 91,9% | 52 98,1% | 0.79(0.39-1.57) | 0.504 | | 80 96,4% | 121 99,2% | 1.03(0.65-1.6) | 0.893 | |
| G/GA+GA/GA | 13 35,1% | 24 45,3% | 0.65(0.27-1.5) | 0.335 | | 33 39,8% | 44 36,1% | 1.17(0.65-2.0) | 0.591 | |
| Allelo G | 58 78,4% | 81 76,4% | 1 | - | | 130 78,3% | 199 81,6% | 1 | - | |
| Allelo GA | 16 21,6% | 25 23,6% | 0.89(0.43-1.8) | 0.757 | | 36 21,7% | 45 18,4% | 1.2(0.71-2.1) | 0.441 | |

Polymorphism and stage of gastric cancer

Among the 264 cases included in this study only in 246 of the cases it was possible to analyze the distant metastasis and in 261 lymph nodes metastasis. A trends for absence of distant metastasis (M0) was associated to the *APE1* 2197 (T>G) polymorphic allele and in the dominant model analysis ($p=0.065$; $p=0.075$, respectively). When a cutoff of 55 years old was considered, it was found that *MLH1* -93 (G>A) polymorphic allele was more frequent in patients without regional lymph nodes metastasis (N0) in a dominant model ($p=0.049$).

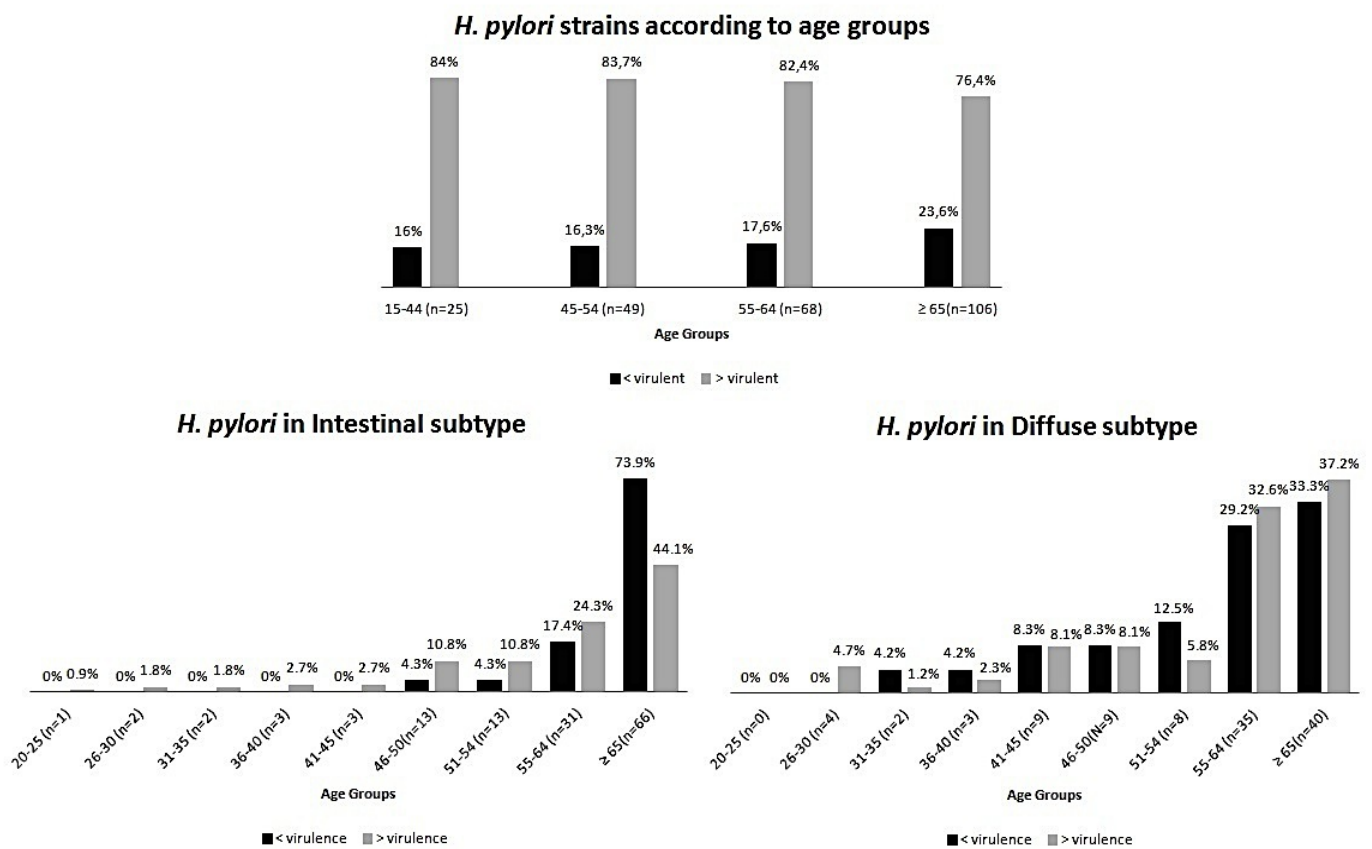
H. pylori tumor analysis

The tumors were analyzed according to the *H. pylori* strains. More virulent was considered strains with *vacAs1* and *cag*-PAI integrity, or the presence of only one genes or *vacAs2* but with *cag*- PAI integrity. Low virulence was considered those which were *vacAs1* and *vacAs2* without *cag*- PAI genes or *vacAs2* with the presence of only one gene.

The distributions of the less and more virulent strain, according to age (according International Agency for Research on Cancer), of all CG patients and considering the

histological subtype are showed in figure 1. No difference was observed related to the frequency of more and less virulent strain according to age groups, accepting for patients with ≥ 65 years old group in which it was observed an increase of less virulent *H. pylori* strain (Figure 1A). It was interesting to observe that only in diffuse tumors the less virulent strains were found in the all age groups (Figure 1C).

Figure 1. (A) Distributions of the less and more virulent strain according to age. (B) Distributions of the less and more virulent strain according to age in intestinal subtype. (C). Distributions of the less and more virulent strain according to age in diffuse subtype.



Taking in account *H. pylori* strains and the SNPs studied distributed according to the histological subtypes (Table 4). In this analysis, the *APEI* (T>G) polymorphic allele was statically associated with strains lower virulence group in the intestinal subtype. Considering the ≥ 65 years old group, in the general sample, it was found that the *APEI* (T>G) polymorphic allele were statically associated with strains lower virulence group [*APEI* 2197 (TG vs TT: p= 0.008); (GG vs TT: p= 0.012); (TG+GG vs TT: p= 0.005)].

Table 4. *H. pylori* Genotypes in Association with the DNA repair and *CDHI* SNPs considering the histological subtypes.

| Intestinal | | | | | | Diffuse | | | | | | | |
|------------------|-----|----------------|----|---------------|--------|------------------|-----|-------|----------------|-------|---------------|--|---|
| | | more virulence | | low virulence | | p | | | more virulence | | low virulence | | p |
| <i>APEI</i> 2197 | | | | | | <i>APEI</i> 2197 | | | | | | | |
| TT | 46 | 42,6% | 5 | 20,0% | 1 | TT | 36 | 42,9% | 5 | 21,7% | 1 | | |
| TG | 47 | 43,5% | 15 | 60,0% | 0.046* | TG | 35 | 41,7% | 12 | 52,2% | 0.113 | | |
| GG | 15 | 13,9% | 5 | 20,0% | 0.097 | GG | 13 | 15,5% | 6 | 26,1% | 0.086 | | |
| TT+TG | 93 | 86,1% | 20 | 80,0% | 0.192 | TT+TG | 71 | 84,5% | 17 | 73,9% | 0.316 | | |
| TG+GG | 62 | 57,4% | 20 | 80,0% | 0.036* | TG+GG | 48 | 57,1% | 18 | 78,3% | 0.064 | | |
| T | 139 | 64,4% | 25 | 50,0% | 1 | T | 107 | 63,7% | 22 | 47,8% | 1 | | |
| G | 77 | 35,6% | 25 | 50,0% | 0.030* | G | 61 | 36,3% | 24 | 36,3% | 0.051 | | |
| <i>MLHI</i> -93 | | | | | | <i>MLHI</i> -93 | | | | | | | |
| GG | 47 | 45,2% | 14 | 56,0% | 1 | GG | 45 | 54,2% | 13 | 56,5% | 1 | | |
| GA | 52 | 50,0% | 11 | 44,0% | 0.446 | GA | 33 | 39,8% | 8 | 34,8% | 0.727 | | |
| AA | 5 | 4,8% | 0 | 0,0% | 0.575 | AA | 5 | 6,0% | 2 | 8,7% | 0.657 | | |
| GG+GA | 99 | 95,2% | 25 | 100,0% | 0.661 | GG+GA | 78 | 94,0% | 21 | 91,3% | 0.859 | | |
| GA+AA | 57 | 54,8% | 11 | 44,0% | 0.331 | GA+AA | 38 | 45,8% | 10 | 43,5% | 0.844 | | |
| G | 146 | 70,2% | 39 | 78,0% | 1 | G | 123 | 74,1% | 34 | 73,9% | 1 | | |
| A | 62 | 29,8% | 11 | 22,0% | 0.271 | A | 43 | 25,9% | 12 | 26,1% | 0.979 | | |
| <i>CDHI</i> -160 | | | | | | <i>CDHI</i> -160 | | | | | | | |
| CC | 58 | 53,7% | 10 | 40,0% | 1 | CC | 41 | 48,2% | 10 | 43,5% | 1 | | |
| CA | 37 | 34,3% | 13 | 52,0% | 0.125 | CA | 36 | 42,4% | 10 | 43,5% | 0.795 | | |
| AA | 13 | 12,0% | 2 | 8,0% | 1.000 | AA | 8 | 9,4% | 3 | 13,0% | 0.684 | | |
| CC+CA | 95 | 88,0% | 23 | 92,0% | 0.410 | CC+CA | 77 | 90,6% | 20 | 87,0% | 0.884 | | |
| CA+AA | 50 | 46,3% | 15 | 60,0% | 0.216 | CA+AA | 44 | 51,8% | 13 | 56,5% | 0.685 | | |
| C | 153 | 70,8% | 33 | 66,0% | 1 | C | 118 | 69,4% | 30 | 65,2% | 1 | | |
| A | 63 | 29,2% | 17 | 34,0% | 0.304 | A | 52 | 30,6% | 16 | 34,8% | 0.586 | | |
| <i>CDHI</i> -347 | | | | | | <i>CDHI</i> -347 | | | | | | | |
| GG | 82 | 64,1% | 15 | 60,0% | 1 | GG | 49 | 59,8% | 13 | 56,5% | 1 | | |
| GGA | 38 | 29,7% | 9 | 36,0% | 0.577 | GGA | 28 | 34,1% | 9 | 39,1% | 0.697 | | |
| GAGA | 8 | 6,3% | 1 | 4,0% | 1.000 | GAGA | 5 | 6,1% | 1 | 4,3% | 1.000 | | |
| GG+GGA | 120 | 93,8% | 24 | 96,0% | 0.803 | GG+GGA | 77 | 93,9% | 22 | 95,7% | 0.851 | | |
| GGA+GAGA | 46 | 35,9% | 10 | 40,0% | 0.699 | GGA+GAGA | 33 | 40,2% | 10 | 43,5% | 0.780 | | |
| G | 202 | 78,9% | 39 | 78,0% | 1 | G | 126 | 76,8% | 35 | 76,1% | 1 | | |
| GA | 54 | 21,1% | 11 | 22,0% | 0.886 | GA | 38 | 23,2% | 11 | 23,9% | 0.916 | | |

Discussion

Susceptibility to GC has been associated to SNPs indicating that these genetic alterations are potential targets for CG risk studies [10,30], however, DNA repair gene SNPs *APE1* 2197(T>G) and *MLH1* -93 (G>A) as well as *CDH1* -160 (C>A) and *CDH1* -347 (G>GA) have been poorly studied and with controversial results [15,31,32]. Also most of the CG risk study do not consider the histological subtype, age and gender.

In this study it was observed that the association with the polymorphism studied differed accord to subtype, age and gender. In intestinal subtype, one the most important result found was the protection associated to the polymorphic allele of *APE1* 2197 (T>G) associated to female patients aged <55 years old. The association with female aged <55 years old confirmed when the two ages groups was compared. On the other hand, in patients ≥ 55 years old, the protection was associated to the presence *CDH1* -347 (G>GA) polymorphic allele in male with age $55 \geq$ years old a protection.

It is known that APE-1 may activate several transcription factors, including NF- κ B, which control different cell biological processes include apoptosis and cell differentiation. During the oxidative stress APE1 active the NF- κ B which induce the survival proteins [33,34]. The polymorphism *APE1* 2197 (T>G) was demonstrated, by Hu *et al.*, [35] using cell culture, to decrease the efficiency of this enzyme as transcription factor decreasing the NF- κ B induction and leading to cell dead, justifying the protection found . However the association with female aged <55 years old has to be explored.

E-cadherin (CDH1) is an adhesion glycoprotein found in epithelial tissues where it promotes cell–cell unions known as adherens junctions [36]. Loss of function of the CDH1 gene is associated with development of gastric cancer and with tumor cell invasion and metastasis [37,38]. Polymorphisms at positions –160 C>A and –347 G>GA are related to reduce the transcriptional activity of *CDH1*, although their association with high susceptibility to gastric cancer are controversial [39-43]. Zhang *et al.*, [42], in Chinese patients, found a risk associated to the homozygous polymorphic genotype while Borges *et al.*, [44], with Brazilian patients, didn't find no association. However, neither of these studies considered the different histological subtypes associated with gender and age. The data of the present study contrast with both risk study. Based on that mutation in the E-cadherin gene is associated to young adults and diffuse subtype, it was expected that the polymorphisms in this gene could be associated to diffuse risk and young patients. In this way, a protection associated to intestinal and older patients, is not a discordant result.

Another important result is related to diffuse subtype, where a protection was associated to *MLH1* -93 (G>A) heterozygous genotype in patients <55 years old. Among the many MMR enzymes *MLH1* has been shown to be among the most essential in sensitizing cells to undergo apoptosis thereby protecting against tumor formation [45,46], justifying the protection in patients <55 years old. There are only two risk studies with gastric cancer and this polymorphism that disagree with our data [47,48]. However, these studies did not consider the different histological subtypes, gender and age. In this same age group, it is interesting to observe that risk was found for males associated to *APE1* 2197 (T>G) homozygous polymorphic genotype, differing to the intestinal subtype, which corroborated that these histological subtype has different carcinogenic pathways and gender is an important issue. Taken in account the literature, result agreed with the report by Canbay *et al.*, [49], in Turkish patients, who found a risk for GC associated with *APE1* 2197 (T>G) polymorphic allele. Nonetheless, this study didn't consider the different histological subtypes associated with gender and age.

Considering the importance of TNM pathological staging to assess the prognosis and determine the treatment of patients with gastric cancer, this study correlated the staging with the studied SNPs. The general analyses showed only trends of association between the polymorphic allele G of *APE1* 2197 (T>G) and the absence of distant metastasis (M0). Spite of this result was not significant it is in accordance with the arguments for intestinal tumors protection linked to the *APE1* 2197 (T>G) G allele discussed above. Additionally, absence of regional lymph nodes metastasis (N0) was more frequent in *MLH1* -93 (G>A) polymorphic allele A patients carries with < 55 years old. This data is in the same direction with the protection for diffuse tumors associated with the heterozygous genotype of *MLH1* -93 (G>A) observed in this study.

Another important aspect to consider in gastric cancer risk studies is *H. pylori* infection. For this analyzes the strains were classified as more and less virulent, based in two important parameters from the literature the *cag*-PAI integrity and *vacA* alleles [24,50]. There are no study considering the *H. pylori* strain and age. In this study the less virulent strain increased just in patients with ≥ 65 years old group in the general analysis. However, when the histological subtype was considered, only in the intestinal tumors had this same distribution.

Taken in account the SNPs, the *APE1* (T>G) polymorphic allele was associated with less-virulence strains and intestinal subtype. This was already observed in our previous studies however with lower number of sample and without the histological subtype

information [51]. This result shows the importance in intestinal tumors, of the two associations age, in which is know that there are changes in the immune system, and polymorphisms. This result associated to the increase of the less virulent strain

The importance of *H. pylori* in the diffuse subtype is controversial. Some studies reported that *H. pylori* infection is strongly related to the development of diffuse subtype in young patients [52-55]. In this study, besides less virulent strains had the same frequency in both, intestinal and diffuse subtype, only in diffuse tumors the less virulent strains were observed in the age early groups. From this data, it seems that in diffuse tumors the frequency of less virulent *H. pylori* strain is dependent of frequency of the age group.

In summary, these data indicate that the histological subtype, age, gender the importance for polymorphisms analysis. In intestinal tumors protection was associated to *APEI* 2197 (T>G) polymorphic allele for female patients aged <55 years old and *CDHI* -347 (G>GA) polymorphic allele for male aged \geq 55 years old. In diffuse tumors, in the <55 years old age group, the polymorphic allele of *MLHI* -93 (G>A) was associated to protection and the polymorphic allele of *APEI* 2197 (T>G) was associated with risk in males in this age group. Also *APEI* 2197 (T>G) polymorphic allele was associated with the absence of distant metastasis and *MLHI* -93 (G>A) polymorphic allele with absence of regional lymph nodes metastasis. The distribution the *pylori* strain according to age group shows difference between intestinal and diffuse subtypes. In the intestinal subtype, patients carrying the *APEI* polymorphic allele were significantly infected by less virulence strains. This data add information about the susceptibility to CG.

References

1. J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int J Cancer*. 136 (5) (2015) 359-86.
2. M. Werner, K.F. Becker, G. Keller, H. Hofler, Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology, *J Cancer Res Clin Oncol*. 127 (2001) 207–16.
3. C.J. Vander Woude, J.H. Kleibeuker, A.T. Tiebosch, M. Homan, A. Beuving, P.L. Jansen, *et al.*, Diffuse and intestinal type gastric carcinomas differ in their expression of apoptosis related proteins, *J Clin Pathol*. 56 (2003) 699–702.
4. W. F. Anderson, M.C. Jr. J.F. Camargo, Fraumeni, P. Correa, P.S. Rosenberg, and C. S. Rabkin, “Age-specific trends in incidence of noncardia gastric cancer in US adults,” *Journal of the American Medical Association*. 303 (17) (2010) 1723–1728.
5. Y. Bai and Z.-S. Li, Endoscopic, clinicopathological features and prognosis of very young patients with gastric cancer, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 26 (11) (2011) 1626–1629.
6. X. Kong, J.L. Wang, H.M. Chen, and J.Y. Fang, Comparison of the clinicopathological characteristics of young and Elderly patients with gastric carcinoma: a meta analysis, *Journal of Surgical Oncology*. 106 (2012) 346–352.
7. M.B. Piazuolo, P. Correa, authors, Gastric cáncer: Overview, *Colomb Med (Cali)*. 44 (2013) 192–201.
8. L.P. Carcas, Gastric cancer review, *J Carcinog*. 13 (14) (2014).
9. J.G. Kusters, A.H. Van Vliet, E. J. Kuipers, Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, *Clin Microbiol Rev*. 19 (2006) 449–490.
10. N. Saeki, H. Ono, H. Sakamoto, T. Y. Oshida, Genetic factors related to gastric cancer susceptibility identified using a genome-wide association study, *Cancer Sci*. 104 (1) (2013) 1–8.
11. Y. Shi, Z. Hu, C. Wu, J. Dai, H. Li, J. Dong, *et al*, A genome-wide association study identifies new susceptibility loci for non-cardia gastric cancer at 3q13.31 and 5p13.1, *Nat Genet*. 43 (12) (2011) 1215–8.
12. I. Gok, M. Baday, S. Cetinkunar, K. Kilic, B.C. Bilgin, , *Bosn J Basic Med Sci*. 14 (4) (2014) 214-8.
13. J. W. Liu, C.Y. He, L.P. Sun, Q. Xu, C.Z. Xing, Y. Yuan, The DNA repair gene ERCC6 rs1917799 polymorphism is associated with gastric cancer risk in Chinese, *Asian Pac J Cancer Prev*. 14 (10) (2013) 6103-8.

14. J. Joo, K.A. Yoon, T. Hayashi, S.Y. Kong, H.J. Shin, B. Park, Y.M. Kim, S.H. Hwang, J. Kim, A. Shin, J.Y. Kim, Nucleotide Excision Repair Gene ERCC2 and 5 Variants Increase Risk of Uterine Cervical Cancer, *Cancer Res Treat.* (2015).
15. X.Q. Xiao, W.D. Gong, S.Z. Wang, Z.D. Zhang, X.P. Rui, G.Z. Wu, F. Ren, Polymorphisms of mismatch repair gene hMLH1 and hMSH2 and risk of gastric cancer in a Chinese population, *Oncol Lett.* 3 (3) (2012) 591-598.
16. M. Cuchra, L. Markiewicz, B. Mucha, D. Pytel, K. Szymanek, J. Szemraj, J. Szaflik, J.P. Szaflik, I. Majsterek, The role of base excision repair in the development of primary open angle glaucoma in the Polish population, *Mutat Res.* 778 (2015) 26-40.
17. U.H. Frixen, J. Behrens, M. Sachs, G. Eberle, B. Voss, A. Warda, D. Löchner, W. E. Birchmeier, E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells, *J Cell Biol.* 113 (1) (1991) 173-85.
18. M. Takeichi. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion, *Annu Rev Biochem.* 59 (1990) 237-252.
19. M.J. Wheelock, K. R. Johnson. Cadherins as modulators of cellular phenotype, *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19 (2003) 207-235.
20. F. Graziano, B. Humar, P. Guilford, The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice, *Ann Oncol.* 14 (12) (2003) 1705-13.
21. S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res.* 16 (3) (1988) 1215.
22. G.D. Foster, D. Tweel, *Plant gene isolation ed., Principles and practice of Clinical Bacteriology Second ed.,* England: John Wiley & Sons; 1996.
23. A.P. Lage, E. Godfroid, A. Fauconnier, A. Burette, J.P. Butzler, Bollen A., Y. Glupczynski, Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens, *J Clin Microbiol.* 33 (10) (1995) 2752-6.
24. V.P. Lima, I.J.L. Silva-Fernandes, M.K.S. Alves *et al.*, Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (*vacA*, *cagA*, *cagE* and *virB11*) in gastric cancer in Brazilian's patients: An association with histopathological parameters, *Cancer Epidemiol.* 35 (5) (2011) 32-7.
25. P.I. Hsu, I.R. Hwang, D. Citty, K.H. Lai, H.M. El-Zimaity, O. Gutierrez, J.G. Kim, M.S. Osato, D.Y. Graham, Y. Yamaoka, Clinical Presentation in Relation to Diversity Within the *Helicobacter pylori cag* Pathogenicity Island, *Am J Gastroenterol.* 97 (2002) 2231-2238.

26. L.A.Sicinski, P. Correa, L.E. Bravo, R.M. Jr. Peek, K.T. Wilson, J.T. Loh, M. C. Yopez, B.D. Gold, D.T. Thompson, T.L. Cover, B.G. Schneider, Non-invasive genotyping of *Helicobacter pylori* *cagA*, *vacA*, and *hopQ* from asymptomatic children, *Helicobacter*. 17 (2012) 96-106.
27. P. Vodicka, R. Stetina, V. Polakova, *et al.*, Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects, *Carcinogenesis*. 28 (2007) 657– 664.
28. H. Chen, N. P. Taylor, K.M. Sotamaa, D.G. Mutch, M.A. Powell, A.P. Schmidt, S. Feng, H.L. Hampel, A. de la Chapelle, P.J. Goodfellow, Evidence for heritable predisposition to epigenetic silencing of MLH1, *Int J Cancer*. 120 (8) (2007) 1684-8.
29. M. H. Chien, L.S. Chou, T.T. Chung, C.H. Lin, M.Y. Chou, M.S. Weng, S.F. Yang, M.K. Chen, Effects of E-cadherin (CDH1) gene promoter polymorphisms on the risk and clinicopathologic development of oral cancer, *Head Neck*. 34 (3) (2012) 405-11.
30. J. Kim, Y. Kim, K.A. Lee, Ethnic differences in gastric cancer genetic susceptibility: allele flips of interleukin gene, *World J Gastroenterol*. 20 (16) (2014) 4558-65.
31. D. Palli, S. Polidoro, M. D'Errico, C. Saieva, S. Guarrera, A. S. Calcagnile, F. Sera, A. Allione, S. Gemma, I. Zanna, A. Filomena, E. Testai, S. Caini, R. Moretti, M. J. Gomez-Miguel, G. Nesi, I. Luzzi, L. Ottini, G. Masala, G. Matullo, E. Dogliotti, Polymorphic DNA repair and metabolic genes: a multigenic study on gastric cancer, *Mutagenesis*. 25 (6) (2010) 569-75.
32. Li. Yi-Ling, T. Zhong, Zhang Jian-Bing, F. Bao-Yu, CDH1 promoter polymorphism and stomach cancer susceptibility, *Mol Biol Rep*. 39 (2012) 1283–1286.
33. Y. Qing, Q. Li, T. Ren, W. Xia, Y. Peng, G. L. Liu, H. Luo, Y. X. Yang, X. Y. Dai, S. F. Zhou, D. Wang, Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer, *Drug Des Devel Ther*. 16 (9) (2015) 901-9.
34. J. J. Raffoul, S. Banerjee, V. Singh-Gupta, Z. E. Knoll, A. Fite, H. Zhang, J. Abrams, F. H. Sarkar, G. G. Hillman, Down-regulation of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox factor-1 expression by soy isoflavones enhances prostate cancer radiotherapy in vitro and in vivo, *Cancer Res*. 67 (5) (2007) 2141-9.
35. J. J. Hu, T. R. Smith, M. S. Miller, H. W. Mohrenweiser, A. Golden, L. D. Case, *et al.*, Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity, *Carcinogenesis*. 22 (2001) 917-922.
36. N. Pecina-Slaus, Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells, *Cancer Cell Int*. 3 (2003) 17.
37. A. K. Perl, P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb, H., G. Christofori, A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma, *Nature*. 392 (1998) 190–193.
38. B. Mayer, J. P. Johnson, F. Leitl, K. W. Jauch, M. M. Heiss, F. W. Schildberg, W. Birchmeier, I. Funke, E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer:

- down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res.* 53 (1993) 1690–1695.
39. L.C. Li, R. M. Chui, M. Sasaki, K. Nakajima, G. Perinchery, H.C. Au, D. Nojima, P. Carroll, R. Dahiya, A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter alters transcriptional activities, *Cancer Res.* 60 (2000) 873–876.
 40. W.S. Park, Y.G. Cho, J.Y. Park, C.J. Kim, J.H. Lee, H.S. Kim, J.W. Lee, Y. H. Song, C.H. Park, Y.K. Park, S.Y. Kim, S.W. Nam, S.H. Lee, N. J. Yoo, J. Y. Lee, A single nucleotide polymorphism in the E- cadherin gene promoter-160 is not associated with risk of Korean gastric cancer, *J Korean Med Sci.* 18 (2003) 501-504.
 41. Y. Shin, I. J. Kim, H.C. Kang J.H. Park, H.R. Park, H.W. Park, M.A. Park , J. S. Lee, K.A. Yoon, J. L. Ku, J. G. Park, The E-cadherin -347G->GA promoter polymorphism and its effect on transcriptional regulation., *Carcinogenesis.* 25 (6) (2004) 895-9.
 42. B. Zhang, K. Pan, Z. Liu, J. Zhou, L. Gu, J. Ji, J. Ma, W. C. You, D. Deng, Genetic polymorphisms of the E-cadherin promoter and risk of sporadic gastric carcinoma in Chinese populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17 (9) (2008) 2402-8.
 43. Q. Wang, D. Gu, M. Wang, Z. Zhang, J. Tang, J. Chen, E-cadherin (CDH1) -160C>A polymorphism associated with gastric cancer among Asians but not Europeans, *DNA Cell Biol.* 30 (6) (2011) 395-400.
 44. B.N. Borges, E. S. Santos, C.E.M.C. Bastos *et al*, Promoter Polymorphisms and Methylation of E-Cadherin (*CDH1*) and *KIT* in Gastric Cancer Patients from Northern Brazil, *Anticancer Res.* 30 (6) (2010) 2225-33.
 45. E. Papouli, P. Cejka, J. Jiricny, Dependence of the cytotoxicity of DNA-damaging agents on the mismatch repair status of human cells, *Cancer Res.* 64 (2004) 3391-3394.
 46. S. Fukuhara, I. Chang, Y. Mitsui, T. Chiyomaru, S. Yamamura, S. Majid, S. Saini, H. Hirata, G. Deng, A. Gill, D.K. Wong, H. Shiina, N. Nonomura, R. Dahiya, Y. Tanaka, DNA mismatch repair gene MLH1 induces apoptosis in prostate cancer cells, *Oncotarget.* 5 (22) (2014) 11297-307.
 47. D.J. Deng, J. Zhou, B.D. Zhu, J.F.J.J.C. Harper, S.M. Powell, Silencing-specific methylation and single nucleotide polymorphism of hMLH1 promoter in gastric carcinomas, *World J Gastroenterol.* 9 (1) (2003) 26-9.
 48. X.Q. Xiao, W.D. Gong, S.Z. Wang, D. Zhang, X.P. Rui, G.Z. Wu, F. Ren, Polymorphisms of mismatch repair gene hMLH1 and hMSH2 and risk of gastric cancer in a Chinese population, *Oncol Lett.* 3 (3) (2012) 591-598.
 49. E. Canbay, B. Agachan, M. Gulluoglu, T. Isbir, E. Balik, S. Yamaner, T. Bulut, C. Cacina, I. Y. Eraltan, A. Yilmaz, D. Bugra, Possible associations of APE1 polymorphism with susceptibility and HOGG1 polymorphism with prognosis in gastric cancer, *Anticancer Res.* 30 (4) (2010) 1359-64.

50. M. Kidd, A.J. Lastovica, J.C. Atherton, J.A. Louw, Conservation of the *cag* pathogenicity island is associated with *vacA* alleles and gastroduodenal disease in South African *Helicobacter pylori* isolates, *Gut*. 49 (1) (2001) 11-7.
51. I.J. Silva-Fernandes, T.A. da Silva, L.F. Agnez-Lima, M.V. Ferreira, S.H. Rabenhorst, *Helicobacter pylori* genotype and polymorphisms in DNA repair enzymes: where do they correlate in gastric cancer?, *J Surg Oncol*. 106 (4) (2012) 448-55.
52. A. Pisanu, M. Podda, A. Cois, A), Gastric cancer in the young: is it a different clinical entity?. A retrospective cohort study, *Gastroenterol Res Pract*. (2014) 125038.
53. R. Santoro, F. Carboni, P. Lepiane ,G. M. Ettorre, E. Santoro, Clinicopathological features and prognosis of gastric cancer in young European adults, *British Journal of Surgery*. 94 (6) (2007) 737–742.
54. J. H. Nam, I. J. Choi, S. J. Cho, *et al.*, *Helicobacter pylori* infection and histological changes in siblings of young gastric cancer patients, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 26 (7) (2011) 1157–1163.
55. M. Hirahashi, T. Yao, T. Matsumoto *et al.*, Intramucosal gastric adenocarcinoma of poorly differentiated type in the young is characterized by *Helicobacter pylori* infection and antral lymphoid hyperplasia. *Modern Pathology*, 20 (1) (2007) 29– 34.

Artigo 3

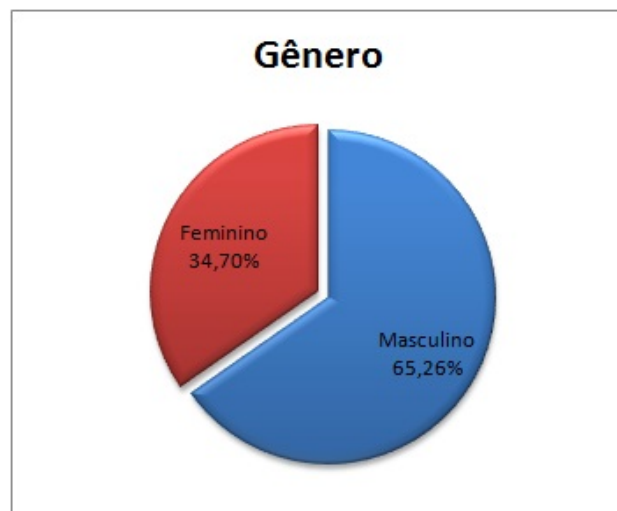
Associação entre genótipos de *Helicobacter pylori* e os diferentes subtipos de câncer gástrico em relação a ilha de patogenicidade e genes de adesão.

RESULTADOS :

Aspectos Clínico-Epidemiológicos

Neste estudo, a mediana da idade dos pacientes com adenocarcinoma gástrico foi de 60 anos, variando de 23 a 92 anos. Uma maior porcentagem 65,26%, 186/285) dos pacientes era do sexo masculino, independente do subtipo histológico (gráfico 1) [(intestinal: $p= 0.000$; (difuso: $p=0.001$)] sendo a relação homem/mulher de 1,87: 1. A maioria dos tumores, 71,7% (203/283) situavam-se nas regiões de corpo e antro (região não-cárdia) sendo 28,3% (80/283) na cárdia. O subtipo intestinal foi ligeiramente mais frequente do que o difuso, representando 52,63% (150/285) dos casos .

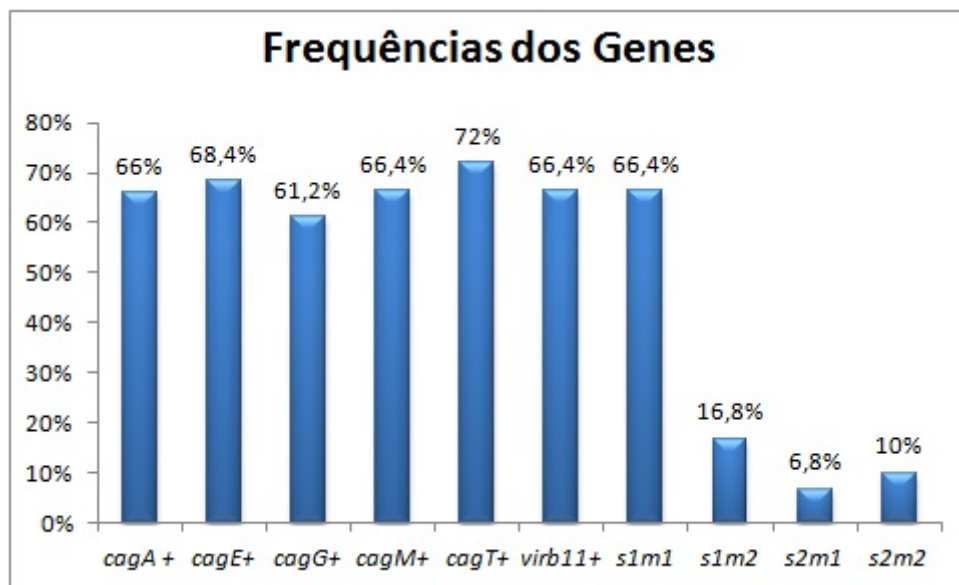
Gráfico1. Distribuição dos casos de adenocarcinoma gástrico em relação ao sexo



Genes de *H. pylori*

H. pylori esteve presente na maioria dos casos (87,71%; 250/285). O gráfico 2 apresenta distribuição das frequências dos genes de *cag*-PAI estudados e das variações alélicas de *vacA* detectados nas amostras dos pacientes incluídos neste estudo. Todos os genes de *cag*-PAI apresentaram uma positividade relativamente alta, sendo que cepas positivas para o gene *cagT* foram estatisticamente mais frequentes que as cepas negativas (72%; $p < 0.01$). Como esperado as associações em mosaico *vacAs1m1* foram estatisticamente mais frequente que as outras variações alélicas (66,4%; 166/250) ($p < 0.01$). Apenas dez amostras com infecção mista foram detectadas neste estudo (infecção por amostras da bactéria apresentando diferentes genótipos *vacA*).

Gráfico 2. Frequência dos genes de *H. pylori* em relação a ilha e *vacA*



Helicobacter pylori considerando os genes *cagA* e *cagE*

Considerando a importância da integridade da ilha e de *vacA*, especialmente *s1* (Do Carmo, 2011) para a patogenicidade da cepa e que, de modo geral, os genes *cagA* e *cagE* são relatados bons marcadores de *cag*-PAI, as cepas de *H. pylori* foram agrupadas de acordo com a presença desses genes. No geral 46,4% (116/250) das amostras possuíam os genes *cagA* com *cagE* concomitantemente e dessas cepas 40,4% eram *vacAs1*. Quando as amostras foram separadas de acordo com subtipos histológicos (tabela 1), foi observado que pacientes infectados com cepas *vacAs1 cagA (+)cagE (+)* foram as mais frequentes, independente dos subtipos histológicos (intestinal: $p=0.000$; Difuso: $p=0.000$). No subtipo intestinal uma alta frequência estatisticamente significativa de cepas *vacAs1cagE(+)* foi observada ($p= 0.004$), no entanto a frequência dessa cepa não diferiu significativamente do subtipo difuso, apesar da mesma cepa ser menos frequente neste subtipo (tabela 2). Para o alelo *s2* não houve frequência predominante.

Tabela 1. Genótipos de *Helicobacter pylori* considerando os genes *cagA* e *cagE*

| Intestinal N= 136 | <i>s1</i> | P s1 vs ref | <i>s2</i> | P s2 vs ref | P s1 vs s2 |
|-------------------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|----------------------|
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> | 56 22,4% | 0.000 | 6 2,4% | 0.453 | 0.088 |
| <i>caA(+)</i> <i>cagE(-)</i> | 20 8,0% | 0.082 | 4 1,6% | 1.000 | 0.7655 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> | 28 11,2% | 0.004 | 8 3,2% | 0.158 | 0.189 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> | 11 4,4% | ref | 3 1,2% | ref | 0.453 |
| | 115 | | 21 | | |
| Difuso N= 114 | <i>s1</i> | P s1 vs ref | <i>s2</i> | P s2 vs ref | P s1 vs s2 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> | 45 18,0% | 0.000 | 9 3,6% | 0.180 | 0.646 |
| <i>caA(+)</i> <i>cagE(-)</i> | 21 8,4% | 0.123 | 4 1,6% | 1.000 | 0.723 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> | 15 6,0% | 0.677 | 4 1,6% | 1.000 | 0.749 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> | 12 4,8% | ref | 4 1,6% | ref | 0.490 |
| | 93 | | 21 | | |

Tabela 2. Comparação dos subtipos histológicos considerando os genes *cagA* e *cagE*

| | Intestinal 136 | | Difuso 114 | | P Intestinal vs Difuso |
|-------------------------------|----------------|-----------|------------|-----------|---------------------------|
| | <i>s1</i> | <i>s1</i> | <i>s1</i> | <i>s1</i> | |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> | 56 | 22,4% | 45 | 18,0% | 0.964 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> | 20 | 8,0% | 21 | 8,4% | 0.349 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> | 28 | 11,2% | 15 | 6,0% | 0.145 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> | 11 | 4,4% | 12 | 4,8% | 0.445 |
| | 115 | | 93 | | |
| | <i>s2</i> | <i>s2</i> | <i>s2</i> | <i>s2</i> | |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> | 6 | 2,4% | 9 | 3,6% | 0.334 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> | 4 | 1,6% | 4 | 1,6% | 1.000 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> | 8 | 3,2% | 4 | 1,6% | 0.305 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> | 3 | 1,2% | 4 | 1,6% | 1.000 |
| | 21 | | 21 | | |

Genótipo de *Helicobacter pylori* de acordo com *cag*-PAI

Frente a necessidade de melhor identificar a ilha, novos marcadores foram selecionados para o estudo, sendo eles *cagG*, *cagM*, *cagT* e *virB11*. A positividade para cepas de *H. pylori* com *cag*-PAI completa para os genes estudados, foi observada em 17,5% (44/250) dos casos e nenhuma cepa foi encontrada com *cag*-PAI incompleta. Correlações entre os genes da ilha *cag*-PAI foram observadas tanto para *virb11* como para *cagT* com os genes *cagA* e *cagE* [(*cagA*: p=0,017; p=0.005); (*cagE*: p=0.000; p= 0.049), respectivamente].

Considerando a regiões de *cag*-PAI, 24% (60/250) apresentavam todos os genes de *cagI* e 48,8% (122/250) os genes de *cagII*. É interessante observar que para *cagII*, 40,4% (101/250) das cepas tinham pelo menos um dos dois marcadores estudados (101/250). Baixa frequência de ausência de genes em cada região foi observada tanto para *cagI* 1,6% (4/250) como para *cagII* 8,8% (22/250), mesmo esta última ter sido observada pela presença de apenas 2 genes.

No contexto de integridade da ilha, as cepas foram agrupadas tendo como referência os alelos de *vacA* e o número de genes da ilha *cagI* e *cagII*, distribuídas de acordo com o subtipo histológico. Tanto nos tumores intestinal como no difuso, cepas *vacAs1* com *cag*-PAI completa foi o genótipo mais frequente de *H. pylori* (Intestinal 16,9% ; Difuso 17,5%).

Considerando *cagI* e alelos de *vacA* (tabela 3), ambos os subtipos histológicos não diferiram quanto a frequência de cepas de *vacAs1* com todos os genes de *cagI* estudados .

Entretanto, nos tumores intestinais, as frequências de cepas com ilhas semi-completas: *cagA(+)**cagE(+)**cagM(-)**cagG(+)*; cepas *cagA(+)**cagE(-)**cagM(+)**cagG(-)*, e cepas *cagA(-)**cagE(+)**cagM(-)**cagG(-)* foram estatisticamente mais frequentes que nos difusos. Nesta mesma linha, uma tendência foi observada para cepas *cagA(-)**cagE(+)**cagM(+)**cagG(-)*. Por outro lado, nos tumores difusos a cepa *cagA(-)**cagE(-)**cagM(+)**cagG(+)* foi estatisticamente mais frequente que nos intestinais. Do mesmo modo uma tendência foi associada a cepa *cagA(+)**cagE(-)**cagM(+)**cagG(+)*.

Tabela 3. Frequência dos genótipos de *H. pylori* considerando o número dos genes de *cagI*, alelo *vacAs1*, distribuídas de acordo com o subtipo histológico.

| <i>cagI</i> | Intestinal n= 136 | | Difuso n=114 | | P |
|---|-------------------|-------|----------------|-------|--------|
| | <i>sI</i> (115) | | <i>sI</i> (93) | | |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(+)</i> | 29 | 21,3% | 28 | 24,6% | 0.543 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(-)</i> | 9 | 6,6% | 12 | 10,5% | 0.267 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(+)</i> | 13 | 9,6% | 2 | 1,8% | 0.009* |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(-)</i> | 4 | 2,9% | 1 | 0,9% | 0.244 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(+)</i> | 6 | 4,4% | 12 | 10,5% | 0.062 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(+)</i> | 3 | 2,2% | 3 | 2,6% | 0.571 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(-)</i> | 6 | 4,4% | 0 | 0,0% | 0.024* |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(-)</i> | 5 | 3,7% | 6 | 5,3% | 0.542 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(+)</i> | 13 | 9,6% | 10 | 8,8% | 0.830 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(-)</i> | 7 | 5,1% | 1 | 0,9% | 0.056 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(+)</i> | 2 | 1,5% | 3 | 2,6% | 0.417 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(+)</i> | 3 | 2,2% | 9 | 7,9% | 0.036* |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(-)</i> | 5 | 3,7% | 0 | 0,0% | 0.046* |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(+)</i> | 1 | 0,7% | 2 | 1,8% | 0.433 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(-)</i> | 5 | 3,7% | 1 | 0,9% | 0.153 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(-)</i> | 2 | 1,5% | 0 | 0,0% | 0.294 |

Nesta análise, cepas com variação alélica *vacAs2* tiveram baixa frequência nos dois subtipos histológicos. É interessante observar que cepas com *cagI* completa apesar da baixa frequência, foram ligeiramente mais presentes no subtipo difuso do que no intestinal (0% vs 2,6%; p=0.093). Os demais grupos cepas *vacAs2* tiveram distribuição semelhante em ambos subtipos histológicos (tabela 4).

Tabela 4. Frequência dos genótipos de *H. pylori* considerando o número dos genes de *cagI*, alelo *vacAs2*, distribuídas de acordo com o subtipo histológico.

| <i>cagI</i> | Intestinal n= 136 | | Difuso n=114 | | p |
|---|-------------------|------|--------------|------|-------|
| | s2 (21) | | s2 (21) | | |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(+)</i> | 0 | 0,0% | 3 | 2,6% | 0.093 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(-)</i> | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | - |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(+)</i> | 2 | 1,5% | 2 | 1,8% | 0.619 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(-)</i> | 4 | 2,9% | 4 | 3,5% | 0.537 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(+)</i> | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | - |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(+)</i> | 1 | 0,7% | 1 | 0,9% | 0.705 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(-)</i> | 0 | 0,0% | 1 | 0,9% | 0.456 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(-)</i> | 3 | 2,2% | 2 | 1,8% | 0.582 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(+)</i> | 0 | 0,0% | 1 | 0,9% | 0.456 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(-)</i> | 3 | 2,2% | 2 | 1,8% | 0.582 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(+)</i> | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | - |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(-)</i> | 5 | 3,7% | 1 | 0,9% | 0.153 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(+)</i> | 1 | 0,7% | 2 | 1,8% | 0.433 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(+)</i> | 0 | 0,0% | 1 | 0,9% | 0.456 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(+)</i> <i>cagG(-)</i> | 1 | 0,7% | 0 | 0,0% | 0.544 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> <i>cagM(-)</i> <i>cagG(-)</i> | 1 | 0,7% | 1 | 0,9% | 0.705 |

Na análise de combinação com três genes da região *cagI* (tabela 5) foi observado que nos tumores intestinais, as cepas *vacAs1*: *cagA(+)**cagE(+)**cagM(-)*; *cagA(+)**cagM(-)**cagG(+)*; *cagE(+)**cagM(-)**cagG(-)*; *cagA(-)**cagE(+)**cagG(-)*; *cagA(-)**cagM(+)**cagG(-)*; *cagE(-)**cagM(+)**cagG(-)* e *cagA(-)**cagM(-)**cagG(-)* foram estatisticamente mais frequentes que nos tumores difusos. Por outro lado, nos tumores difusos as cepas *vacAs1*: *cagA(+)**cagM(+)**cagG(+)*; *cagA(+)**cagE(-)**cagG(+)*; *cagA(-)**cagE(-)**cagG(+)* e *cagE(-)**cagM(+)**cagG(+)* foram estatisticamente mais frequente que nos intestinais.

Em um segundo momento , foi realizado uma combinação considerando apenas 2 genes da ilha *cagI* nos dois subtipos histológicos (tabela 6). E foi observado que no subtipo intestinal as cepas *cagE(+)**cagM(-)*, *cagA(-)**cagG(-)* foram estatisticamente mais frequente que nos tumores difusos (p=0,004; p=0,0008, respectivamente). Enquanto que as cepas *cagM(+)**cagG(+)*, *cagE(-)**cagG(+)* foram estatisticamente mais frequente nos tumores difusos do que nos intestinais (p=0,004; p=0,001, respectivamente).

Tabela 5. Frequência das cepas de *H. pylori* considerando o número de 3 genes de *cagI*, alelos de *vacAs1*, distribuídas de acordo com o subtipo histológico.

| Intestinal <i>vacA</i> S1 = 113 | Difuso <i>vacA</i> S1 = 90 | p |
|------------------------------------|-------------------------------|---------|
| cagA+cagE+cagM+ = 38; 33.62% | cagA+cagE+cagM+=39; 43.33% | 0.156 |
| cagA+cagE+cagG+ = 42; 37.16% | cagA+cagE+cagG+=29; 2.22% | 0.462 |
| cagA+cagE+cagM- = 17; 15.04% | cagA+cagE+cagM-=3; 3.33% | 0.007* |
| cagA+cagE+cagG- = 13; 11.50% | cagA+cagE+cagG-=13; 14.44% | 0.533 |
| cagA+cagM+cagG+ = 35; 30.97% | cagA+cagM+cagG+=40;44.44% | 0.048* |
| cagA+cagM+cagG- = 15; 13.27% | cagA+cagM+cagG-=12;13.33% | 0.990 |
| cagA+cagM-cagG+ = 16; 14.15% | cagA+cagM-cagG+=5; 5.55% | 0.045* |
| cagA+cagE-cagM+ = 12; 10.61% | cagA+cagE-cagM+=13; 14.44% | 0.410 |
| cagA+cagE-cagG+ = 9; 7.96% | cagA+cagE-cagG+=16; 17.77% | 0.034* |
| cagA+cagE-cagM- = 8; 7.079% | cagA+cagE-cagM- = 9; 10% | 0.455 |
| cagA+cagE-cagG- = 11; 9.73% | cagA+cagE-cagG- = 6; 6.66% | 0.433 |
| cagA+cagM-cagG- = 9; 7.9646% | cagA+cagM-cagG- = 7; 7.77% | 0.960 |
| cagE+cagM+cagG+ = 42; 37.16% | cagE+cagM+cagG+ = 37; 41.11 | 0.567 |
| cagE+cagM+cagG- = 16; 14.15% | cagE+cagM+cagG-=13; 14.44% | 0.954 |
| cagE+cagM-cagG+ = 15; 13.27% | cagE+cagM-cagG+=5; 5.55% | 0.095 |
| cagE+cagM-cagG- = 9; 7.96% | cagE+cagM-cagG- = 1; 1.11 | 0.045* |
| cagA-cagE+cagM+ = 20; 17.69% | cagA-cagE+cagM+ = 11; 12.22 | 0.281 |
| cagA-cagE+cagG+ = 15; 13.27% | cagA-cagE+cagG+=13; 14.44% | 0.810 |
| cagA-cagE+cagM- = 7; 6.194% | cagA-cagE+cagM- = 3; 3.33% | 0.517 |
| cagA-cagE+cagG- = 12; 10.61% | cagA-cagE+cagG- = 1; 1.11% | 0.0072* |
| cagA-cagE-cagM+ = 8; 7.079% | cagA-cagE-cagM+=10; 11.11% | 0.315 |
| cagA-cagE-cagG+ = 4; 3.539% | cagA-cagE-cagG+=11; 12.22% | 0.028* |
| cagA-cagM+cagG+ = 16; 14.15% | cagA-cagM+cagG+=19;21.11% | 0.192 |
| cagA-cagM+cagG-=12; 10.619% | cagA-cagM+cagG- = 2; 2.22% | 0.024* |
| cagA-cagM-cagG+= 3; 2.6548% | cagA-cagM-cagG+= 5; 5.55% | 0.470 |
| cagE-cagM+cagG+ = 9; 7.96% | cagE-cagM+cagG+=22; 24.4% | 0.001* |
| cagE-cagM+cagG- = 11; 9.73% | cagE-cagM+cagG- = 1; 1.11% | 0.013* |
| cagE-cagM-cagG+ = 4; 3.53% | cagE-cagM-cagG+= 5; 5.55% | 0.513 |
| cagA-cagE-cagM- = 3; 2.654% | cagA-cagE-cagM- = 2; 2.22% | 1.000 |
| cagA-cagE-cagG- = 7; 6.194% | cagA-cagE-cagG- = 1; 1.11% | 0.078 |
| cagA-cagM-cagG- = 7; 6.194% | cagA-cagM-cagG- = 0; 0% | 0.018* |
| cagE-cagM-cagG- = 7; 6.19% | cagE-cagM-cagG- = 6; 6.6% | 0.891 |

Novas análises foram adicionadas para os genes de *H.pylori* usando árvores de classificação. O objetivo de uma árvore de classificação é separar o melhor possível, as observações que pertencem a uma classe daquelas que pertencem a outra classe através de uma sequência de separações binárias dos dados (Bastos J et., 2010).

A primeira árvore foi gerada usando os dados *vacAs1* e *vacAs2* e os subtipos intestinal e difuso (imagem 1). A árvore classificou o câncer em intestinal ou difuso considerando o valor dos 6 genes de *cag*-PAI incluídos nesse estudo. Nessa análise, os genes *cagG* e *cagE* foram considerados os mais importantes para definir o subtipo histológico nas cepas *vacAs1*. O subtipo intestinal foi definido por cepas *cagG*(-) e *cagG*(+)*cagE*(+), enquanto que os tumores difusos foram definidos pela cepa *cagG*(+)*cagE*(-). Já nas cepas *vacAs2* o mesmo não pode ser observado, talvez porque o número de cepas seja menor.

Na segunda análise foram adicionados aos 6 genes, a possibilidade da árvore usar também as combinações *cagA*(-)*cagG*(-) e *cagM*(+)*cagG*(+). Essas combinações foram escolhidas, pois apresentaram significância estatística, na análise citada acima. Nessa análise a árvore escolheu a combinação *cagM*(+)*cagG*(+) como fator mais importante nas cepas *vacAs1*(imagem 2). O subtipo intestinal foi definido pela cepa *cagM*(+)*cagG*(+)*cagE*(+) e os tumores difusos pela cepa *cagM*(+)*cagG*(+)*cagE*(-). O mesmo não pode ser observado nas cepas *vacAs2*. Apesar de *cagE* aparecer como possível separador entre tumor intestinal e difuso a amostra é muito pequena.

Imagem 1. Árvore de classificação utilizando os dados *vacAs1*, os subtipos intestinal e difuso e os 6 genes de *H.pylori*

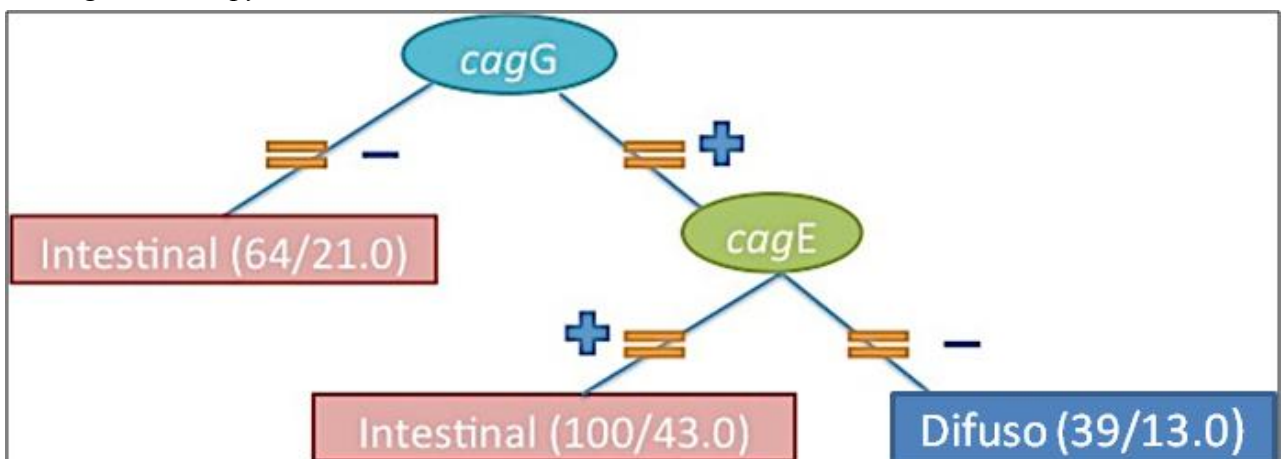
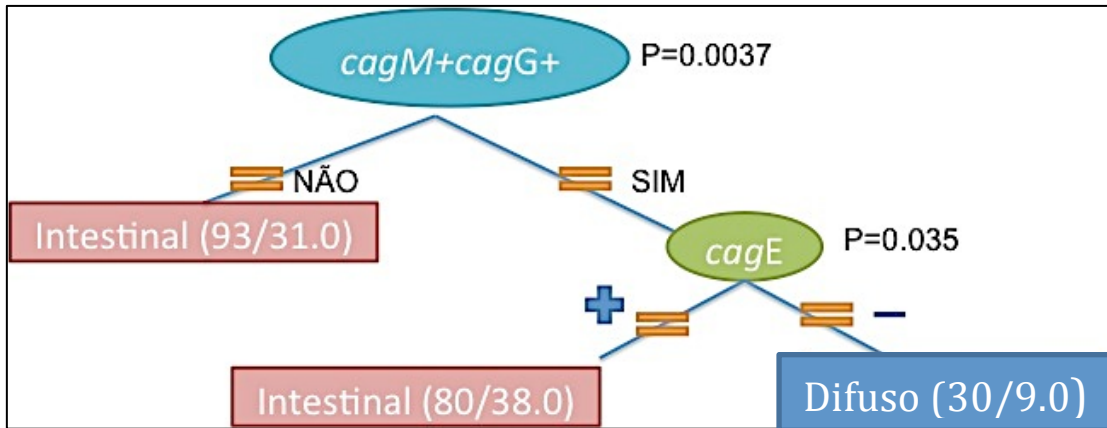


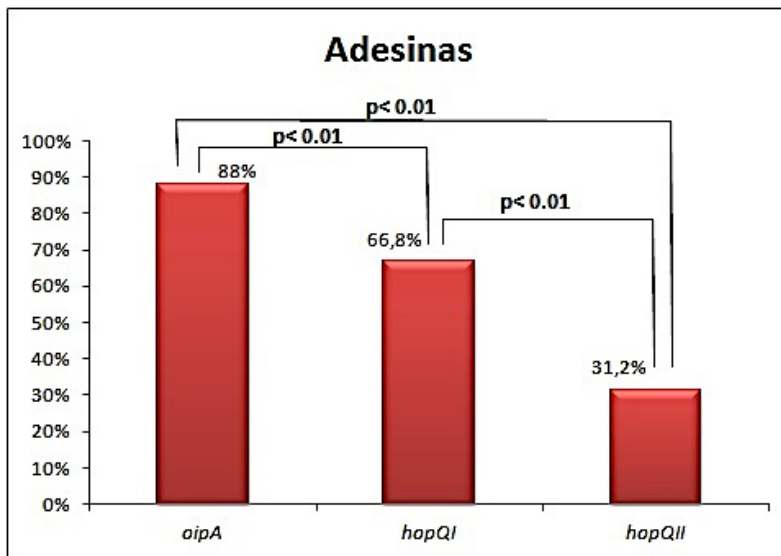
Imagem 2. Árvore de classificação utilizando os dados *vacAs1* e *vacAs2*, os subtipos intestinal e difuso e os 6 genes de *H.pylori* adicionados das combinações *cagA(-)cagG(-)* e *cagM(+)**cagG(+)*.



Considerando genes de *cagII*, não foi encontrada nenhuma associação com os diferentes subtipos histológicos. No entanto quando foi feita uma análise dos genes de *cagII* em relação aos genes de *cagI* foi observado que no subtipo intestinal a cepa *vacAs1 cagM(+)**cagT(+)**virB11(+)* foi estatisticamente mais frequente que no difuso ($p=0,0218$). Por outro lado, nos tumores difusos a cepa *cagG(+)**cagT(-)* *virB11(-)* foi estatisticamente mais frequente que nos intestinais ($p=0,0253$).

Distribuição dos genes de adesão de *H. pylori* considerando os genes *cagA*, *cagE* e alelos de *vacA*

O gráfico 4 mostra a distribuição dos genes de adesão estudados. O gene *oipA* foi observado na maioria das amostras, sendo este estatisticamente mais frequente ($p < 0.01$), seguido por *hopQI* e *hopQII* ($p < 0.01$).

Gráfico 4. Frequência dos genes de *H. pylori* em relação a adesinas

Nas análises de associação dos genes de adesina com os genes de patogencidade de *H. pylori*, em um primeiro momento os genes *oipA* e *hopQ* foram agrupados individualmente de acordo com a presença dos genes *cagA*, *cagE* e alelos de *vacA* em ambos subtipos histológicos (tabela 6). Nesta análise foi observado que os genes *oipA* e *hopQI* foram estatisticamente mais frequentes associados a cepas *vacAs1 cagA(+)**cagE(+)* em ambos subtipos considerando como referência a contrapartida negativa. No subtipo intestinal ambos, *oipA* e *hopQI* foram também associados a cepas com a presença de *cagE* ou *cagA*. No entanto, no subtipo difuso houve apenas uma tendência de *oipA* com cepas *cagA* positivas. Por outro lado para cepas com o gene *hopQII* houve apenas um tendência associada as cepas *cagA(+)**cagE(+)* no subtipo intestinal.

Na análise das combinações do gene *oipA* com as variações alélicas de *hopQ* foi observado que a presença do gene *oipA* foi estatisticamente associado a *hopQI* comparado com a associação com *hopQII* (62,1% vs 27,7%; $p > 0.01$). Considerando os subtipos histopatológico e alelos de *vacA*, essa associação se manteve nas cepas *vacAs1* nos dois subtipos histológicos. Por outro lado, nas cepas *oipA* negativas foi observado no tumores difuso uma frequência estatisticamente significativa de *hopQI* nas amostras *vacAs1* e *hopQII* nas amostras *vacAs2*. No intestinal, apesar de não ser significativo houve essa mesma tendência (gráficos 5 e 6).

Tabela 6. Distribuição do gene *oipA* e variações de *hopQ* considerando os genes *cagA* e *cagE*, alelos de *vacA* em ambos subtipos histológicos

| Intestinal | | <i>oipA</i> | | | | | |
|-------------------------------|-----------|--------------------|----------------|-----------|--------|----------------|---------------|
| Grupos | <i>s1</i> | | P s1 vs ref | <i>s2</i> | | P s2 vs ref | P s1 vs s2 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> | 50 | 48,5% | 0.000 | 5 | 26,32% | 0.692 | 0.073 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> | 23 | 22,3% | 0.013 | 7 | 36,84% | 0.269 | 0.177 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> | 20 | 19,4% | 0.048 | 4 | 21,05% | 1.000 | 0.869 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> | 10 | 9,7% | ref | 3 | 15,79% | ref | 0.424 |
| | 103 | | | 19 | | | |

| Difuso | | <i>oipA</i> | | | | | |
|-------------------------------|-----------|--------------------|----------------|-----------|-------|----------------|---------------|
| Grupos | <i>s1</i> | | P s1 vs ref | <i>s2</i> | | P s2 vs ref | P s1 vs s2 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> | 38 | 47,5% | 0.000 | 6 | 33,3% | 0.711 | 0.274 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> | 13 | 16,3% | 0.499 | 4 | 22,2% | 1.000 | 0.508 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> | 19 | 23,8% | 0.064 | 4 | 22,2% | 1.000 | 1.00 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> | 10 | 12,5% | ref | 4 | 22,2% | ref | 0.281 |
| | 80 | | | 18 | | | |

| Intestinal | | <i>hopQI</i> | | | | | |
|-------------------------------|-----------|---------------------|----------------|-----------|-------|----------------|---------------|
| Grupos | <i>s1</i> | | P s1 vs ref | <i>s2</i> | | P s2 vs ref | P s1 vs s2 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> | 42 | 53,2% | 0.000 | 2 | 28,6% | 1.000 | 0.260 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> | 19 | 24,1% | 0.003 | 3 | 42,9% | 0.559 | 0.365 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> | 13 | 16,5% | 0.045 | 1 | 14,3% | 1.000 | 1.000 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> | 5 | 6,3% | ref | 1 | 14,3% | ref | 0.408 |
| | 79 | | | 7 | | | |

| Difuso | | <i>hopQI</i> | | | | | |
|-------------------------------|-----------|---------------------|----------------|-----------|-------|----------------|---------------|
| Grupos | <i>s1</i> | | P s1 vs ref | <i>s2</i> | | P s2 vs ref | P s1 vs s2 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> | 37 | 52,1% | 0.000 | 4 | 40,0% | 1.000 | 0.518 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> | 12 | 16,9% | 0.478 | 2 | 20,0% | 1.000 | 0.681 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> | 13 | 18,3% | 0.353 | 1 | 10,0% | 0.582 | 1.000 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> | 9 | 12,7% | ref | 3 | 30,0% | ref | 0.163 |
| | 71 | | | 10 | | | |

| Intestinal | | <i>hopQII</i> | | | | | |
|-------------------------------|-----------|----------------------|----------------|-----------|-------|----------------|---------------|
| Grupos | <i>s1</i> | | P s1 vs ref | <i>s2</i> | | P s2 vs ref | P s1 vs s2 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> | 13 | 38,2% | 0.058 | 4 | 28,6% | 0.648 | 0.741 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> | 8 | 23,5% | 0.548 | 5 | 35,7% | 0.384 | 0.387 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> | 7 | 20,6% | 0.757 | 3 | 21,4% | 1.000 | 1.000 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> | 6 | 17,6% | ref | 2 | 14,3% | ref | 1.000 |
| | 34 | | | 14 | | | |

| Difuso | | <i>hopQII</i> | | | | | |
|-------------------------------|-----------|----------------------|----------------|-----------|-------|----------------|---------------|
| Grupos | <i>s1</i> | | P s1 vs ref | <i>s2</i> | | P s2 vs ref | P s1 vs s2 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(+)</i> | 6 | 31,6% | 0.447 | 5 | 45,5% | 0.148 | 0.447 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(+)</i> | 2 | 10,5% | 1.000 | 2 | 18,2% | 1.000 | 0.611 |
| <i>cagA(+)</i> <i>cagE(-)</i> | 8 | 42,1% | 0.151 | 3 | 27,3% | 0.586 | 0.466 |
| <i>cagA(-)</i> <i>cagE(-)</i> | 3 | 15,8% | ref | 1 | 9,1% | ref | 1.000 |
| | 19 | | | 11 | | | |

Gráfico 5. Distribuição dos genótipos de *H. pylori* considerando a combinação dos genes de adesão e alelos de *vacA* no subtipo intestinal.

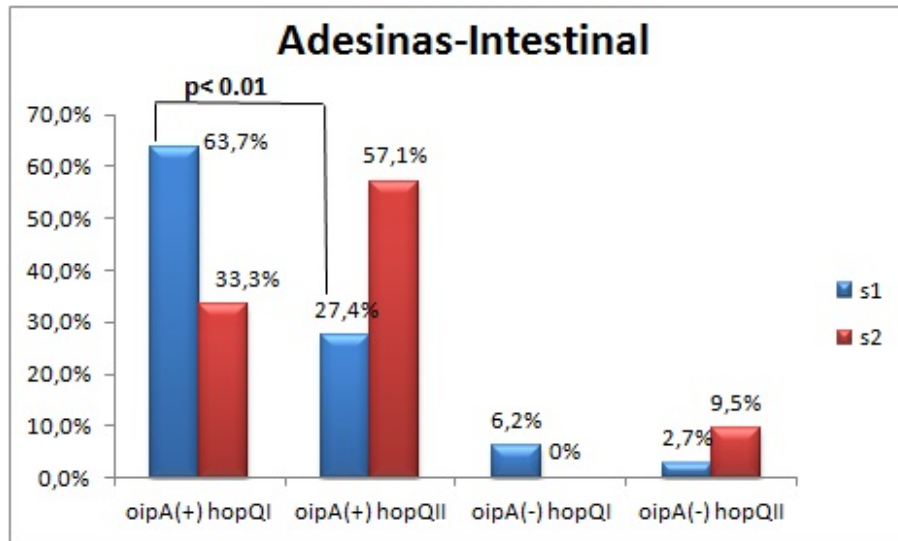
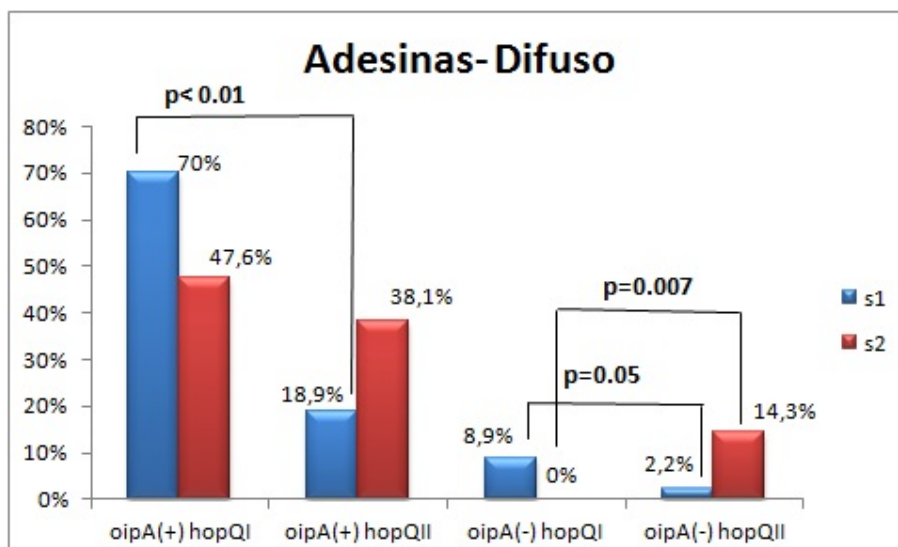


Gráfico 6. Distribuição dos genótipos de *H. pylori* considerando a combinação dos genes de adesão e alelos de *vacA* no subtipo difuso.



Em resumo, estes dados indicam que estudos sobre a virulência da bactéria *Helicobacter pylori* devem ser associados com os diferentes subtipos histológicos de câncer gástrico. Nesse estudo, alguns genes como *cagG* e *cagE* (em cepas *vacAs1*) se mostraram fundamentais na separação dos subtipos histológicos de câncer gástrico. A presença dos genes *cagG* e *cagE* concomitantemente, ou ausência de *cagG* nessa bactéria parece classificar o tumor em intestinal. Enquanto que a presença do gene *cagG* associado a ausência de *cagE* classifica os tumores em difusos. Interessante que o genótipo *cagM (+)**cagG(+)* também fez essa separação dos tumores. Sua associação com a presença do gene *cagE* classifica o tumor em intestinal, já na sua ausência tumores difusos. Apesar da complexidade de explicar quais são os fatores que contribuem para a separação das cepas nos subtipos intestinal e difuso, é notório que existem vias diferentes associadas a essas cepas. E que estes genes podem ser potenciais marcadores de diferentes subtipos histológicos.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Protocolo de Coleta no Centro cirúrgico

Durante todo o procedimento utilizar máscara e luvas estéreis.

- 1- Conferir o material a ser utilizado para coleta (Identificação do pacientes, máquina fotográfica, régua, caneta para tubo, criotubo estéril e protocolo a ser preenchido);
- 2- Identificar os tubos com o número da amostra, tipo de mucosa (tumoral ou normal) e a data (Ex.: CG-01-N1/D-M-2004);
- 3- Após a retirada da peça, colocá-la em cuba estéril e lavá-la com soro fisiológico estéril (se necessário). Secá-la com compressa estéril;
- 4- colocar a peça em um campo azul estéril, em seguida a régua e a identificação logo abaixo da peça, tirar uma foto panorâmica e uma foto somente do tumor utilizando flash (total 2 fotos);
- 5- Com o auxílio de pinça e bisturi estéreis, coletar primeiramente quatro espécimes da mucosa normal (o mais distante do tumor), em seguida quatro espécimes do tumor (preferencialmente as bordas, evitando as áreas de necrose e fibrose), colocar o material colhido dentro do criotubo estéril e acondicioná-los imediatamente em recipiente com gelo;
- 6- Tirar uma foto da peça pós-coleta com flash e sem régua;
- 7- Preencher o cadastro do tecido da peça cirúrgica em duplicata e desenhar um esboço marcando os locais dos quais foram coletados, bem como as margens cirúrgicas e o tamanho do tumor;
- 8- Transportar imediatamente os tubos para armazenagem em nitrogênio líquido.

APÊNDICE B – Parecer do Comitê de Ética



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 220/12

Fortaleza, 05 de julho de 2012.

Protocolo COMEPE nº 326/11

Pesquisador responsável: Silvia Helena Barem Rabenhorst.

Título do Projeto: "Estudo de suscetibilidade genética, caracterização de fatores etiológicos e identificação de marcadores com aplicabilidade para prevenção e prognóstico".

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 04 de julho de 2012.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório parcial e final do referido projeto.

Atenciosamente,


Dr. Francisco A. Viola Bezerra
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/HGF

Fortaleza, 24 de abril de 2013.

Ilma. Sra. comunicamos-lhe o parecer do CEP


Pesquisadora: **Sílvia Helena Barem Rabenhorst**
Projeto Intitulado: **Polimorfismo de interleucinas e enzimas do sistema de reparo ao estresse oxidativo no câncer gástrico: associado com helicobacter pylori**
Protocolo do CEP: **071002/10**

Parecer:

O CEP-HGF aprovou a Emenda do projeto acima citado pois o mesmo já havia sido aprovado neste CEP em 07/10/10, porém o pesquisador não conseguiu amostra suficiente e com isto solicitou uma extensão do prazo para coleta de dados feito apenas um Ad-referendum.

Lembramos ao pesquisador o cumprimento da referida Resolução na condução científica do seu projeto e ainda, o encaminhamento ao CEP do relatório final da pesquisa bem como à devolução dos resultados à comunidade

Atenciosamente,



Dr^a. Ilvana Lima Verde Gomes
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HGF

APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado pela Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst a participar como voluntário de uma pesquisa. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos as etapas desta pesquisa sejam devidamente esclarecidas.

A pesquisa intitulada *Estudo de suscetibilidade genética, caracterização de fatores etiológicos e identificação de marcadores com aplicabilidade para e prevenção e prognóstico* está sendo realizada pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. O estudo em questão pretende analisar características genéticas do paciente e alguns hábitos que podem levar ao desenvolvimento do câncer gástrico, nos ajudando a identificar os fatores de risco, tais como a presença de uma bactéria chamada *H.pylori* e de um vírus chamado EBV. Estes microorganismos serão identificados por meio da presença do material genético destes agentes infectantes no tumor. Serão também observadas as alterações genéticas das células tumorais. Essas alterações serão vistas pela expressão de proteínas ou pela análise do DNA/RNA do tumor.

Participarão deste estudo 200 pacientes atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídeo. Portanto, concordando em participar, você será um dos pacientes participantes que permitem a coleta do material tumoral do estômago além de uma amostra de sangue necessários para o estudo. Esta coleta não irá afetar o diagnóstico da sua doença ou o tratamento. Paralelamente, serão anotadas algumas questões referentes a seus dados pessoais, como data de nascimento, hábitos de vida e em relação à sua doença. Estas informações serão retiradas do seu prontuário ou na ausência delas, serão perguntadas pessoalmente a você.

Sua participação não terá benefício direto imediato, em princípio, mas que poderá contribuir para que se entenda melhor os fatores de risco e alterações que propiciem o aparecimento do câncer gástrico. A identificação dos fatores de risco para o câncer gástrico servirá para direcionar medidas preventivas. Por outro lado, as alterações genéticas encontradas no material coletado auxiliarão no diagnóstico, na avaliação da gravidade da doença e também podem dar informações para novos tratamentos que estão sendo desenvolvidos.

Todos os dados da sua participação neste estudo serão documentados e mantidos em sigilo, sendo disponíveis apenas para as autoridades de saúde e profissionais envolvidos neste estudo, os quais, quando necessário, terão acesso ao seu prontuário.

Como sua participação é voluntária, você poderá abandonar o estudo a qualquer momento, sem que isso resulte em qualquer penalidade ou perda de seus direitos onde você recebe atendimento médico.

Endereço da responsável pela pesquisa:

Nome: Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst
Ceará

Instituição: Universidade federal do

Endereço: Rua: Marcos Macedo, 1301, Apto 802.

Telefone: 3366-8639/9994-5689

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a sua participação na pesquisa entre em contato com o Comitê de ética em pesquisa da UFC - Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo 3366-8344.

Eu, _____, _____ anos, RG: _____, declaro que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário da pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que após sua leitura tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu

conteúdo, como também sobre a pesquisa e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. Declaro ainda estar recendo uma cópia assinado deste termo.

Fortaleza, ___/___/___
Nome _____ do Voluntário _____ Data ___/___/___

Assinatura _____
Nome _____ do Pesquisador _____ Data ___/___/___

Assinatura _____
Nome da testemunha _____ Data ___/___/___ Assinatura _____

(se o voluntário não souber ler)

Nome _____ do profissional _____ Data ___/___/___
Assinatura _____

que aplicou o TCLE

APÊNDICE D – Cadastro de Pacientes Submetidos à Coleta de Tecido de Peça Cirúrgica

Nº Prontuário _____ Data de admissão no serviço hospitalar ___/___/___
 Depto Responsável _____ Hospital _____
 Nome _____ Sexo F [] M []
 Endereço _____
 Contato _____ Naturalidade _____ Procedência _____
 Idade _____ Nasc ___/___/___ Cor _____ ABO _____
 Grau de instrução _____ Profissão _____

História familiar:

[] Avô [] Avó [] Mãe [] Pai [] Irmão(ã) [] Tio(a) [] Filho(a) Outros _____

Hábitos: [] Sal [] Frutas [] Verduras [] Churrasco [] Carne seca [] Geladeira
 [] Tabagista Tipo _____ Freqüência _____ Fum. passivo []
 [] Álcool Tipo _____ Freqüência _____

Dados relativos à neoplasia.

Data do primeiro diagnóstico ___/___/___ Exam _____

H. pylori []

Sítio anatômico _____ Est. Clínico T ___ N ___ M ___

Aspecto morfológico _____ Bormann _____

Exame anatomopatológico Nº: _____

Tratamento: [] Radioterapia [] Quimioterapia [] Hormonioterapia [] Imunoterapia
 Protocolo _____

Cirurgia: realizada em ___/___/___ Cirurgião _____

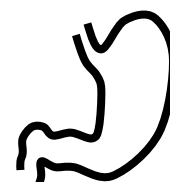
Responsável pela Coleta _____

Tempo de ressecção da coleta: [] <1h [] 1h [] 2h [] 3h [] < ou =4h [] Outras _____

Observações

Nº de amostra Tumoral congelada [] Nº de amostra Normal []

Local Armazenamento: _____



ANEXOS – PUBLICAÇÕES ORIGINADA A PARTIR DO TRABALHO

Association of the polymorphism in DNA Repair Enzymes and *E-Cadherin* Gene with Gastric Carcinoma Risk in population from Brazil

ELIANE DOS SANTOS PEREIRA

Department of Pathology and Forensic Medicine,
Federal University of Ceará, Brazil;

ISABELLE JOYCE DE LIMA SILVA-FERNANDES

Department of Pathology and Forensic Medicine
Federal University of Ceará, Brazil

DÉBORA MENEZES DA COSTA

Department of Pathology and Forensic Medicine
Federal University of Ceará, Brazil

ROMMEL MARIO RODRIGUEZ BURBANO

Human Cytogenetics Laboratory,
Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará,
Belém, Brazil

SILVIA HELENA BAREM RABENHORST

Department of Pathology and Forensic Medicine
Federal University of Ceará, Brazil

Abstract:

*SNPs have been associated with gastric cancer susceptibility. Thus, we evaluated the influence of SNPs in DNA repair genes APE1 2197(T>G) and MLH1 -93(G>A), as well as in CDH1 at positions -160 (C>A) and -347 (G>GA) in gastric cancer risk. Analyses were performed on 264 GC patients and 391 healthy controls matched by age and sex from two regions in Brazil, Ceará and Pará. In the general analysis, a protective was found for the GGA of the CDH1-347 (G>GA). Considering the GC subtypes, the polymorphic allele of both CDH1 SNPs was associated with protection to intestinal subtype. In this subtype, the MLH1 (G>A) allele A was associated with risk, contrast with protection to diffuse subtype. In females, a risk was associated with AA genotype of MLH1 (G>A) and a protection with APE1 (T>G) and CDH1 -347 (G>GA) polymorphic alleles. Considering *H. pylori*,*

2015 Advances in *Helicobacter pylori*

What exists beyond *cagA* and *vacA*? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases

Débora Menezes da Costa, Eliane dos Santos Pereira, Sílvia Helena Barem Rabenhorst

Débora Menezes da Costa, Eliane dos Santos Pereira, Sílvia Helena Barem Rabenhorst, Molecular Genetics Laboratory, Department of Pathology and Forensic Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Ceará 60430-270, Brazil

Author contributions: da Costa DM and Pereira ES contributed equally to this work and wrote the paper; Rabenhorst SHB designed the study and revised the paper.

Conflict-of-interest statement: The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Correspondence to: Dr. Sílvia Helena Barem Rabenhorst, Molecular Genetics Laboratory, Department of Pathology and Forensic Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo Street, 1315 - Rodolfo Teófilo - Fortaleza, Ceará 60430-270, Brasil. srabenhorst@yahoo.com.br
Telephone: +55-85-99945689
Fax: +55-85-32673840

Received: April 23, 2015
Peer-review started: April 24, 2015
First decision: June 2, 2015
Revised: June 13, 2015
Accepted: August 25, 2015
Article in press:
Published online: October 7, 2015

Abstract

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection is present in more than half the world's population and has been

associated with several gastric disorders, such as gastritis, peptic ulceration, and gastric adenocarcinoma. The clinical outcome of this infection depends on host and bacterial factors where *H. pylori* virulence genes seem to play a relevant role. Studies of *cagA* and *vacA* genes established that they were determining factors in gastric pathogenesis. However, there are gastric cancer cases that are *cagA*-negative. Several other virulence genes have been searched for, but these genes remain less well known than *cagA* and *vacA*. Thus, this review aimed to establish which genes have been suggested as potentially relevant virulence factors for *H. pylori*-associated gastrointestinal diseases. We focused on the *cag*-pathogenicity island, genes with adherence and motility functions, and *iceA* based on the relevance shown in several studies in the literature.

Key words: *Helicobacter pylori*; Virulence genes; Cag-PAI; Motility genes; Adhesion genes

© The Author(s) 2015. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is present in more than half the world's population and has been associated with several gastric disorders. The clinical outcome of this infection depends on host and bacterial factors. Studies have established that *cagA* and *vacA* *H. pylori* genes are determining factors in gastric pathogenesis. This review aimed to examine which genes have been suggested as potentially relevant virulence factors for *H. pylori*, focusing on the *cag*-pathogenicity island, adherence and motility genes, and *iceA* based on the relevance shown in several studies.

da Costa DM, Pereira ES, Rabenhorst SHB. What exists beyond *cagA* and *vacA*? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases. *World J Gastroenterol* 2015; 21(37): 10563-10572 Available

Characterization of Gastric Cardia Tumors: Differences in *Helicobacter pylori* Strains and Genetic Polymorphisms

Débora Menezes da Costa¹ · Eliane dos Santos Pereira¹ · Isabelle Joyce de Lima Silva-Fernandes¹ · Márcia Valéria Pitombeira Ferreira¹ · Sílvia Helena Barem Rabenhorst¹

Received: 20 February 2015 / Accepted: 9 April 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract

Background Gastric cancer results from a multifactorial process and is one of the most common causes of death worldwide. These tumors can arise in the distal stomach (non-cardia) and in the cardia region, presenting different characteristics and frequency of occurrence worldwide.

Aims To search for differences between tumors of different locations that could explain the presence of cardia tumors, considering *Helicobacter pylori* strains and genetic polymorphisms.

Materials and Methods DNA was extracted from gastric adenocarcinoma tissue of 127 patients. *Helicobacter pylori* genes were detected by PCR, and polymorphisms by PCR-RFLP.

Results Most of the tumors were located in non-cardia. The genotype 28152GA of *XRCC1* showed an increase in risk of cardia tumors. In analysis performed considering gender, women carrying *TNF*-308GA genotype showed a decreased risk of non-cardia tumors, while in men the decreased risk of non-cardia tumors was associated with *TNF*-308GG genotype. Genotypes combinations showed that the SNPs *RAD51* 135G>C, *XRCC3* 18067C>T, and

XRCC1 28152G>A had some combinations more frequent in cardia tumors, with an increased risk. Patients infected by *cagE*-positive strains presented a positive correlation with non-cardia tumors.

Conclusion The results showed some susceptibility differences between tumors of different locations. There was an increased risk relationship between three repair enzyme SNPs and cardia tumors, and the G allele of the cytokine gene *TNF* negatively influenced the development of non-cardia tumors. *Helicobacter pylori* strains seemed to be different in the cardia region, where they were less virulent than those located in the distal region of the stomach.

Keywords Cardia tumors · *Helicobacter pylori* · Repair enzymes · Interleukins

Introduction

Gastric cancer is one of the most common causes of death worldwide. The prognosis of this disease is poor, particularly in Brazil, with a 5-year survival rate of 20–30 %, since most cases are diagnosed with advanced stage [1]. While *Helicobacter pylori* infection is a well-established cause of gastric cancer, different environmental and genetic factors (e.g., *H. pylori* virulence genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the host's genes) are involved in different stages of the cancer process [2]. Gastric tumors can arise in the distal stomach (non-cardia) and in the cardia region, and in the last four decades, there has been an increase in cases of cardia cancer, mainly in developed countries with remarkable geographic aggregation [3, 4]. These tumors seem to be different in some characteristics, and they are now recognized as two different clinical entities. However, what predisposes the

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10620-015-3666-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Débora Menezes da Costa
debora_mcosta@hotmail.com

Sílvia Helena Barem Rabenhorst
srabenhorst@yahoo.com.br

¹ Molecular Genetics Laboratory, Department of Pathology and Forensic Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Street Coronel Nunes de Melo, 1315 – Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará 60430-270, Brazil

Special Article - Stomach Cancer

Low Virulence of *Helicobacter Pylori* and Gastric Cancer: the Contribution of Polymorphisms of *iNOS* and DNA Repair Enzymes

Isabelle Joyce de Lima Silva-Fernandes, Igor Costa Menezes, AnaPaula Santos do Carmo, Débora Menezes da Costa, Emanuele Silva de Oliveira, Elianedos Santos Pereira and Silvia Helena BaremRabenhorst*

Department of Pathology and Forensic Medicine, Federal University of Ceará, Brazil

*Corresponding author: Rabenhorst SHB, Department of Pathology and Forensic Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo, 1315, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE CEP 60430-270, Brazil, Tel: +55 85 9994 5689; Fax: +55 85 32673840; Email: srabenhorst@yahoo.com.br

Received: August 06, 2014; Accepted: September 08, 2014; Published: September 10, 2014

Abstract

This study aimed to investigate the interaction between the *iNOS* C>T polymorphism, the genotype of *H. pylori* strains and polymorphisms in DNA repair genes (*OGG-1*, *APE-1* and *PARP-1*) in a set of gastric cancer patients. In our methods, polymorphism was assessed by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and *H. pylori* detection/genotyping by PCR. A significant result shows this *iNOS* polymorphism more frequent among young gastric cancer patients than older patients ($p=0.020$). Host genetic features, such as DNA repair enzymes (*OGG-1*, *APE-1*, *PARP-1*), are also important in preventing the malignancy process. Polymorphisms present in these enzymes associated with *iNOS* activity could lead to gastric cancer even in the presence of low virulent *H. pylori* strains. Within our results, *iNOS* homozygous wild-type (CC) genotype and *APE-1* polymorphic allele (TG+GG) group were more infected by *H. pylori* low-virulent strains ($p=0.021$). In Conclusion, our study indicates the importance of *H. pylori* and host DNA repair enzymes genotypes in gastric carcinogenesis in interaction with this specific *iNOS* polymorphism.

Keywords: Gastric cancer; *Helicobacter pylori*; *PARP-1*; *APE-1*; *OGG-1*

Introduction

Gastric cancer is the fifth most common cancer and the second leading cause of cancer-related mortality in the world [1]. In Brazil, it is an important cause of cancer-related death in patients, with a high prevalence in the Northeast region [2]. According to Lauren's classification, the histological subtypes, intestinal and diffuse, show distinct histological and epidemiological features, as well as a different prognosis [3,4]. Furthermore, this tumor can be located in the proximal stomach (cardia), or distal (antrum, non-cardia). Differences between tumors located in the cardia or non-cardia region, as well as intestinal or diffuse subtypes, suggests that they represent distinct diseases with different etiologies. Gastric carcinogenesis is a multifactorial process, and *Helicobacter pylori* is the main initiator of inflammation and atrophic changes in the gastric mucosa [5]. The association between chronic *H. pylori* infection and the development of gastric cancer is well established [6]. It is known that both bacterial virulence and host genetic susceptibility are associated with cancer risk [7].

H. pylori has a great genetic diversity, and virulence factors play important roles in mucosal injury, especially the genes *cagA* (cytotoxin associated gene A) and *vacA*, (vacuolating cytotoxin A), more specifically *vacAs1m1*. *cagA* is involved in many host cell alterations and tightly associated with gastric cancer risk [8,9]. The *vacA* gene is present in essentially all *H. pylori* strains. *VacA* is a potent toxin, where it induces the formation of vacuoles in host cells. Additionally, the *cagE* and *virB11* genes have been found at a relevant frequency in gastric cancer patients [10]. The chronic inflammatory process in the presence of *H. pylori* increases the expression of *iNOS* and can generate large amounts of reactive oxygen species (ROS),

which could lead to cell injury, with large amounts of NO leading to DNA lesions [11,12]. The DNA damage caused by ROS can lead to gene alterations and, therefore, requires continuous DNA repair.

Polymorphism in the *iNOS* gene that leads to increased expression or altered function of the enzyme could affect the level of the DNA lesions and therefore increase DNA damage. In this context, Daff et al. [13], using a bacterial culture, found a deletion located six amino acids from the currently studied C>T polymorphism in exon 16. The proximity between this deletion and C>T polymorphism has been suggested by Jing Shen et al. [14] and Jesper Johannesen et al. [15] to account for the increase in *iNOS* activity. The increased activity is associated with several types of diseases, such as bladder cancer [16,17], and diabetes [18], besides gastric cancer [14].

Recently, host genetic susceptibility to cancer related to polymorphisms in DNA repair enzymes has been investigated [19,20]. In gastric cancer, our team observed and reported before [21] that polymorphisms in some enzymes of the base excision repair (BER) system, responsible for recognizing and removing the damaged base, should be investigated such as the following: *OGG-1* Ser326Cys [22,23], associated with reduced DNA repair capacity [24]; *APE-1* Asn148Glu [25,26], associated with increased sensitivity to ionizing radiation in homozygosis [26]; and *PARP-1* Val762Ala, associated with gastric cancer risk besides *cagA(+)* *H. pylori* infection [27].

Therefore, this study aimed to investigate the interaction between the *iNOS* C>T polymorphism, the genotype of *H. pylori* strains and polymorphisms in DNA repair genes (*OGG-1*, *APE-1* and *PARP-1*) in a set of gastric cancer patients.