

**MANUEL BONFIM BRAGA NETO**

**ESTRESSE OXIDATIVO E GENÓTIPO DO *H. pylori* EM PACIENTES  
PORTADORES DE CÂNCER GÁSTRICO E SEUS FAMILIARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas. Área de concentração: Estresse celular em pacientes infectados com *H. pylori*.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

**FORTALEZA**

**2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

---

B794e Braga Neto, Manuel Bonfim.

Estresse oxidativo e genótipo do *h. pylori* em pacientes portadores de câncer gástrico e seus familiares. / Manuel Bonfim Braga Neto. – 2015.

83 f.: il. color.

Tese (doutorado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico- Cirúrgica, Doutorado em

Cirurgia, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Estresse celular em pacientes infectados com *H. pylori*.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Neoplasias Gástricas. 3. Estresse Oxidativo. I. Título.

CDD 616.9943

---

**MANUEL BONFIM BRAGA NETO**

**ESTRESSE OXIDATIVO, GENÓTIPO DO *H. pylori* EM PACIENTES  
PORTADORES DE CÂNCER GÁSTRICO E SEUS FAMILIARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Renata Carvalho Leitão  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Cícero Igor Simões Moura Silva  
Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

---

Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Marcos Aurélio Pessoa Barros  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

À Deus, por me ensinar a persistir diante dos obstáculos e a sempre acreditar nos meus sonhos.

Ao meu pai e à minha mãe, por todo o apoio e por me ensinarem o valor do trabalho árduo e da humildade.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. LUSMAR VERAS RODRIGUES, Professor Titular do Departamento de Cirurgia e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará.

Ao Prof. Dr. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, Professor Titular do Departamento de Cirurgia, vice-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, pela orientação, dedicação, apoio, competência e amizade.

À Prof. Dra. GERLY ANNE DE CASTRO BRITO, Professora Titular do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, pelo exemplo de pesquisadora e pessoa, sempre humilde, paciente, por todo o apoio desde a graduação.

À Prof. Dra. LUCIA LIBANEZ BESSA CAMPELO BRAGA, Professora Titular do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal do Ceará, pelo exemplo de professora, médica e pesquisadora.

À equipe do Laboratório de Pesquisa em Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da UFC, TIAGO BARBOSA DE MELO e TIAGO GOMES DA SILVA BENIGNO, CÍCERO IGOR SIMÕES DE CAVALCANTE, MARIA APARECIDA ALVES OLIVEIRA, KASSIANE COSTA MAIA e BRUNA DEISE GURGEL MAIA pela valiosa colaboração para realização desse estudo.

A DEIZIANE VIANA DA SILVA COSTA, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará pela amizade, apoio, contribuição fundamental para realização de experimentos e pela ajuda com a formatação dessa tese e ao MÁRCIO FLÁVIO ARAÚJO GUANABARA BENIGNO, aluno de iniciação científica da Universidade Federal do Ceará pela ajuda com os experimentos e formatação dessa tese.

À Profa. Dra. DULCIENE MARIA MAGALHÃES QUEIROZ, Professora Titular do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, exemplo de pesquisadora brilhante e dedicada, pelo inestimável apoio ao nosso grupo de pesquisa, e por ter realizado o sequenciamento do DNA nas amostras de tecido gástrico.

Às Sras. MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA MARIA GOMES FONTENELE, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará pelo carinho dispensado.

## RESUMO

O câncer gástrico está relacionado a infecção por *H. pylori*, fatores ambientais e predisposição genética. Familiares de pacientes com câncer gástrico (FC) têm maior risco de desenvolvimento da doença, possivelmente, em decorrência da infecção por cepas mais virulentas de *H. pylori* e predisposição genética relacionado a citocinas pró-inflamatórias e o stress oxidativo. O objetivo do estudo foi: 1) avaliar o estresse oxidativo em pacientes portadores de câncer gástrico (CG), dispépticos sem história familiar de câncer gástrico (NFC), e familiares de câncer gástrico de primeiro grau (FC); 2) averiguar em FC e NFC a prevalência dos genótipos de *H. pylori* *homA*, *homB*, *cagE* e, em pacientes portadores de CG, avaliar se o gene *cagE* está associado a essa neoplasia e o padrão dos sítios de fosforilação EPYIA da proteína *cagA*. Estudo foi realizado no Hospital Universitário Walter Cantídio. O estresse oxidativo foi avaliado no soro através da dosagem de glutatona reduzida (GSH), antioxidante, e malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica. Realizou-se extração de DNA da biópsia gástrica, seguida de PCR e eletroforese para os genes *ureA*, *vacA*, *homA*, *homB*, *cagA* e *cagE*. Foi avaliado a concentração sérica de MDA e GSH em 213 indivíduos (54 CG, 91 FC e 68 NFC). O grupo CG apresentou concentrações de MDA mais elevado e de GSH mais baixo quando comparado com o grupo sem neoplasia ( $p=0.001$  e  $p=0.005$ , respectivamente). Os genótipos de *H. pylori* foram avaliados em 186 pacientes (48 CG, 74 FC e 64 NFC). A prevalência geral de *cagE* na amostra foi de 54,3% (101/186), sendo 70% (52/74) no grupo FC, 52% (25/48) no grupo de CG e 36% (24/87) no grupo NFC. Houve associação significativa, mesmo após análise multivariada, entre o genótipo *cagE* e o grupo de FC (OR 3,357; IC 2,026 - 9,476 95%:  $p=0,001$ ) e entre *homB* e o grupo FC (OR 2,357; IC 95%: 1,401 – 3,961;  $p=0,001$ ). Foram incluídas 46 amostras de CG *cagA* positivas para avaliação dos sítios EPIYA da proteína CagA. Todas as cepas avaliadas apresentaram padrão EPYIA-C, e aproximadamente 50% de cepas mistas. O presente estudo mostra que pacientes portadores de câncer gástrico possuem estresse oxidativo aumentado. Os indivíduos FC estão infectados com maior prevalência por cepas virulentas de *H. pylori*, *cagE* e *homB*. Além disso, os pacientes portadores de câncer gástrico apresentaram prevalência elevada de cepas mistas de *H. pylori* quanto ao segmentos EPIYA C da proteína CagA. Possivelmente, diminuir a peroxidação lipídica, aumentar a reserva de antioxidantes e identificar grupos de maior risco quanto ao perfil de cepas de *H. pylori* poderá ser importante para a prevenção do câncer gástrico.

**Descritores:** *H. pylori*. *homB*. *cagE*. Câncer gástrico. Familiares de câncer gástrico. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Gastric cancer is associated with *H. pylori* infection, environmental factors and genetic predisposition. Relatives of gastric cancer patients are at increased risk to develop cancer, possibly, due to infection by more virulent *H. pylori* strains and genetic predisposition associated with pro-inflammatory cytokines, which may, in turn, result in an exaggerated inflammatory response and oxidative stress. The aim of this study was to: 1) evaluate the oxidative stress in dyspeptic patients without family history of gastric cancer (NRC), patients with gastric cancer (GC) and relatives of gastric cancer (RC); 2) evaluate the prevalence of the *H. pylori* genotypes *homA*, *homB* and *cagE* in RC and NRC and determine if the *cagE* gene is associated with GC as well as the pattern of *cagA* EPIYA phosphorylation in GC. This study was performed at the Hospital Universitario Walter Cantúdeo (HUWC) in Fortaleza. Blood samples were collected and centrifuged to obtain serum, in order to measure the concentration of reduced glutathione (GSH), an anti-oxidant, and Malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation. DNA extraction was performed in gastric biopsies, followed by PCR and electrophoresis for *ureA*, *vacA*, *homA*, *homB*, *cagA* e *cagE* genes. The concentrations of MDA and GSH were evaluated in 213 patients (54 CG, 91 RC e 68 NRC). The group of CG had higher MDA and lower GSH concentrations when compared to the groups without cancer ( $p=0.001$  and  $p=0.005$ , respectively). The *H. pylori* genotypes were evaluated in 186 patients (48 CG, 74 RC and 64 NRC). The overall *cagE* prevalence was 54.3% (101/186), 70% (52/74) in the RC group, 52% (25/48) in the GC group and 36% (24/87) in the NRC group. A significant and independent association was found between the *cagE* genotype and the RC group (OR 3,357; IC 2,026 - 9,476 95%:  $p=0,001$ ) and between the *homB* genotype and the RC group (OR (OR 2,357; IC 95%: 1,401 – 3,961;  $p=0,001$ ). Forty six *cagA* positive samples from the GC group were included for gene sequencing to evaluate the EPIYA phosphorylation sites of the CagA protein. All of the strains studied had an EPIYA-C pattern and approximately 50% of the strains were mixed. This study demonstrates that patients with gastric cancer are under higher levels of oxidative stress. The group of RC have a higher prevalence of *cagE* and *homB*. The group of GC patients had a high prevalence of mixed strains regarding CagA EPIYA-C phosphorylation pattern. Decreasing the lipid peroxidation, increasing the antioxidant reserve and identifying groups at risk of infection with more virulent strains of *H. pylori* may be important to prevent gastric cancer.

**Key words:** *H. pylori*. *homB*. *cagE*. Gastric cancer. Relatives of gastric cancer. Oxidative stress.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b>	Polimorfismos estruturais da proteína CagA, Fortaleza Ce,2015	20
<b>Figura 2 -</b>	Genótipos <i>homA</i> e <i>homB</i> do <i>H. pylori</i> . Fortaleza Ce,2015	23
<b>Figura 3 -</b>	Gel de agarose para visualização das bandas do gene <i>cagE</i> ,Fortaleza Ce,2015	48
<b>Figura 4 –</b>	Gel de agarose para visualização das bandas do gene <i>hom</i> , Fortaleza Ce, 2015	51

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Distribuição dos grupos estudados por gênero, Fortaleza-Ce, 2015.	39
<b>Gráfico 2</b>	Distribuição dos grupos estudados por idade em anos, Fortaleza-Ce, 2015	40
<b>Gráfico 3</b>	Concentrações séricas de MDA em pacientes portadores de câncer gástrico CG, familiares de câncer gástrico (FC), e não familiares de câncer (NFC)	45
<b>Gráfico 4</b>	Concentrações séricas de GSH em pacientes portadores de câncer gástrico CG, familiares de câncer gástrico (FC), e não familiares de câncer (NFC).	45
<b>Gráfico 5</b>	Distribuição da amostra estudada de pacientes <i>H. pylori</i> positivos por faixa etária, Fortaleza-Ce, 2015.	46
<b>Gráfico 6</b>	Distribuição por gênero da amostra estudada de pacientes <i>H. pylori</i> -positivo, Fortaleza-Ce, 2015	47
<b>Gráfico 7</b>	Prevalência do gene <i>cagE</i> nos grupos estudados, Fortaleza-Ce, 2015.	49
<b>Gráfico 8-</b>	Distribuição do gene <i>hom</i> do <i>H. pylori</i> na amostra estudada (N= 138), Fortaleza-Ce, 2015.	50
<b>Gráfico 9</b>	Distribuição do gene <i>homA</i> e <i>homB</i> e <i>homA/B</i> do <i>H. pylori</i> em relação ao gênero, Fortaleza-Ce, 2015.	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela1</b>	Primers usados na amplificação dos genótipos estudados, Fortaleza Ce, 2015	35
<b>Tabela2</b>	Ciclos de amplificação para os genes, <i>ureA</i> , <i>cagE</i> <i>cagA</i> e <i>hom</i> , Fortaleza Ce, 2015.	36
<b>Tabela3</b>	Caracterização sócio-demográfica dos indivíduos familiares de primeiro grau de câncer gástrico e dispépticos sem história familiar dessa neoplasia, Fortaleza Ce, 2015	41
<b>Tabela4</b>	Associação das variáveis gênero, faixa etária, tabagismo, infecção por <i>H. pylori</i> e ser portador de câncer gástrico com as concentrações séricas de MDA e GSH na amostra populacional, Fortaleza Ce, 2015.	43
<b>Tabela5</b>	Comparação das concentrações séricas de MDA e GSH entre portadores de câncer gástrico e familiares de câncer gástrico e não familiares dessa neoplasia, Fortaleza Ce, 2015.	44
<b>Tabela6</b>	Relação não-ajustada entre variáveis e a presença do gene <i>cagE</i> em uma amostra de indivíduos <i>H. pylori</i> positivos, Fortaleza Ce, 2015.	49
<b>Tabela7</b>	Distribuição dos sítios EPIYA-C de amostras <i>cagA</i> -positivas provenientes de pacientes portadores de câncer gástrico, Fortaleza Ce, 2015.	53

## ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Ala</i>	Alanina
<i>babA</i>	Gene da adesina ligante ao antígeno Lewis b
<i>BabA</i>	Adesina ligante ao antígeno Lewis b
<i>cagA</i>	Gene associado à citotoxina A do <i>Helicobacter pylori</i>
<i>CagA</i>	Citotoxina A do <i>Helicobacter pylori</i>
<i>CagE</i>	Citotoxina E do <i>Helicobacter pylori</i>
<i>CagG</i>	Citotoxina G do <i>Helicobacter pylori</i>
<i>CagH</i>	Citotoxina H do <i>Helicobacter pylori</i>
<i>CagI</i>	Citotoxina I do <i>Helicobacter pylori</i>
<i>CagL</i>	Citotoxina L do <i>Helicobacter pylori</i>
<i>CagM</i>	Citotoxina M do <i>Helicobacter pylori</i>
<i>CagT</i>	Citotoxina T do <i>Helicobacter pylori</i>
<i>CagY</i>	Citotoxina Y do <i>Helicobacter pylori</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERK	Proteína quinase regulada por sinais extracelulares
<i>et. al.</i>	E outros
Glu	Ácido glutâmico
GSH	Glutathiona
GPX	Glutathiona peroxidase

GPX2	Glutaciona peroxidase-2
GPX2-GI	Glutaciona peroxidase – gastrointestinal
GSSH	Glutaciona redutase
GSSG	Glutaciona dissulfeto
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>hom</i>	Gene da membrana externa do <i>Helicobacter pylori</i>
Hom	Proteína da membrana externa do <i>Helicobacter pylori</i>
HopB	Porina da membrana externa do <i>Helicobacter pylori</i>
IL-1	Interleucina-1
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-1RN	Interleucina-1RN
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
Ile	Isoleucina
JAK	Janus-activating-kinase
LEC	Região terminal esquerda da ilha de patogenicidade <i>cag</i>
MALT	Tecido linfóide associado à mucos
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
MDA	Malondialdeído
MGMT	O <sup>6</sup> -metilguanina metiltansferase
NDPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
OipA	Proteína externa A inflamatória do <i>Helicobacter pylori</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pro	Prolina
<i>Rho kinase</i>	Proteína cinase GTPase Rho
ROS	Espécie reativa de oxigênio
Rpm	Rotações por minuto
<i>SabA</i>	Adesina ligante ao siálico ácido <i>Helicobacter pylori</i>
SHP2	Tirosina-fosfatase eucariótica-2
STAT3	Transdutores de sinal e ativadores da transcrição-3
Tnf- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
TFF1	Fator <i>Trefoil-1</i>
TFF2	Fator <i>Trefoil-2</i>
Tyr	Tirosina
<i>ureA</i>	Gene da urease A
<i>vacA</i>	Gene da citotoxina vacuolizante

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	17
1.1 <i>Helicobacter pylori</i> - Epidemiologia .....	17
1.2 Fatores de virulência do <i>Helicobacter pylori</i> .....	18
1.2.1 Ilha de patogenicidade <i>cag</i> .....	19
1.2.2 Gene <i>VacA</i> .....	21
1.2.3 Proteínas da membrana externa do <i>H.pylori</i> .....	22
1.3 <i>H.pylori</i> e câncer gástrico .....	23
1.4 Estresse oxidativo .....	26
1.5 Justificativa .....	28
2 OBJETIVOS .....	30
3 MÉTODOLOGIA.....	31
3.1 Casuística.....	31
3.2 Seleção dos pacientes .....	32
3.3 Desenho do estudo .....	32
3.4 Procedimento .....	32
3.4.1 Coleta de sangue .....	32
3.4.2 Determinação da concentração sérica da Glutathiona reduzida (GSH) .....	32
3.4.3 Determinação da concentração sérica de Malondialdeído (MDA) .....	33
3.4.4 Colheita de fragmentos de mucosa gástrica .....	33
3.4.5 Detecção de <i>H.pylori</i> .....	34
3.4.6 Extração do DNA de <i>H.pylori</i> em tecido de biópsia gástrica .....	34
3.4.7 Genotipagem para <i>ure A</i> .....	37
3.4.8 Genotipagem para <i>homA</i> e <i>homB</i> .....	37
3.4.9 Genotipagem para <i>cagA</i> e <i>cagE</i> .....	37
3.4.10 Amplificação e sequenciamento da região variável 3´ do gene <i>cagA</i> .....	37
3.5 Análise estatística.....	38
4 RESULTADOS .....	39
4.1 Avaliação de estresse oxidativo .....	39
4.1.1 Caracterização clínico-epidemiológica da amostra .....	39
4.1.2 Concentração sérica de Malondialdeído e Glutathiona reduzida .....	42
4.2 Avaliação dos genótipos do <i>H.pylori</i> .....	46
4.2.1 Caracterização da amostra .....	46

4.2.2 Avaliação do genótipo <i>cagE</i> do <i>H.pylori</i> em familiares (FC), não familiares de câncer gástrico (NFC) e portadores de câncer gástrico .....	47
4.2.3 Avaliação do genótipo <i>hom</i> do <i>H.pylori</i> em familiares (FC) e não familiares de câncer gástrico (NFC) .....	50
4.2.4 Caracterização dos sítios de fosforilação da região variável 3´do gene <i>cagA</i> nos portadores de câncer gástrico .....	52
5 DISCUSSÃO .....	54
6 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS .....	61
APÊNDICES .....	70
ANEXOS .....	78



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Helicobacter pylori* – Epidemiologia

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria Gram-negativa, flagelada e espiralada, produtora de catalase, urease e fosfolipase. A presença de urease é fundamental para sobrevivência dessa bactéria no meio ácido do lúmen gástrico, já que essa enzima catalisa a hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono, gerando um meio neutro na região pericelular (MOBLEY *et al.*, 2001).

O *H. pylori* foi descoberto por Robin Warren e Barry Marshall em 1983 a partir de amostras da mucosa gástrica de pacientes com úlcera. Em 1984, Marshall ingeriu concentrado da bactéria isolada, e desenvolveu gastrite transitória demonstrando que o *H. pylori* coloniza e desencadeia processo inflamatório no epitélio humano gástrico (MARSHALL *et al.*, 1985). Atualmente, diversos estudos evidenciaram o papel crucial da infecção por *H. pylori* para o desenvolvimento de patologias gastrointestinais tais como gastrite crônica, úlcera péptica (75% das úlceras gástricas e 90% úlceras duodenais), linfoma MALT (tecido linfóide associado a mucosa) e câncer gástrico (BLASER *et al.*, 1995 PARSONNET *et al.*, 1991).

A infecção ocorre predominantemente na infância e, se não tratada, pode persistir indefinidamente (EVERHART *et al.*, 2000). A via de transmissão dessa bactéria não está completamente elucidada. No entanto, vários estudos evidenciam que a transmissão ocorre através da via oral-oral (através do vômito ou, possivelmente, saliva) ou fecal-oral. São considerados fatores de risco para a infecção, baixo nível socioeconômico, condições sanitárias e de higiene precárias, agrupamento familiar e positividade da mãe e irmãos para *H. pylori* (RODRIGUES *et al.*, 2004, FIALHO *et al.*, 2010). Na maioria dos casos, a infecção crônica com *H. pylori* leva a uma gastrite leve. Somente 1-3% dos casos progridem para câncer gástrico, como demonstrado em um estudo “*follow up*” realizado no Japão onde foi encontrado que, 3% dos indivíduos infectados com *H. pylori* desenvolveram câncer gástrico oito anos depois, em contraste com o grupo não infectado que não teve nenhum caso de câncer gástrico. (HARDBOWER; PEEK; WILSON, 2014; UEMURA *et al.*, 2001).

*H. pylori* infecta aproximadamente 50% da população mundial, variando de acordo com a região geográfica estudada, além das condições socioeconômicas de cada país (MARSHALL; WARREN, 1984; MATYSIAK-BUDNIK; MEGRAUD, 1997). Os países

desenvolvidos, de um modo geral, possuem prevalência de *H. pylori* mais baixas do que as encontradas em países subdesenvolvidos (ERNST; GOLD, 2000). Nos EUA, um estudo avaliando 4145 adultos, evidenciou soroprevalência de *H. pylori* de 30.7% (GRAHAM; LIPSITCH; AIELLO, 2012), enquanto estudos realizados na Austrália, avaliando 1335, e na Alemanha, 2318 indivíduos, encontraram soroprevalência de 15.5% e 44.4%, respectivamente (PANDEYA; WHITEMAN; WEX *et al.*, 2011). Na China e Paquistão, demonstrou-se prevalência de 54.5% e 74.4%, respectivamente (GUO; ZHAO; ZHANG, 2011). Diversos estudos sugerem que a prevalência de *Helicobacter pylori* no contexto mundial tem uma tendência de queda tanto nos países desenvolvidos como nos subdesenvolvidos (TONKIC *et al.*, 2012). Estudo realizado na Argentina, avaliando 1030 crianças encontrou que a prevalência de *H. pylori* diminuiu de 41.2% entre 2002-2004 para 26% entre 2007-2009 (JANJETIC *et al.*, 2011).

No Brasil, estudos realizados em São Paulo e Minas Gerais, encontraram prevalência de *H. pylori* respectivamente de 40.7% e 69.7% (ROCHA *et al.*, 2003). Em Fortaleza, a prevalência de *H. pylori* avaliada através do teste respiratório em crianças assintomáticas residentes na comunidade de baixa renda Parque Universitário, foi de 30% nas crianças aos 2 anos de idade e de 74% aos 20 anos (RODRIGUES *et al.*, 2004), estudo do tipo “*follow-up*”, realizado na mencionada comunidade e utilizando o mesmo método para diagnóstico de *H. pylori*, evidenciou que a prevalência de *H. pylori* nas crianças aumentou de 53.4% para 64.7% após oito anos (QUEIROZ *et al.*, 2012). Também foi demonstrado que indivíduos dispépticos e familiares de primeiro grau de pacientes com câncer gástrico atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídio em Fortaleza têm prevalência de *H. pylori* de 75.9% e 84.7%, respectivamente (MOTTA *et al.*, 2008) enquanto que pacientes portadores de câncer gástrico apresentam uma prevalência de 93,1%. (LIMA *et al.*, 2010).

## **1.2 Fatores de Virulência do *Helicobacter pylori***

As variações genômicas das cepas de *H.pylori* podem ser responsáveis pela codificação de diferentes fatores de virulência, capazes de determinar diversos tipos de lesão no hospedeiro (CENSINI *et al.*, 1996).

### 1.2.1 Ilha de patogenicidade *cag*

O gene *cagA* codifica a expressão da proteína oncogênica CagA, que é um dos fatores de virulência mais importantes do *H. pylori*. Esse gene é marcador de uma região no cromossomo do *H. pylori*, diferente do restante do genoma da bactéria, considerado como ilha de patogenicidade *cag* (PAI), e está presente somente em algumas cepas de *H. pylori* (CENSINI *et al.*, 1996).

A ilha de patogenicidade *cag*-PAI codifica os componentes do sistema secreção do tipo IV, que atua como agulha e serve para injetar a proteína CagA nas células gástricas. Após ser injetada na célula, a proteína CagA é fosforilada nos resíduos de tirosina, iniciando uma cascata de sinalização celular, que inibe a apoptose, desregula a motilidade celular estimulando a célula a se espalhar e se alongar de maneira idêntica à produzida pelo fator de crescimento de hepatócitos. Além disso, ativa MAP kinases, alterando a proliferação celular (NAGASE; MURATA-KAMIYA; HATAKEYAMA, 2011).

A fosforilação da proteína CagA é de fundamental importância do ponto de vista biológico, já que esse processo de fosforilação ativa preferencialmente a via SHP2/ERK, que pode desencadear alterações nas células e levar a displasia, metaplasia e o câncer gástrico (LEE *et al.*, 2010). A proteína CagA induz também o aumento dos níveis de IL-8, uma citocina pró-inflamatória envolvida na gastrite decorrente da infecção pelo *H. pylori* (CRABTREE *et al.*, 1993).

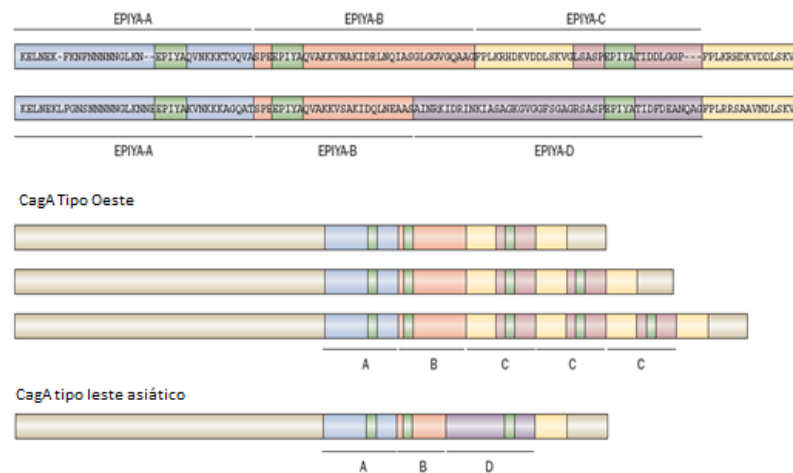
A região 5' do gene *cagA* é altamente conservada, já a região 3' do gene *cagA* apresenta número variável de seqüências repetitivas (YAMAOKA *et al.*, 1999, 2002, 2010). Cada região repetida da proteína CagA contém domínios denominados EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) A, B, C ou D, de acordo com os diferentes aminoácidos que flanqueiam a região. A primeira seqüência de repetições é denominada EPIYA-A e EPIYA-B, que são seguidas por nenhum, 1, 2 ou 3 segmentos C (em cepas Ocidentais) ou por segmento D, em cepas Orientais. Portanto, podem ser classificadas como ABC, ABCC ou ABCCC ou ABD (HATAKEYAMA *et al.*, 2004). Diferenças na região 3' do gene *cagA* podem estar relacionadas a diferentes processos patológicos.

A presença de cepas EPIYA-D ou com maior número de segmentos C foi associado com maior atividade da fosfatase SHP-2 (HIGASHI *et al.*, 2002; NAITO *et al.*, 2006).

Estudos clínicos têm sugerido que o número dessas repetições C, bem como a presença de EPYIA-D, está associado com o desenvolvimento de câncer gástrico (JONES *et al.* 2009). *In vitro*, alguns estudos demonstraram ainda que cepas EPYIA D induziram maior produção de IL-8, uma citocina pró-inflamatória, quando comparados com cepas EPYIA C (KIM SY *et al.*, 2006).

Estudo brasileiro realizado em Minas Gerais confirmou essa hipótese e encontrou que o número de sítios EPIYA-C da proteína CagA estava associado com o câncer gástrico e gastrite atrófica, mas não com úlcera duodenal (BATISTA *et al.*, 2011). Em Fortaleza, estudo comparando o perfil dos sítios EPIYA-C da proteína CagA de cepas de *H.pylori* entre familiares de pacientes com câncer gástrico com pacientes sem história familiar, demonstrou que esses indivíduos são colonizados por cepas mais virulentas de *H. pylori*, que possuem maior número de repetições C, evidenciando a importância de aprofundar estudos nesse grupo de pacientes (QUEIROZ *et al.*, 2012). Não existe nenhum trabalho avaliando o número de repetições de EPYIA em pacientes com câncer gástrico no Nordeste do Brasil.

**Figura 1. Polimorfismos estruturais da proteína CagA**



Fonte: YAMOAKA *et al.* **Nature Reviews.** 2010

Além do gene *cagA*, outros importantes fatores de virulência são os genes *cagE*, *cagG*, *cagH*, *cagI*, *cagL* e *cagM*. Já os genes *cagT* e *cagY* são importantes para a formação de uma estrutura similar a uma agulha, necessária para injeção de CagA na célula (CENSINI *et al.* 1996, PACHATHUNDIKANDI; BACKERT, 2013). Estudo realizado no Sudeste do Brasil

evidenciou associação entre os genótipos *cagM*, *cagT*, *cagA* e LEC (região terminal esquerda da ilha de patogenicidade *cag*) com doença ulcerosa péptica, enquanto outro estudo subsequente do mesmo grupo associou o gene LEC com câncer gástrico (MATTAR *et al.*, 2007, 2010).

### **Gene *cagE***

O gene *cagE* (*cytotoxin associated gene E*) localizado na extremidade direita da *cag*-PAI codifica proteínas que compõem o sistema de secreção tipo IV. Alguns estudos demonstram que esse gene é responsável pelo aumento da secreção de IL-8 (SU *et al.*, 2003; TOMASINI *et al.*, 2003) sendo associado, ao desenvolvimento da úlcera péptica (ERZIN *et al.*, 2006) e câncer gástrico em algumas regiões (ERZIN *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2010). Estudo realizado em Fortaleza encontrou significativa associação entre a presença desse gene e doença ulcerosa péptica (OLIVEIRA, 2014).

### **1.2.2 VacA**

A citotoxina A vacuolizante, VacA, é um dos fatores de virulência mais estudados depois da proteína CagA. Essa citotoxina entra na célula gástrica por endocitose, ocasionando vacuolização citoplasmática, formação de um canal iônico na membrana mitocondrial, liberação do citocromo C da mitocôndria (causando apoptose celular) e ativação da cascata pró-inflamatória (ATHERTON *et al.*, 2006). VacA pode ainda inibir a ativação e proliferação de linfócitos T (GEBERT *et al.*, 2003).

Diferentemente do gene *cag*, todas as cepas de *H. pylori* possuem o gene *vacA*. No entanto, somente 50% das cepas produzem a proteína VacA, sendo a presença dessa proteína associada à variações na estrutura do gene *vacA* localizados principalmente na região de sinal (s1 e s2) e na região média (m1 e m2) (ATHERTON *et al.*, 1995). As cepas produtoras da proteína VacA são encontradas com maior frequência em pacientes portadores de câncer gástrico, quando comparado com pacientes com gastrite (MIEHLKE *et al.*, 2000). Estudos *in vitro* demonstraram que as cepas de *H. pylori* mais citotóxicas são as s1m1, seguidas das cepas s1m2, as cepas s2m2 não possuem citotoxicidade (LETLEY *et al.*, 1999).

### 1.2.3 Proteínas da membrana externa do *H. pylori*

*H. pylori* difere da maioria das bactérias Gram-negativas por apresentar várias proteínas de membrana externa, sem que exista uma única proteína predominante. Exemplos de proteínas da membrana externa do *H. pylori* incluem, BabA, Hom SabA, HopB, HopB, e OipA. Essas proteínas são importantes para o processo de aderência bacteriana, que é essencial para determinar se ocorrerá colonização do *H. pylori* na mucosa gástrica. Vários estudos corroboram essa hipótese e demonstram associação dessas adesinas com afecções gástricas (OLEASTRO; MENARD, 2013).

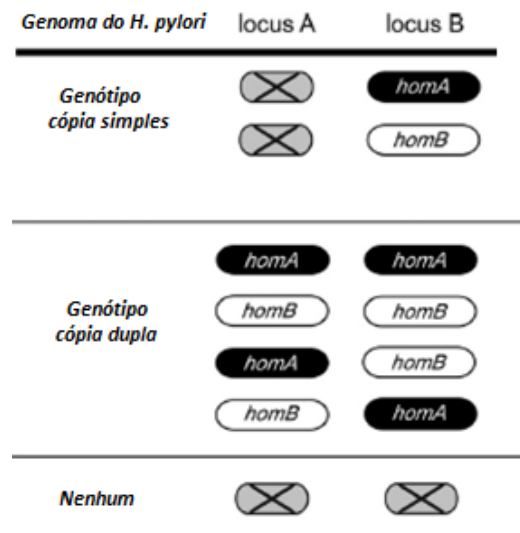
O fator de aderência *blood group antigen adhesin (babA)* ligado ao grupo sanguíneo Lewis<sup>b</sup> encontrado nos antígenos do grupo sanguíneo A, B e O, que são expressos nas células gástricas e nas mucinas, foi a primeira adesina da bactéria *H. pylori* a ser identificada (ASPHOLM-HURTIG *et al.*, 2004).

A aderência bacteriana mediada por BabA é um potenciador do sistema secretório do tipo IV, descrito anteriormente, e acarreta o aumento da transcrição gênica com consequente elevação da expressão de mediadores inflamatórios e desenvolvimento de metaplasia intestinal e lesões pré-malignas (ISHIJIMA *et al.*, 2011).

A proteína HomB da membrana externa do *Helicobacter* (Hom) é codificada pelos genes *homB* e *homA* (90% de similaridade de nucleotídeos, em relação ao gene *homB*). Ambos os genes podem estar presentes em dois loci conservados como uma cópia única ou como cópia dupla. Portanto, as cepas de *H. pylori* podem ter somente um gene *homA* ou *homB*, com o outro locus vazio (*homA*/- ou *homB*/-), duas cópias de *homA* (*homA/homA*) ou *homB* (*homB/homB*); uma cópia única de cada gene (*homA/homB*) ou nenhum desses genes (-/-), como ilustrado na **Figura 2**. Estudo *in vitro*, demonstrou um aumento da secreção de IL-8 em células gástricas e aumento da adesão bacteriana na presença da proteína HomB (OLEASTRO *et al.*, 2009). Estudos realizados em Portugal evidenciaram associação entre a presença do gene *homB* e o desenvolvimento de úlcera gástrica, enquanto outros estudos realizados na Colômbia, EUA e Iran encontraram associação desse gene com câncer gástrico (ABADI *et al.*, 2011; JUNG *et al.*, 2009; OLEASTRO *et al.*, 2009). Tais achados evidenciam que o gene *homB* pode ser utilizado como possível marcador de virulência da bactéria. No Brasil, estudo em Fortaleza evidenciou uma associação significativa entre a presença do

genótipo *homB* e úlcera péptica (BRAGA-NETO, 2013), semelhante ao que foi encontrado em Portugal.

**Figura 2. Genótipos *homA* e *homB* do *H. pylori*.**



Fonte: KANG *et al.*, Journal of Clinical Microbiology. 2012

### 1.3 *H. pylori* e Câncer gástrico

Apesar de atualmente haver uma diminuição da incidência de câncer gástrico, ele permanece como a quarta neoplasia mais comum e a terceira causa de morte relacionada a câncer, com mais de 700.000 mortes por câncer no mundo. Aproximadamente 70% dos casos ocorrem em países subdesenvolvidos (FORD *et al.*, 2014). A maioria dos casos ocorre entre 50-70 anos de idade e o câncer gástrico em jovens é considerado raro, entre 2-13,5% dos casos (ISOBE *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2012). No Brasil, a incidência de câncer gástrico varia de região para região e estudo mostrou uma tendência de declínio nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e um aumento nas regiões Norte e Nordeste (AMORIM *et al.*, 2014). Segundo dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer sobre o câncer gástrico, no Ceará, o risco estimado para casos novos de câncer de estômago foi de 17,23 para homens (o terceiro maior do país) e 10,43 para mulheres (o maior para o sexo feminino), comparando-se com as taxas para a região nordeste de 10,25 e 6,39, respectivamente (INCA, 2014).

A infecção por *H. pylori* é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do câncer gástrico, sendo considerado pela Organização Mundial de Saúde com um carcinógeno

tipo 1 (TAYLOR *et al.*, 1991). Estudos apontam que 90% dos casos de câncer gástrico do tipo não-cárdia são causados pelo *H. pylori*. Além da infecção por *H. pylori*, a presença de cepas mais patogênicas *cagA* positivas, fatores ambientais, como dieta rica em sal, defumados, alimentos condimentados, tabagismo, álcool e fatores genéticos do hospedeiro, como polimorfismo de genes das citocinas IL1, TNF-alpha, IL-8, IL-10 e interferon gamma e história familiar positiva, conferem maior risco para o desenvolvimento de câncer gástrico (BLASER *et al.*, 1998, ZAMBON *et al.*, 2003).

Vários estudos avaliando familiares de primeiro grau de pacientes com câncer gástrico evidenciaram maior risco para o desenvolvimento de câncer gástrico do que amostra populacional sem história familiar (LA VECCHIA *et al.*, 1992; PALLI *et al.*, 1994; SHIN *et al.*, 2010). Tem sido sugerido que o risco aumentado nesse grupo de pacientes pode estar associado, além dos fatores genéticos, à exposição similar de dietas e infecção por cepas de *H. pylori* mais virulentas no grupo familiar, uma vez que essa bactéria pode ser transmitida entre indivíduos, e que essa transmissão ocorre principalmente durante a infância (RODRIGUES *et al.*, 2004).

Estudo realizado no Hospital Walter Cantídio, em Fortaleza, avaliando 104 familiares de pacientes com câncer gástrico e 118 pacientes com dispepsia sem história familiar dessa neoplasia, encontrou além da alta prevalência da infecção pelo *H. pylori* em ambos os grupos, 84,7% *versus* 75,9% respectivamente, maior prevalência de lesões precursoras do câncer gástrico nos familiares de câncer, como displasia e um paciente com câncer gástrico na fase inicial. O padrão de gastrite mais encontrada nos familiares foi a pangastrite e gastrite de corpo associada à presença de folículos linfóides, padrão esse de maior risco para a carcinogênese gástrica (MOTTA *et al.*, 2008). Em um outro estudo comparando o número de sítios EPIYA-C da proteína CagA em familiares e não familiares, foi observado que os familiares estão significativamente mais colonizados com cepas de *H. pylori cagA* com maior número de EPIYA-C e *vacs1m1*, demonstrando que esses pacientes são infectados com cepas mais virulentas de *H. pylori* o que pode contribuir para aumentar o risco de câncer gástrico (QUEIROZ *et al.*, 2012)

Vários fatores genéticos do hospedeiro podem estar envolvidos diretamente no desenvolvimento do câncer gástrico bem como, indiretamente, através da interação entre o *H. pylori* e o organismo. Dentre os fatores genéticos, polimorfismos de genes de citocinas inflamatórias foram amplamente estudados em diversas populações. A citocina pró-



inflamatória IL-1 $\beta$  foi a mais estudada, devido ao seu papel fundamental durante a infecção por *H. pylori*, além de ser um potente inibidor da secreção ácida no estômago (EL-OMAR *et al.*, 1997). Polimorfismos genéticos que elevam a secreção de IL-1 $\beta$  em câncer gástrico ou lesões precursoras foram evidenciado em diversos grupos populacionais, como pacientes do México, Portugal, EUA e Japão, fortalecendo a associação dessa citocina com o desenvolvimento de câncer gástrico (EL-OMAR *et al.*, 2003; FURUTA *et al.*, 2002; GARZA-GONZALEZ *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*; 2001). No Brasil, estudo evidenciou que polimorfismos da IL1RN foram associados com maior risco de desenvolvimento de câncer gástrico (ROCHA *et al.*, 2005). Além da IL-1, tem sido demonstrado que o *H. pylori* desregula a proteína claudina-4 (uma das proteínas da junção de oclusão do epitélio gástrico), através da ativação do IL-1R que ativa a *Rho* kinase (LAPOINTE *et al.*, 2010; PERSSON *et al.*, 2011). Outros estudos evidenciaram níveis mais elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8 em células gástricas expostas a *H. pylori* *cagA*-positivo (PEEK *et al.*, 1995). Em concordância, estudos associaram polimorfismo genético nos genes de outras citocinas, como TNF-alpha, IL-6, IL-8 e IL-10 como o desenvolvimento de câncer gástrico (EL-OMAR *et al.*, 2003; SAVAGE *et al.*, 2004).

A mucosa gástrica sofre intensa modificação epigenética durante o desenvolvimento de gastrite induzida por infecção. Em pacientes infectados por *H. pylori*, o gene MGMT, que codifica a proteína de reparo de DNA O-6-metilguanina metiltransferase, se encontra hipermetilado, diminuindo sua expressão e aumentando a mutagênese em células epiteliais gástricas (SEPULVEDA *et al.*, 2010). Estudos evidenciaram que o *H. pylori* pode inibir genes de supressão tumoral tanto em humanos como em modelos experimentais, como o fator *trefoil* (TFF1) do antro gástrico, que funciona como um gene de supressão tumoral. Outro fator de supressão tumoral membro da família *trefoil*, o TFF2 tem sua expressão diminuída no câncer gástrico do tipo intestinal. Trabalhos experimentais demonstraram que a infecção por *H. pylori* reduz a expressão do TFF2, através da metilação da região promotora do gene, e de genes como p53 e p27 (PETERSON *et al.*, 2010). No entanto, estudos evidenciaram que, mesmo na ausência de *H. pylori*, a exposição a elevados níveis de N-metil-N-nitrosuréia ocasionou repressão do gene TFF1, e que em camundongos infectados, apesar de ocorrer repressão desse gene, quando foram expostos concomitantemente a N-metil-N-nitrosuréia, a repressão foi maior, ressaltando a importância de fatores ambientais e da dieta na patogênese do câncer gástrico (TOMITA *et al.*, 2011).

## 1.4 Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio, tais como ânions superóxidos ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroxila ( $\cdot OH$ ) e ácido hipocloroso são produzidas a partir do metabolismo celular normal e quando em concentrações baixas ou moderadas são importantes para combater infecção por diversos patógenos. No entanto, em altas concentrações podem ocasionar lesão tecidual através de processo oxidativo (KIM *et al.*, 2012).

A formação endógena de espécie reativa de oxigênio ocorre em diversos compartimentos intracelulares tais como a mitocôndria, retículo endoplasmático e peroxissomos. Nessas organelas ocorrem várias reações enzimáticas que resultam da formação de radicais livres. A mitocôndria é considerada a principal fonte desses radicais (BALABAN *et al.*, 2005). As enzimas mais importantes envolvidas nesse processo são a NADPH oxidase (presentes em fagócitos como monócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos), xantina oxidase (presente principalmente no fígado e no intestino delgado), lipoxigenases, mieloperoxidases (localizadas em lisossomos de neutrófilos, monócitos e macrófagos), óxido nítrico sintase e cicloxigenase (KULKARNI *et al.*, 2007). Fontes exógenas ou ambientais de espécie reativa de oxigênio incluem: radiação, quimioterapia, tabagismo, dieta, consumo de álcool e medicamentos (RILEY *et al.*, 1994; HALLIWELL *et al.*, 1994).

Com o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, ocorre uma cascata de eventos biocelulares que podem contribuir para o desenvolvimento de diversas patologias, incluindo o câncer. O processo se inicia com alteração de DNA, proteínas e peroxidação lipídica, levando a uma alteração da regulação gênica, perda da capacidade de reparo do DNA e mutações genéticas. O conjunto desses processos altera a proliferação, diferenciação celular e morte celular programada (apoptose) e acarreta lesão tecidual, predispondo o desenvolvimento de patologias. Úlceras gastroduodenais, gastrite induzida por *H. pylori*, esofagite, doença inflamatória intestinal e neoplasias são exemplos de patologias gastrointestinais associadas ao estresse oxidativo exagerado (BHATTACHARYA *et al.*, 2014).

A peroxidação lipídica é uma forma de estresse oxidativo derivado da auto-oxidação de ácidos graxos presentes na membrana das células. O Malondialdeído (MDA), um dos produtos finais formado durante o processo de peroxidação lipídica dos fosfolipídios da membrana celular, é liberado no espaço extracelular e, conseqüentemente, no sangue

(DALLE-DONNE *et al.*, 2006; DRAPER *et al.*, 1990). Diversos estudos demonstraram concentrações elevadas de peroxidação lipídica em pacientes portadores de neoplasias, incluindo o câncer gástrico (BAKAN *et al.*, 2002; KILIC *et al.*, 2014). No entanto, esse é um ponto controverso, uma vez que, outros pesquisadores encontraram níveis séricos de MDA mais baixos no grupo de pacientes portadores de câncer gástrico quando comparado com o grupo controle (MA *et al.*, 2013; KHANZODE *et al.*, 2003).

Numa tentativa de controlar os danos causados pela produção exagerada de espécies reativas de oxigênio, o organismo possui um complexo sistema endógeno antioxidante de defesa, composto por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos. A ingestão exógena de nutrientes também é um fonte importante de antioxidantes. Os principais mecanismos endógenos enzimáticos são: superóxido dismutase, glutatona redutase, glutatona peroxidase, heme-oxigenase e catalase. Já os mecanismos não enzimáticos incluem: glutatona, tioredoxina e melatonina. Exemplos de antioxidantes exógenos são: vitamina A, vitamina C, vitamina E, zinco, cobre, manganês e ferro (BHATTACHARYA *et al.*, 2014).

A glutatona, um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina, é um dos principais antioxidantes do nosso organismo, sendo encontrada na maioria das vezes na sua forma reduzida (GSH). O sistema glutatona é composto por três enzimas principais: glutatona redutase, glutatona peroxidase, e glutatona transferase. A glutatona redutase, converte a glutatona oxidada, na forma de glutatona dissulfídio (GSSG), em glutatona reduzida (GSH), sendo de fundamental importância para proteger as hemácias e membranas celulares do estresse oxidativo. A glutatona peroxidase (GPX), converte a glutatona reduzida em glutatona oxidada. De forma concomitante, essa reação converte peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água (H<sub>2</sub>O) e hidroperóxidos lipídicos em alcoóis estáveis. Existem oito isoenzimas glutatona peroxidase, sendo a GPX2, previamente denominada GPX2-GI por ter sido inicialmente descrita no trato gastrointestinal, a principal linha de defesa contra o estresse oxidativo induzido por processos inflamatórios e infecciosos (CHU *et al.*, 1993, 2004). Além disso, a GPX2 protege o intestino das hidroperoxidases presentes nos alimentos (WINGLER *et al.*, 2000).

O papel da glutatona nos processos neoplásicos ainda não está bem definido, tendo sido relatado em alguns estudos concentrações significativamente mais baixas de glutatona reduzida em pacientes portadores de neoplasias quando comparado com controles (SHIRIN;

PINTO; MOSS, 2003; ARIVAZHAGAN *et al.*, 2007; BAROUDI *et al.*, 2013), enquanto em outros as concentrações estão elevadas (RAY *et al.*, 2000; NOMANI *et al.*, 2005).

O papel do *H. pylori* nas lesões gastrointestinais tem sido motivo de vários estudos, porém ainda não está bem definido a sua associação com o processo estresse oxidativo. Produção de espécies reativas de oxigênio induzida pela presença de *H. pylori* tem sido demonstrada *in vitro*, assim como aumento da concentração na mucosa gástrica de marcadores de estresse oxidativo (RAMARAO *et al.*, RAMARAO; GRAY-OWEN; MEYER, 2000; BAIK *et al.*, 1996). A infecção crônica por *H. pylori* pode induzir estresse oxidativo e acarretar, possivelmente, lesão na mucosa gástrica, predispondo ao desenvolvimento de patologias gastrointestinais mais graves. Além disso, trabalho *in vitro*, utilizando células gástricas, evidenciou que a infecção por *H. pylori* aumentou os níveis de GSH inicialmente, mas, após 24 horas de exposição, depletou completamente os níveis de glutathiona, achados que também foram corroborados em outros estudos (NAGASE; MURATA-KAMIYA; HATAKEYAMA, 2011; OBST *et al.*, 2000; SHIRIN; PINTO; MOSS, 2003). Ao avaliar as concentrações de glutathiona na biopsia gástrica de 19 amostras positivas para *H. pylori* e de 38 negativas, os autores encontraram níveis significativamente mais baixos nos pacientes infectados, sugerindo que a bactéria pode modular o estresse oxidativo diretamente ou indiretamente, através de processo inflamatório crônico (SHIRIN *et al.*, 2003).

Uma associação positiva entre infecção por *H. pylori* em portadores de câncer gástrico com estresse oxidativo tem sido descrita (GOTO *et al.*, 1999), contudo outros estudos não encontram essa associação (MA *et al.*, 2013) sendo esse ainda um ponto controverso.

## **1.5 Justificativa**

Estudos prévios realizados em Fortaleza têm demonstrado alta prevalência tanto de câncer gástrico quanto de *H. pylori*. O câncer gástrico é uma patologia multifatorial, estando associada à infecção pelo *H. pylori*, predisposição genética do indivíduo, alteração do estresse oxidativo dentre outros.

Existem poucos estudos avaliando o estresse oxidativo em pacientes com câncer gástrico e estes apresentaram resultados controversos, sendo importante avaliar qual o papel de alguns marcadores do estresse oxidativo em pacientes portadores de neoplasia gástrica no Nordeste do Brasil. Além disso, ainda não foi avaliado se os familiares de câncer já teriam

alterações quanto aos níveis de estresse oxidativo quando comparado à pacientes portadores de câncer gástrico e controles sem história familiar dessa neoplasia.

Familiares de primeiro grau de câncer gástrico possuem maior risco de desenvolver essa neoplasia, tendo sido demonstrado que esses indivíduos estão colonizados com cepas de *H. pylori* com maior patogenicidade em relação a presença de número de sítios de fosforilação EPIYA-C da proteína CagA. Portanto é importante avaliar outros possíveis marcadores de virulência nesse grupo de indivíduos tais como *homB* e *cagE*, uma vez que, estudos prévios, realizados pelo presente grupo, demonstraram que esses genes estão associados com afecções gastrointestinais.

Apesar de ter sido avaliada a prevalência do gene *cagE* em pacientes portadores de câncer gástrico em estudos prévios realizados em Fortaleza, não foi avaliado se o gene *cagE* está associado a essa neoplasia. Além disso, o padrão de distribuição dos sítios de fosforilação EPYIA da proteína cagA em cepas provenientes de pacientes portadores de câncer gástrico não foi avaliado no Nordeste do país, sendo portanto, importante estudar mais detalhadamente esses marcadores de virulência nessa região.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o estresse oxidativo e genótipos de virulência de cepas de *H. pylori* provenientes de pacientes portadores de câncer gástrico, seus familiares de primeiro grau e dispépticos sem história familiar dessa neoplasia.

### 2.2 Objetivos Específicos

Averiguar se existe diferença entre as concentrações séricas dos marcadores de estresse oxidativo, glutathiona reduzida (GSH) e Malondialdeído (MDA) entre indivíduos portadores de câncer gástrico, não portadores dessa neoplasia, e em indivíduos familiares de câncer gástrico e dispépticos sem história familiar de câncer.

Avaliar se existe correlação entre concentração sérica de GSH e MDA e a infecção do *H. pylori*.

Determinar se há diferenças entre as amostras de *H. pylori* provenientes de indivíduos familiares de primeiro grau de câncer e dispépticos sem história familiar dessa neoplasia e câncer gástrico com relação ao fator de virulência *cagE*.

Avaliar se as amostras de *H. pylori* provenientes de indivíduos familiares de primeiro grau de câncer e dispépticos sem história familiar dessa neoplasia, são diferentes com relação aos fatores de virulência *homB* e *homA*.

Avaliar o padrão dos sítios de fosforilação EPIYA da proteína CagA em pacientes portadores de câncer gástrico.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Casuística

O presente estudo foi realizado no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) da Universidade Federal do Ceará, submetido à análise e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEPE – desse Hospital (**Anexo A**). Todos os pacientes assinaram termo de consentimento informado (**Apêndice A**). Foi aplicado questionário padronizado (**Apêndice B**) onde foram contemplados vários aspectos relacionados à idade, gênero, procedência, hábitos alimentares, tabagismo, etilismo, sintomas gastrointestinais, história familiar de câncer gástrico, uso de antibióticos, medicamentos anti-secretores, entre outros.

Foram convidados a participar do estudo pacientes com diagnóstico de câncer gástrico não-cárdia confirmados através de histopatologia, seus familiares de primeiro grau (pai, mãe, irmãos) e pacientes dispépticos acompanhados no ambulatório de Gastroenterologia do HUWC sem história de câncer gástrico na família. Os familiares de câncer gástrico foram denominados de FC e os não familiares de NFC. Os fragmentos de biópsia foram obtidos através de endoscopia nos pacientes NFC e FC, e nos portadores de câncer gástrico através de cirurgia.

O estudo do estresse oxidativo, avaliado através de concentrações séricas de MDA e GSH, foi realizado em 213 indivíduos, sendo 54 pacientes portadores de câncer gástrico, 91 FC e 68 NFC. Nesse grupo, foi obtido biópsia gástrica para análise de *H. pylori* por urease e PCR *ureA* em 114 indivíduos não portadores de câncer (75 FC e 39 NFC) e 54 portadores de câncer gástrico.

Para avaliação dos genótipos de *H. pylori*, foram incluídos indivíduos atendidos no Serviço de Gastroenterologia do HUWC que fossem *H. pylori* positivo (74 FC e 64 NFC e 48 CG), independentemente de terem realizado coleta de sangue para o estudo do estresse oxidativo, uma vez que, não foi objetivo desse estudo avaliar se existia associação entre estresse oxidativo e fatores de virulência de *H. pylori*.

##### 3.2.1 Seleção dos pacientes

Os pacientes foram incluídos de acordo com o seguinte critério: idade mínima de 18 anos, indivíduos portadores de câncer gástrico distal confirmado através de exame

histopatológico, familiares de primeiro grau de câncer independente de apresentarem ou não sintomas de dispepsia, dispépticos com indicação de endoscopia digestiva alta, sem história familiar de câncer gástrico.

Foram critérios de exclusão: doença ulcerosa péptica, gravidez ou lactação, pacientes que já foram tratados para *H. pylori*, indivíduos que realizaram cirurgia prévia de ressecção gástrica ou vagotomia, ou portadores de síndrome de Zollinger-Ellison, estenose pilórica, insuficiência renal, insuficiência hepática, insuficiência cardíaca congestiva.

### **3.3 Desenho do estudo**

Estudo observacional, transversal, analítico.

### **3.4 Procedimento**

#### **3.4.1 Coleta de Sangue**

Pra realizar a dosagem da concentração sérica de GSH e MDA, foi coletado sangue de veia periférica (5mililitros) em tubo sem anticoagulante, utilizando o sistema Vacutainer. As amostras foram processadas por centrifugação a 25°C, 2.000 rpm por 15 minutos, para obtenção de soro e estocados a -70°C.

#### **3.4.2 Determinação da concentração sérica da Glutathiona reduzida (GSH)**

A concentração sérica de GSH foi realizada através de ensaio para determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH), como descrito anteriormente (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Utilizou-se 100 µl de soro, no qual foi adicionado 80 µl de água destilada e 20 µl de ácido tricloroacético a 50% para precipitação das proteínas. Depois dessa etapa, o material foi centrifugado por 15 minutos em rotação de 3000 rpm à uma temperatura de 4°C. Em seguida, novas alíquotas de 200 µl do sobrenadante foram misturadas com 200 µl de tampão TRIS com concentração de 0.4 M, pH 8.9 e com 5 µl de 5,5-ditiobis-2-ácido-nitrobenzóico (DTNB) e colocadas no vortex por 40 segundos. A absorbância foi então determinada a 412 nm. A concentração de GSH foi expressa em µmol/ml de soro a partir de uma curva padrão.



### 3.4.3 Dosagem sérica da concentração de Malondialdeído (MDA)

A concentração sérica de MDA, um dos produtos da peroxidação lipídica, foi determinada por meio de ensaio colorimétrico conforme orientações do fabricante do Kit de peroxidação lipídica-MDA (Sigma, MAK085). Inicialmente, 3,33 µl de soro foi colocado em microtubo contendo 166,6 µl de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 42nM), sendo homogeneizado levemente. Em seguida, adicionou-se 41,6 µl de ácido fosfotúngstico; a solução foi misturada com auxílio de um vórtex e incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (13000 g, 5 minutos 4°C). Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspensão com solução de BHT (0,66 µl de BHT: 33,3 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura) e, essa solução, transferida para um novo microtubo contendo 32,6 µl de água ultrapura. Antes de formar o complexo TBA(ácido tiobarbitúrico)-MDA, a curva padrão foi preparada adicionando em um microtubo 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 µl de MDA (2mM) para um volume total de 200 µl correspondendo, respectivamente, as seguintes concentrações de MDA: 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 nM. Após esta etapa, adicionou-se 200 µl de TBA em cada microtubo contendo as amostras e padrões, em seguida foram incubadas no banho-maria a 95°C por 60 minutos. Decorrido este tempo, as amostras foram colocadas no gelo por 10 minutos. Posteriormente, 200 µl de cada reação foi pipetada na placa de ELISA e a absorbância determinada a 532 nm. A concentração sérica total de MDA foi expressa em nM/µl.

### 3.4.4 Colheita de fragmentos de mucosa gástrica

Os exames endoscópicos foram realizados no Serviço de Endoscopia do HUWC seguindo um mapa de biópsia. Cinco fragmentos de mucosa gástrica foram colhidos na pequena curvatura do antro e na grande curvatura do corpo gástrico para realização do teste da urease pré-formada, estudo histopatológico e biologia molecular.

Para o diagnóstico de gastrite endoscópica, foi utilizada a classificação de Sydney, considerando os achados de edema, enantema, friabilidade, exsudato, erosões planas e elevadas, nodosidade ou micronodularidade, hiperplasia ou atrofia de pregas, aumento da trama vascular submucosa ou presença de sangramento intramural (MISIEWICZ *et al.*, 1990).

A colheita de tecido gástrico dos pacientes portadores de câncer gástrico distal foi realizada no centro cirúrgico do HUWC. Esses fragmentos foram colhidos da região próxima

ao tumor, na pequena curvatura do antro e na grande curvatura do corpo gástrico. O diagnóstico histopatológico do tumor foi realizado segundo a classificação de Lauren (LAUREN 1965).

Os fragmentos da mucosa gástrica foram devidamente armazenados em freezer a -70 graus Celsius. A análise histopatológica foi realizada no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC.

#### **3.4.5 Detecção de *H. pylori***

O diagnóstico do *H. pylori* foi avaliado através da detecção indireta pelo teste da urease associado à pesquisa direta através da análise histopatológica após coloração pela hematoxilina-eosina e giemsa e por PCR (*ureA*). A amostra foi considerada positiva quando *H. pylori* foi detectado por pelo menos dois métodos.

O teste da urease pré-formada é realizado na sala da endoscopia. Resumidamente, o fragmento de biópsia da mucosa gástrica é colocado em tubo contendo uréia e indicador de pH. Quando a bactéria está presente no tecido gástrico a enzima urease, presente na bactéria *H. pylori*, quebra a uréia havendo formação de bicarbonato, o que torna o meio alcalino. Como na solução existe um indicador de pH (fenol vermelho), o meio que antes era amarelo tornar-se-á vermelho. O teste da urease é considerado positivo quando houver mudança da coloração da solução de “amarelo” para “vermelho” em um período de 24 horas.

#### **3.4.6 Extração do DNA de *H. pylori* em tecido de biópsia gástrica**

DNA da mucosa gástrica foi extraído usando o QIamp (QIAGEN, Hilden, Germany) kit de acordo com as instruções do fornecedor. A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria usando o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, NC, USA) e armazenado a -20°C até o uso. O DNA extraído foi utilizado para a amplificação dos determinados genótipos a partir das sequências de nucleotídeos (primers) específicos (Tabela 1). Resumidamente, foram colocados 5,0µL do DNA extraído em tubos específicos e adicionados os reagentes: 12,5µL da enzima Taq-DNA polimerase GoTaq green<sup>®</sup>, que catalisa as reações; 2,5µL dos “primers” específicos para cada gene. A amplificação do DNA foi realizada em termociclador, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), obedecendo o protocolo de ciclos específicos para cada gene estudado

Tabela 2. O DNA amplificado foi colocado em gel de agarose a 2% e corado com Brometo de Etídio. O gel foi submerso em tampão TAE (Promega®), e as amostras de DNA foram adicionadas ao gel para observação das bandas de nucleotídeos do DNA de *H. pylori*. O gel foi submetido à corrida eletroforética a 100V por 40 minutos. Após a corrida, o gel foi revelado em máquina fotográfica reveladora eletrônica de ultravioleta (Bio-Rad, CA. - USA®) para visualização dos pares de bases. Além do peso molecular, em cada gel foi colocado um controle positivo e negativo.

A Tabela 1 apresenta a sequência de ácido nucléico usada na amplificação dos genótipos estudados, e a Tabela 2 os ciclos de amplificação para cada gene.

**Tabela 1: Primers usados na amplificação dos genótipos estudados, Fortaleza Ce, 2015**

<i>Primer</i>	Sequência (5' - 3')	Pares de base	Referência
ureA – F	GCCAATGGTAAATTAGTT	411	Clayton et al., 1992
ureA – R	CTCCTTAATTGTTTTTAC		
cagA – F	ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGGGA	298	Kelly et al., 1994
cagA – R	TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT		
cagE – F	TTGAAAACCTCAAGGATAGGATAGAGC	498	Sozzi et al., 2001
cagE – R	GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC		
homA/B F	AGAGGGTGTTTGAAACGCTCAATA	homA -128	Oleastro et al., 2006
homA/B R	GGTGAATTCTTCTGCGGTTTG	homB - 161	

Fonte: Elaborada pelo autor

**Tabela 2: Ciclos de amplificação para os gene *ureA*, *CagE*, *cagA*, *Hom* , Fortaleza Ce, 2015.**

Gene	Desnaturação inicial	Desnaturação/ Anelamento/ Extensão	Extensão Final	Referência
<i>ureA</i>	5min - 95°C	(1min - 95°C/ 1min - 45°C/ 1min - 72°C) 33x	5min - 72°C	Clayton <i>et al.</i> , 1992
<i>cagA</i>	1min30s - 94°C	(1min - 94°C/ 1min - 55°C/ 2min - 72°C) 39x	7min - 72°C	Atherton <i>et al.</i> , 1995
<i>cagE</i>	1min30s - 94°C	(1min - 94°C/ 45s - 53°C/ 45s - 72°C) 35x	7min - 72°C	Sozzi <i>et al.</i> , 2001
<i>homA/B</i>	5min - 95°C	(30s - 95°C/ 30s - 60°C/ 17s - 72°C) 35x	7min - 72°C	Oleastro <i>et al.</i> , 2006

### 3.4.7 Genotipagem para *ureA*

A presença do gene *ureA* de *H. pylori* foi avaliada de acordo com a metodologia previamente descrita (CLAYTON *et al.*, 1992). A cepa padrão Tx30a de *H. pylori* foi usada com controle positivo e uma cepa de *E. coli* e água destilada foram usados como controle negativo. O gene *ureA* foi detectado por tratar-se de um marcador da presença do *H. pylori*.

### 3.4.8 Genotipagem para *homA* e *homB*

A identificação da presença do gene *homA* e/ou *homB* foi detectada por PCR usando os primers *homA/B* – F e *homA/B* – R descritos na Tabela 1, que resultou num produto de pares de base de 128, denotando a presença de *homA* gene, e de 151 a 161, denotando a presença do gene *homB*.

### 3.4.9 Amplificação do gene *cagA* e *cagE*

A genotipagem para *cagE* foi realizada conforme TOMASINI *et al.*, (2003), utilizando os primers e os ciclos de amplificação conforme descrito na Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente.

O gene *cagA* foi amplificado utilizando-se dois pares de primers como previamente descrito (KELLY *et al.*,1994). Os primers utilizados estão listados na **Tabela 1**. A cepa de *H. pylori* (1010-95), sabidamente positiva para o gene *cag*, foi usada como controle positivo, enquanto a cepa Tx30, negativa para o gene *cag*, foi usada como controle negativo.

### 3.4.10 Amplificação e sequenciamento da região variável 3' do gene *cagA*

Para a amplificação da região variável, que contém o segmento EPYIA, foi adicionado 20 a 100mg de DNA a uma solução tampão 1% de Taq DNA polimerase (50mM and Tris-HCL 10mM), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 100uL de cada deoxinucleotídio, 1.0 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e 10 pmol de cada primer para um volume total de 20 µL. Os primers usados foram previamente descritos (YAMAOKA *et al.*, 1998). As condições do termociclador foram: 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos (95°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, e 72° C por 1 minuto) e, finalmente, a 72°C for 7 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese com gel de agarose a 1.5%, corado com brometo de etídio e analisado num transluminador com luz ultravioleta. A reação gerou produtos de 500 to 850 pares de base, de acordo com o número de EPIYA C.

Algumas amostras foram aleatoriamente selecionadas para sequenciamento, a fim de confirmar os achados de PCR. Os produtos de PCR foram purificados com Wizard SV Gel e o PCR Clean-up System (Promega, Madison, MI, USA) de acordo com a recomendação do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados usando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit in an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As sequências obtidas foram alinhadas usando o Programa CAP3 Sequence Assembly (dispónivel no site:<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). Após o alinhamento, as sequências de

nucleotídeo foram transformadas em sequência de aminoácido usando o programa Blastx program (disponível no site: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e comparado a sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). O seqüenciamento foi realizado em Belo Horizonte no Laboratório de Pesquisas em Microbiologia Universidade Federal de Minas Gerais coordenado pela Professora Titular Dra Dulciene M Magalhães de Queiroz.

### 3.5 Análise estatística

Os dados foram armazenados em banco de dados no programa de estatística SPSS para Windows versão 16 (SPSS Inc., Chicago, EUA). A análise para variáveis contínuas não paramétricas foi feita com Mann-Whitney U, os resultados foram apresentados com média  $\pm$  DP (desvio padrão), nível de significância considerado  $p < 0,05$ . A análise para variáveis categóricas foi feita através do Teste do Qui-quadrado de Pearson, o nível de significância considerado  $p < 0,05$  (bicaudal). *Odds ratios* e 95% de intervalo de confiança foram realizados para avaliar associação entre variáveis. Na análise multivariada *odds ratios* foram ajustadas para potenciais fatores de confusão como gênero e idade. As amostras com cepas mistas (*homA* e *homB* presentes) não foram incluídas na análise estatística.

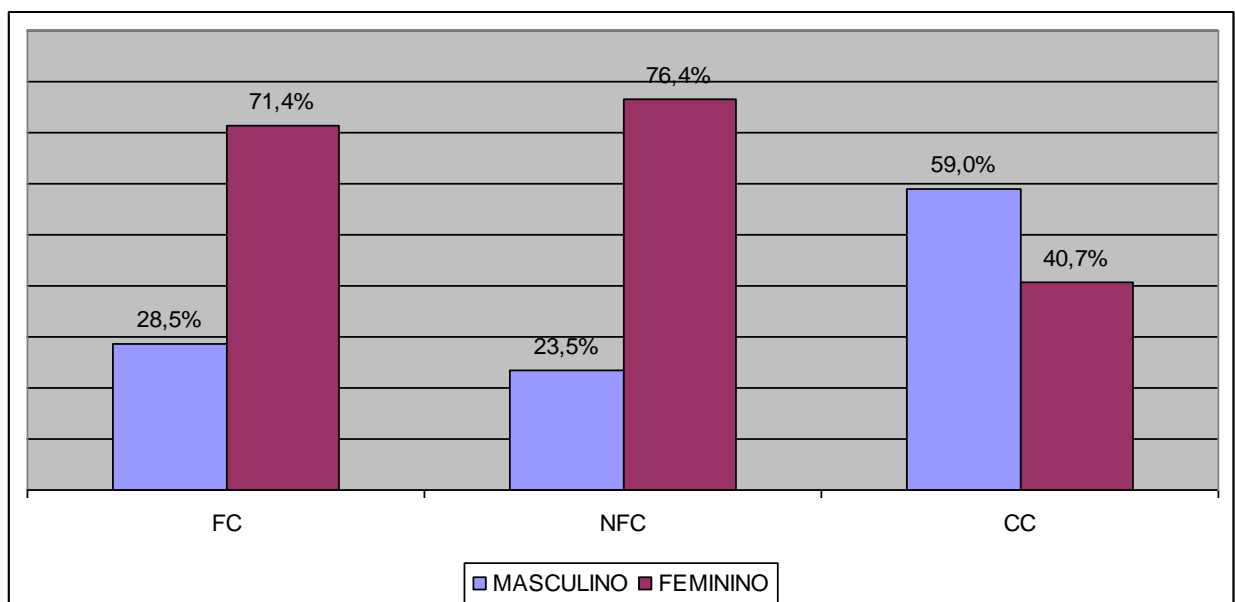
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do estresse oxidativo.

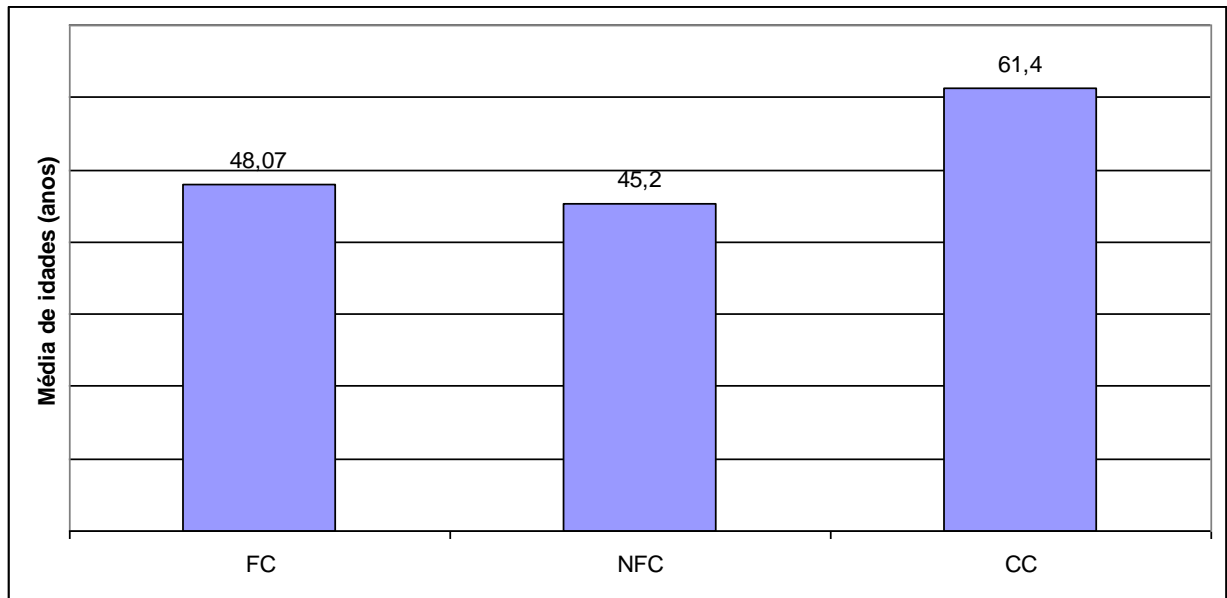
#### 4.1.1 Caracterização clínico-epidemiológica da amostra.

A concentração sérica de GSH e MDA foi avaliada em 213 indivíduos. Desses, 25,4% (54) eram portadores de câncer gástrico, 42,7% (91) FC e 31,9% (68) NFC. No grupo dos FC, 28,5% (26/91) eram do sexo masculino e 71,4% (65/91) do sexo feminino com média de idade de 48,07 anos  $\pm$ 13,2; no grupo dos NFC, 23,5% (16/68) eram do gênero masculino e 76,4% (52/68) feminino, com média de idade de 45,2 anos  $\pm$  12,27. Nos pacientes com câncer gástrico, 59% (32/54) eram do sexo masculino e 40,7% (22/54) do feminino a média de idade foi de 61,4anos  $\pm$ 16,13. O Gráfico 1 e o Gráfico 2 representam, respectivamente, o gênero e idade da amostra estudada.

**Gráfico 1:** Distribuição dos grupos estudados por gênero. Fortaleza-Ce, 2015



Fonte: Do autor

**Gráfico 2:** Distribuição dos grupos estudados por idade em anos. Fortaleza-Ce, 2015

Fonte: Do autor

A Tabela 3 apresenta dados sócio-demográficos dos grupos FC e NFC. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de FC e NFC em relação a gênero ( $p=0,476$ ), tabagismo ( $p=0,484$ ), etilismo ( $p=0,434$ ), renda familiar ( $p=0,751$ ) e nível educacional ( $p=0,209$ ). A média de idade foi de 48,07 anos  $\pm$  13,2 no grupo dos NFC, e de 45,2 anos  $\pm$  12,27 nos FC ( $p=0,177$ ). Esses dados demonstram que os grupos FC e NFC são similares em relação as variáveis avaliadas caracterizando a homogeneidade dos grupos.



**Tabela 3:** Caracterização sócio-demográfica dos indivíduos familiares de primeiro grau de câncer gástrico e dispépticos sem história familiar dessa neoplasia. Fortaleza-Ce, 2015.

Variáveis	Familiares de câncer		Não-familiares		P
	n	(FC) (%)	N	(NFC) (%)	
<b>Gênero:</b>					
Masculino	26	28,5	16	23,5	0,476
Feminino	65	71,4	52	76,4	
Tabagismo	10	10,9	10	14,7	0,484
Etilismo	23	25,2	21	30,8	0,434
<b>Renda familiar:</b>					
> 1 SM	17	20	14	20,5	0,751
1 SM - 2 SM	46	54,1	35	51,4	
Acima de 2 SM	18	21,1	14	20,5	
Acima de 4 SM	4	4,7	7	7,3	
<b>Nível Educacional:</b>					
Analfabeto	4	4,3	6	8,8	0,209
Fundamental	44	48,3	20	29,4	
Ensino médio	35	38,4	39	57,3	
Ensino superior	8	8,7	3	4,4	

Fonte: Do autor

Dos 54 pacientes portadores de câncer, 78% tinham idade abaixo de 45 anos e 21,5% maiores de 45 anos, 44% eram analfabetos, 72% possuíam renda abaixo de três salários mínimos, 58,8% tinham história de tabagismo e 50,9% de etilismo. Quando comparamos o grupo de paciente portadores de câncer gástrico com os grupos de indivíduos não portadores dessa neoplasia (FC e NFC) encontramos diferença significativa em relação às variáveis gênero ( $p=0,001$ ), idade ( $p=0,003$ ), tabagismo ( $p=0,001$ ), etilismo ( $p=0,003$ ) e escolaridade ( $p=0,001$ ).

A prevalência de *H. pylori*, na amostra populacional avaliada foi de 80,8% (114/141), sendo 97% (50/52) no grupo de pacientes portadores de câncer gástrico, 82% nos FC (75/114) e 67% (26/39) nos NFC. Houve diferença estatística da prevalência

*H. pylori* entre câncer gástrico e o grupo FC e NFC, contudo não houve diferença entre os grupos FC e NFC.

#### **4.1.2 Concentração sérica de Glutathiona reduzida (GSH) e Malondialdeído (MDA)**

A Tabela 4 apresenta a associação das concentrações séricas de MDA e GSH com gênero, faixa etária, infecção pelo *H. pylori*, ser portador ou não de câncer gástrico (inclui tanto o grupos NFC e FC) nos 213 indivíduos avaliados. Houve associação significativa com a diminuição da concentração sérica de GSH e aumento de MDA com a infecção de *H. pylori* e ser portador de câncer gástrico. A associação entre MDA e GSH com o câncer gástrico permaneceu significativa mesmo quando avaliado por regressão linear levando-se em conta todos os outros fatores apresentados na tabela , o mesmo não tendo ocorrido com a associação com a infecção por *H. pylori*.

A comparação das concentrações séricas de MDA e GSH entre portadores de câncer gástrico e Fce NFC separadamente , estão apresentados na Tabela 5. As concentrações de MDA nos grupos FC e NFC estavam significativamente mais baixas do que as encontradas nos portadores de câncer gástrico, e as de GSH mais elevadas.

**Tabela 4:** Associação das variáveis gênero, faixa etária, tabagismo, infecção por *H. pylori* e ser portador de câncer gástrico com as concentrações séricas de MDA e GSH na amostra populacional estudada- Fortaleza-CE, 2015.

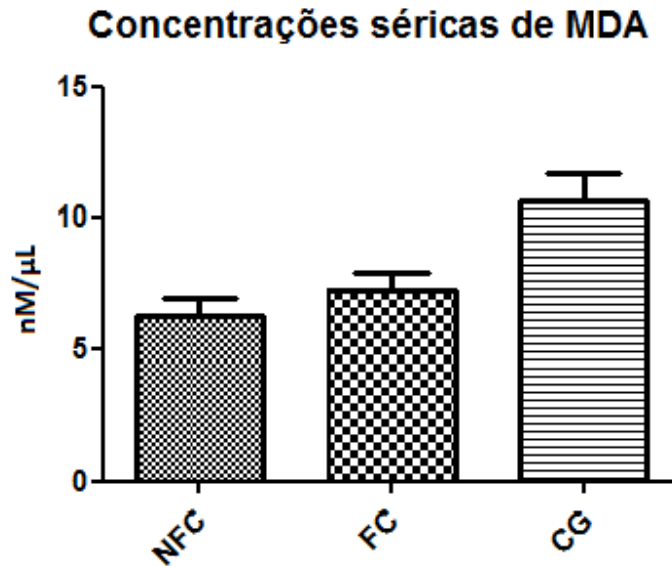
	MDA nmol/mL Média ± DP	p	GSH nmol/mL Média ± DP	p
<b>Gênero</b>				
Masculino	8,98 ± 8,37	0,241	263,56 ± 200,90	0,725
Feminino	7,13 ± 5,56		263,31 ± 205,01	
<b>Idade</b>				
≤45 anos (n=127)	8,15 ± 6,53	0,41	243,00 ± 185,22	0,215
>45anos (n=86)	7,27 ± 7,04		293,85 ± 225,48	
<b><i>H. pylori</i></b>				
Positivo (n=139)	7,27 ± 7,04	0,025	243,08 ± 184,13	0,024
Negativo (n=27)	5,75 ± 3,66		351,02 ± 231,96	
<b>Tabagismo</b>				
Sim	8,82 ± 7,58	0,094	227,43 ± 176,11	0,330
Não	7,46 ± 6,43		275,39 ± 210,87	
<b>Câncer gástrico</b>				
Sim	10,61 ± 7,58	0,01	175,15 ± 113,83	0,003
Não	6,82 ± 6,14		293,37 ± 217,79	

**Tabela 5:** Comparação das concentrações séricas de MDA e GSH entre portadores de câncer gástrico e familiares de câncer gástrico e não familiares dessa neoplasia, Fortaleza-Ce, 2015.

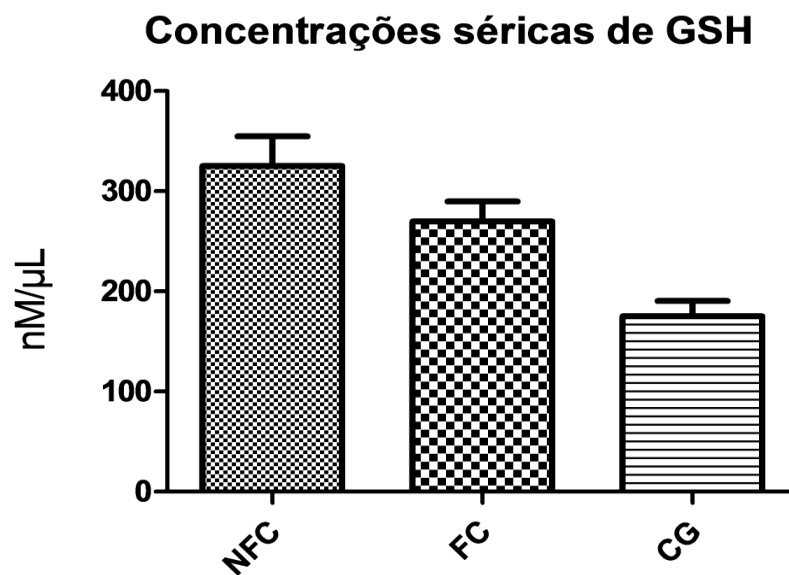
	MDA nmol/mL Média ± DP	p	GSH nmol/mL Média ± DP	p
Familiares de câncer	7,22 ± 6,53	0,01	269,70 ± 191,68	
<i>versus</i> Câncer gástrico	10,61 ± 7,58		175,15 ± 113,83	0,012
Não-familiares <i>versus</i>	6,30 ± 5,59		325,04 ± 246,42	
câncer gástrico	10,61 ± 7,58	0,001	175,15 ± 113,83	0,005

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de FC e NFC (sem os pacientes com câncer gástrico) com relação às concentrações séricas de MDA ( $p=0,401$ ), Gráfico 3. A concentração sérica do GSH nos FC foi intermediária entre câncer gástrico e NFC entretanto não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,239$ ) Gráfico 4. Também não houve diferença estatística entre a concentração de MDA e a infecção pelo *H.pylori* nos NFC ( $7.07 \pm 5.91$ ) vs FC ( $9.30 \pm 7.65$ ) ( $p=0,435$ ) assim como com o GSH, NFC ( $297.71 \pm 236.43$ ) vs PFC  $230.51 \pm 168.66$  ( $p= 0,169$ ).

**Gráfico 3:** Concentrações séricas de MDA em pacientes portadores de câncer gástrico CG, familiares de câncer gástrico (FC), e não familiares de câncer (NFC), Fortaleza 2015.



**Gráfico 4:** Concentrações séricas de GSH em pacientes portadores de câncer gástrico CG, familiares de câncer gástrico (FC), e não familiares de câncer (NFC), Fortaleza 2015.

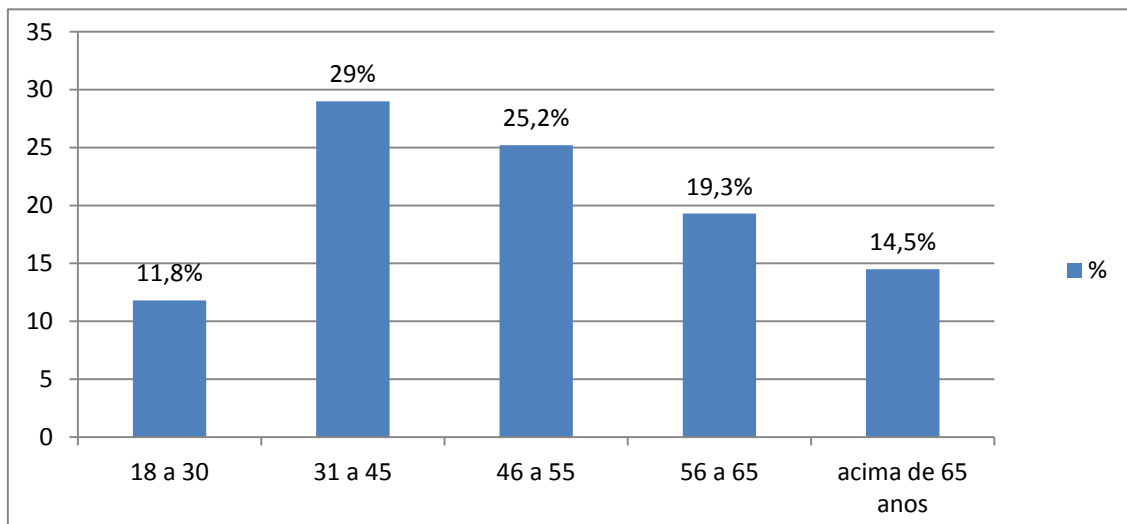


## 4.2. Avaliação dos genótipos do *H. pylori*

### 4.2.1 Caracterização da amostra

Foram avaliados 186 pacientes positivos para *H. pylori* 40,3% (75/186) do sexo masculino e 59,7% (111/186) do feminino, com idade entre 18 e 88 anos e média de idade de  $50,7 \pm 14,1$ . O Gráfico 5 mostra a distribuição da amostra por faixa etária.

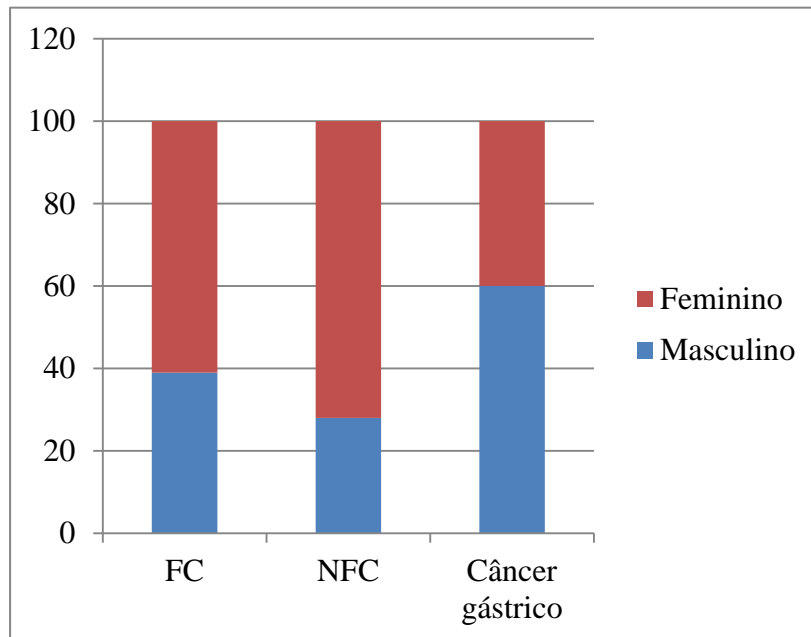
**Gráfico 5:** Distribuição da amostra estudada de indivíduos infectados com o *H. pylori* por faixa etária, Fortaleza-Ce, 2015.



Fonte: Do autor

Dos 186 indivíduos avaliados, 48 pacientes eram portadores de câncer gástrico sendo 74 FC e 64 NFC. No grupo dos pacientes com câncer gástrico, 60,4% (29) pertenciam ao sexo masculino e 39,5% (19) feminino, com média de idade de  $53,2 \pm 12,9$  anos. Dos 64 indivíduos NFC, 39% (25) eram masculino e 61% (39) feminino, com média de idade  $47,9 \pm 15,0$  anos. No grupo dos NFC 28% (21/74) eram masculino e 72% (53/74) feminino e média de idade de  $43,7 \pm 11,5$  anos. O Gráfico 7 representa a distribuição por gênero masculino ou feminino na amostra estudada.

**Gráfico 6:** Distribuição por gênero da amostra de pacientes *H. pylori*-positivos, Fortaleza-Ce, 2015.



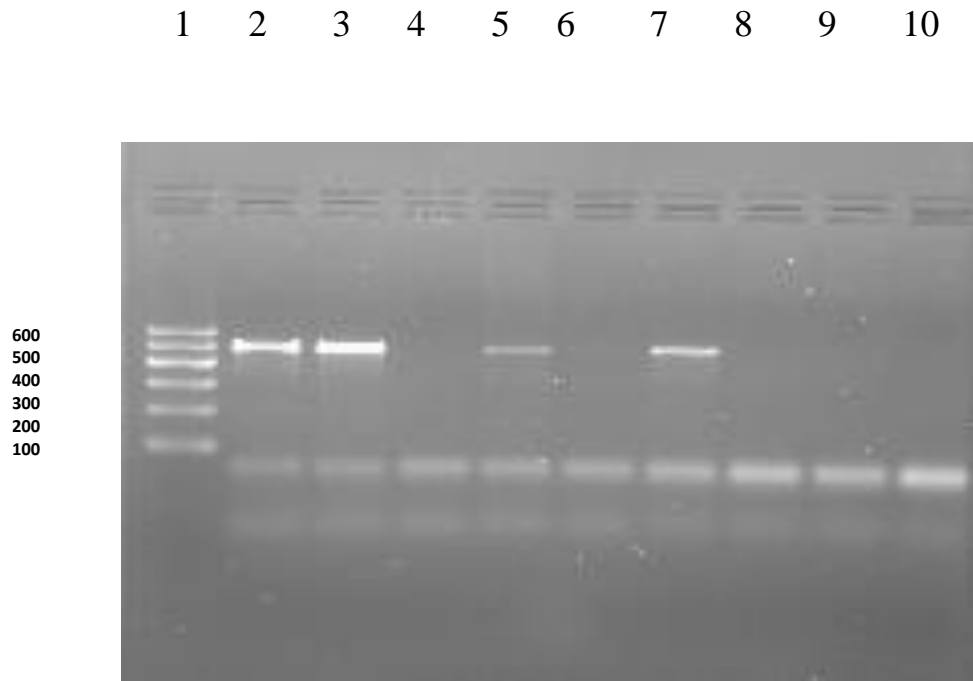
Fonte: Do autor

Não houve diferença significativa entre os indivíduos FC e NFC com relação a gênero e idade. Quanto aos aspectos endoscópicos, 80% dos FC e todos os NFC apresentaram algum tipo de gastrite. A gastrite antral foi mais prevalente nos NFC 75% vs 49% nos FC, a gastrite do corpo e ou pangastrite foi mais freqüente nos FC (39%) que nos NFC (25% 16/64).

#### 4.2.2 Avaliação do gene *cagE*

Do total de cepas dos pacientes estudados, 54,3% (101/186) expressaram o gene *cagE*, sendo que 39,6% (40/101) eram do sexo masculino, 60,3% (61/101) do feminino, média de idade de  $48,31 \pm 14,54$ . Não houve diferença significativa entre a expressão do gene *cagE* com o gênero ( $p=0,828$ ) e a idade ( $p=0,396$ ) dos pacientes estudados. A Figura 3 apresenta Gel de Agarose para visualização das bandas do gene *cagE*.

**Figura 3:** Gel de agarose para visualização das bandas do gene *cagE* na amostra de familiares de câncer , Fortaleza- Ce, 2015



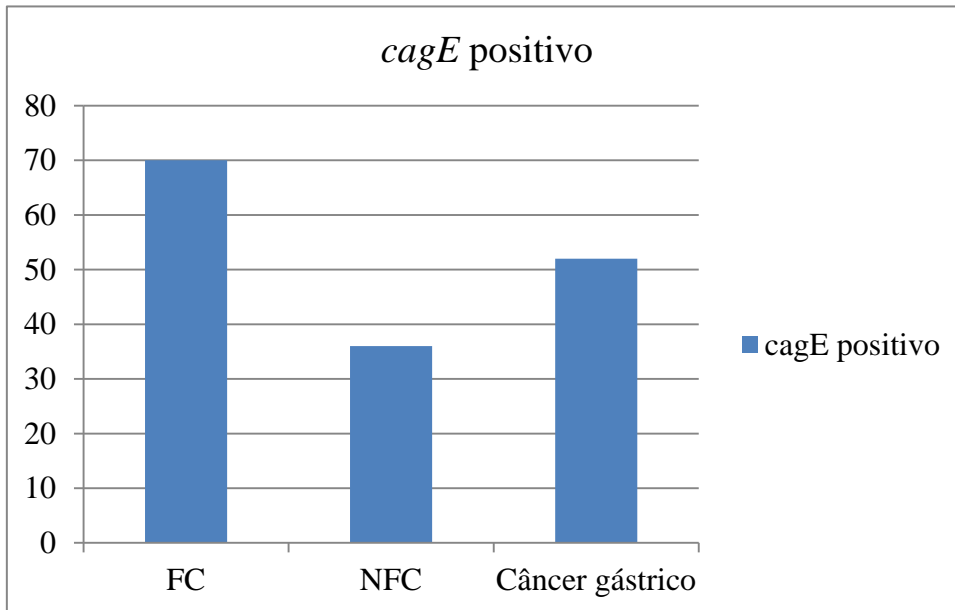
Fonte: Do autor

Poço 1: DNA Ladder	Poço 6: <i>cagE</i> negativo
Poço 2: . Controle positivo	Poço 7: <i>cagE</i> positivo
Poço 3: <i>cagE</i> positivo	Poço 8: <i>cagE</i> negativo
Poço 4: <i>cagE</i> negativo	Poço 9: <i>cagE</i> negativo
Poço 5: <i>cagE</i> positivo	Poço 10: Controle negativo

A prevalência do gene *cagE* foi de 70% (52/74) nos FC , 52% (25/48) nos pacientes portadores de câncer gástrico e 36% nos NFC como mostra o **Gráfico 8**.



**Gráfico 7:** Prevalência do gene *cagE* nos grupos estudados, Fortaleza-Ce, 2015.



Como pode ser visto na Tabela 6, houve associação significativa entre o gene *cagE* e o grupo dos indivíduos FC (OR 1,64; IC 95%: 1,271 – 2,122; p=0,001) e associação inversa com os pacientes NFC (OR 0,560; IC 95%: 0,395 - 0,800; p=0,001). Nenhuma associação entre o gene *cagE* com os pacientes portadores de câncer gástrico (OR 0,562; IC 95%: 0,693 - 2,122).

**Tabela 6:** Relação não-ajustada entre variáveis e a presença do gene *cagE* em uma amostra de indivíduos *H. pylori* positivos, Fortaleza- CE, 2015.

Variáveis	OR	IC 95%	P
Câncer gástrico	0,946	0,693 - 1290	0,720
Familiar de câncer	1,643	1,271 – 2,122	0,001
Não familiar de câncer	0,562	0,395 – 0,800	0,001

Fonte: Do autor

Após análise multivariada, ajustada para gênero, idade, o genótipo *cagE* permaneceu associado com FC (OR 3,357; IC 2,026 - 9,476 95%: p=0,001) e inversamente com os NFC (OR 0,454; IC 95%: 0,229 – 0,902; p=0,024).

A presença ou ausência do gene *cagE* foi analisada no grupo de pacientes com câncer gástrico versus NFC não havendo significância estatística ( $p=0,088$ ). Quando foi analisado câncer gástrico versus FC o gene *cagE* mostrou-se significativamente associado aos FC e não ao câncer gástrico (OR 1,42; IC: 95% 1,009–2,010;  $p=0,001$ ). A análise do gene *cagE* entre FC versus NFC foi significativamente associado aos FC (OR 2.059; IC 95%: 1.411 - 3.005;  $p=0,001$ ).

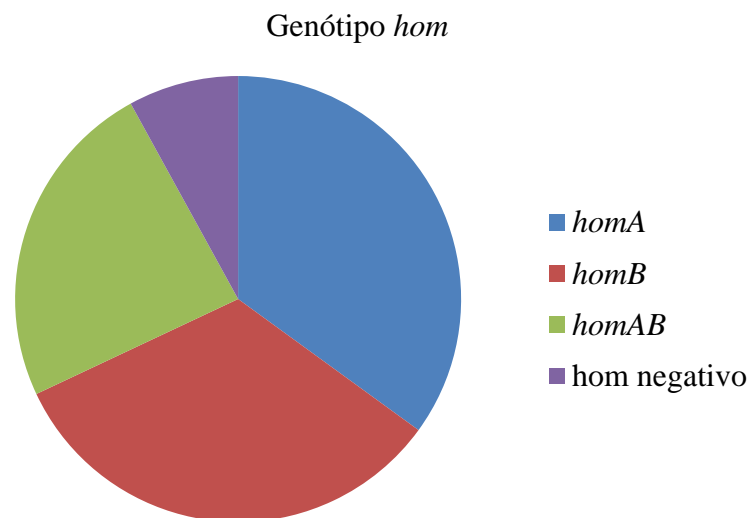
#### 4.2.3 Avaliação dos genótipos *hom* do *H. pylori* em FC e NFC

Foram avaliadas 138 cepas de *H. pylori*, 74 provenientes de FC e 64 de NFC, tendo sido excluídos das análises os 48 pacientes com câncer gástrico.

##### Genótipo *hom*

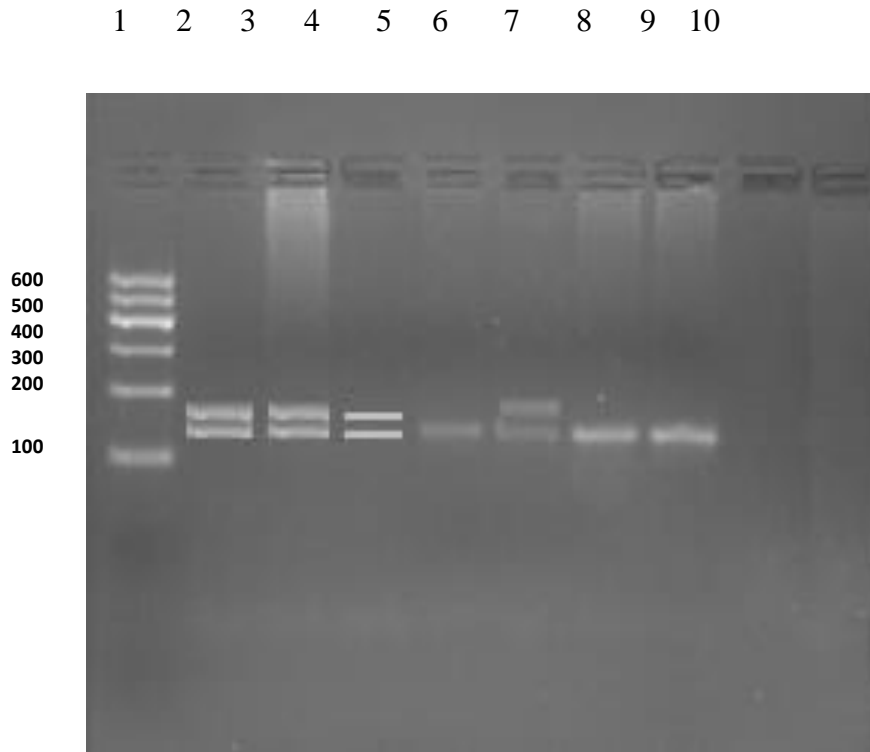
A prevalência do gene *hom* nas 138 cepas de *H. pylori* foi de 92%, (127/138), sendo que 34,7% (48) apresentaram o gene *homA*, 33,3% (46) o gene *homB* e 23,9% (33) o gene *homA/homB* e 7,9% (11) não expressaram gene *hom*, como ilustrado no Gráfico 9. A Figura 2 ilustra o padrão molecular dos genótipos mencionados em gel de agarose seguido de eletroforese.

**Gráfico 8:** Distribuição do gene *hom* do *H. pylori* na amostra estudada (N= 138), Fortaleza-Ce, 2015.



Fonte: Do autor

**Figura 4:** Gel de agarose para visualização das bandas do gene *hom* nas amostras estudadas, Fortaleza Ceará 2015.



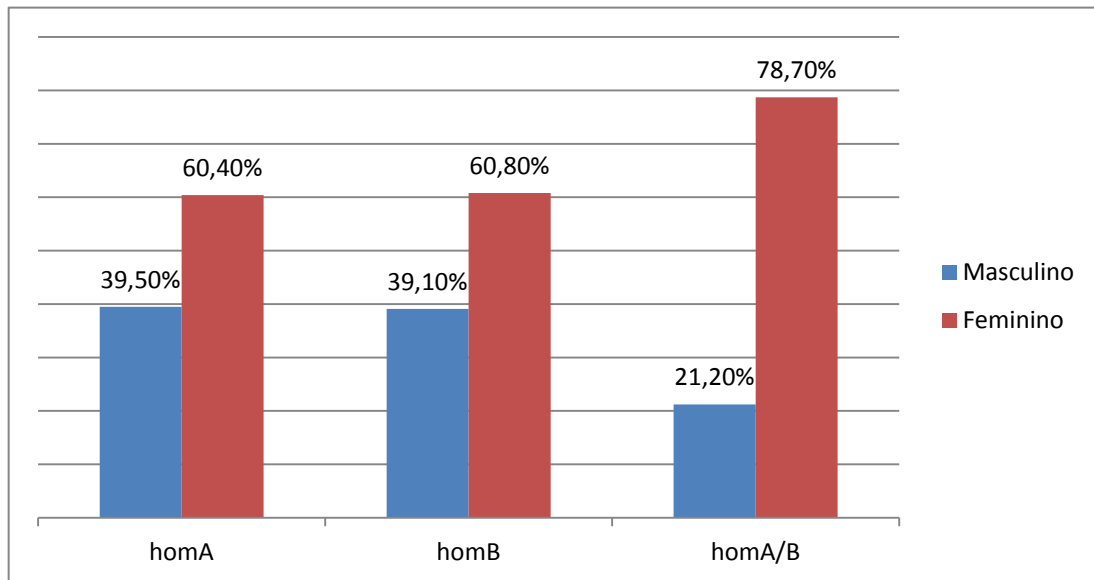
Fonte Do autor

Poço 1: DNA Ladder	Poço 6: <i>homA/homB</i> positivo
Poço 2: . Controle positivo	Poço 7: <i>homA</i> positivo
Poço 3: <i>homA/homB</i>	Poço 8: <i>homA</i> negativo
Poço 4: <i>homA/homB</i>	Poço 9: Sem amostra
Poço 5 <i>homA</i> positivo	Poço 10: Controle negativo

Das 48 cepas *homA* positivas, 39,5% (19/48) eram provenientes de indivíduos masculinos e 60,4% (29/48) femininos. Em relação ao gene *homB*, 39,1% eram do sexo masculino e 60,8% do feminino; para o gene *homA/B*, 21,2% eram do sexo masculino e

78,7% do feminino (Gráfico 9). As amostras positivas simultaneamente para *homA* e *homB* foram excluídas das análises, portanto o tamanho da amostra passou a ser 105 indivíduos.

**Gráfico 9:** Distribuição do gene *homA* e *homB* e *homA/B* do *H. pylori* em relação ao gênero, Fortaleza-Ce, 2015.



Fonte: Do autor

Das 48 cepas positivas para o gene *homA*, 25% (12/48) eram provenientes de indivíduos FC e 75% (36/48) de NFC. Com relação ao genótipo *homB*, 74% (34/46) das amostras positivas para esse gene eram provenientes de FC e 26% (12/46) dos NFC. O gene *homA* foi significativamente associado com o grupo de NFC (OR 2,357; C 95% 1,403 - 3,961;  $p=0,001$ ) e o gene *homB*, com o grupo dos FC (OR 2,726; IC 95%: 1,768 – 4,203;  $p=0,001$ ). Essa associação se manteve mesmo após análise multivariada ajustada para idade e gênero (OR 2,357; IC 95%: 1,401 – 3,96;  $p=0,001$ ).

#### 4.2.4 Caracterização dos sítios de fosforilação da região 3' do gene *cagA* nos portadores de câncer gástrico.

Foi caracterizado os sítios EPIYA do gene *cagA* de 46 cepas provenientes de pacientes portadores de câncer gástrico (29 masculino e 17 feminino média de idade 59,7

anos). Não foi encontrada nenhuma cepa com padrão asiático EPYIA D. A maioria das cepas apresentou padrão AB com exceção de duas que apresentou BC. As cepas mistas, estavam presentes em 52,1% (24/46) dos pacientes portadores de câncer gástrico. A Tabela 7 mostra a distribuição dos sítios de EPIYA em pacientes com câncer gástrico.

**Tabela 7:** Distribuição dos sítios EPIYA-C de amostras *cagA*-positivas provenientes de pacientes portadores de câncer gástrico, Fortaleza Ceará 2015.

<b>Sítios EPIYA único</b>	<b>22</b>
AB	0
BC	2
ABBBC	1
ABC	10
ABCC	5
ABCCC	4
<b>Cepas mistas</b>	<b>24</b>
ABC/ABCC	9
ABC/ABCCC	7
ABCC/ABCCC	3
ABC/ACC	0
ABC/AB	0
ABCCC/BC	2
ABC/ABCC/ABCCC	3

Fonte: Do autor

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, as concentrações de MDA (um dos produtos finais da peroxidação lipídica das membranas celulares) e GSH (um importante antioxidante) foram avaliadas em pacientes portadores de câncer gástrico e não portadores dessa neoplasia (composto por FC e NFC). O grupo de câncer gástrico mostrou-se diferente do grupo sem câncer em relação à idade, gênero, tabagismo e prevalência de *H. pylori*. No grupo de pacientes com neoplasia gástrica houve maior taxa de fumantes, de pacientes do sexo masculino, de idosos e maior prevalência de *H. pylori*. Foi avaliada a associação de MDA e GSH com todas essas variáveis (gênero, idade, faixa etária e infecção por *H. pylori*) e ser portador de câncer gástrico ou não (composto por FC e NFC). Dentre as variáveis analisadas, houve associação significativa entre concentração séricas mais elevadas de MDA assim como menor de GSH e estar infectado por *H. pylori* e ser portador de câncer gástrico. Associação de MDA e GSH com câncer gástrico se manteve significativa mesmo quando se comparou esses indivíduos com grupos específicos de FC e NFC individualmente.

Alguns estudos evidenciaram concentrações séricas de MDA mais elevadas em pacientes portadores de câncer gástrico quando comparados com seus respectivos controles (BAKAN *et al.*, 2002; ARIVAZHAGAN *et al.*, 1997; KHANZODE *et al.*, 2003), em concordância com os encontrados no presente estudo. Diferentemente, trabalho realizado na China avaliando 30 pacientes portadores de câncer gástrico e 30 controles encontrou concentrações séricas significativamente mais baixas de MDA (MA *et al.*, 2013). Em relação a outros tipos de neoplasias, estudos evidenciaram aumento da concentração sérica de MDA em câncer de mama (KILIC *et al.*, 2014), carcinoma hepatocelular e adenocarcinoma colorretal (SCIBIOR D *et al.*, 2008), enquanto outro estudo demonstrou níveis séricos diminuídos em pacientes portadores de câncer de colon (CHANG *et al.*, 2008).

Em relação a concentrações séricas de GSH, os resultados encontrados estão em concordância com alguns estudos que avaliaram a glutatona em diversos tipos de tumores, incluindo o câncer gástrico (DELLA ROVERE *et al.*, 200; BAROUDI *et al.*, 2013). Por outro lado, outros pesquisadores relataram elevadas concentrações de GSH em alguns tumores como câncer de mama (RAY *et al.*, 2000) e no câncer de cólon (NOMANI *et al.*, 2005).

A significativa associação entre *H. pylori* e a maior concentração sérica de MDA, assim como menor de GSH quando foi comparado o grupo de pacientes com e sem neoplasia (incluindo NFC e FC) pode ser decorrente do fato de, a maioria dos pacientes de câncer gástrico estarem infectados por *H. pylori* (97%), uma vez que, quando analisamos as concentrações séricas de MDA e GSH e a presença de *H. pylori* nos grupos compostos por FC e NFC (sem o grupo de câncer) não houve significância. Seria importante avaliar em estudos posteriores os marcadores de estresse oxidativo na mucosa gástrica além do soro, para fazer correlação entre presença de *H. pylori* e lesões histológicas com maior processo inflamatório tais quais gastrite de corpo e metaplasia, a fim de entender melhor o papel do *H. pylori* no estresse oxidativo.

Quando foi comparado as concentrações séricas de GSH e MDA entre FC e NFC foi observado que o grupo dos FC apresentava concentrações intermediárias de GSH (entre o grupo de NFC e portadores de câncer gástrico), embora não significante estatisticamente, sugerindo que, possivelmente esse grupo de indivíduos possa ter reserva de glutathione diminuída, o que poderia eventualmente torná-los mais vulneráveis ao desenvolvimento de neoplasia gástrica. Sabendo-se que o grupo de familiares é heterogêneo em relação a presença de lesões precursoras de câncer, como demonstrado em estudo prévio, que evidenciou maior prevalência de metaplasia, atrofia, e displasia nesse grupo de indivíduos (MOTTA *et al.*; 2008), seria importante portanto, avaliar posteriormente o estresse oxidativo levando em conta os determinados subgrupos de lesões da mucosa gástrica. Não existe nenhum estudo na literatura avaliando estresse oxidativo em familiares de câncer, não sendo possível fazer nenhuma comparação.

Existem poucos estudos na literatura avaliando o perfil de cepas de *H. pylori* em familiares de pacientes com câncer gástrico, considerado um grupo de maior risco para o desenvolvimento dessa neoplasia. Estudo prévio realizado no HUWC, avaliando 118 pacientes dispépticos sem história familiar, submetidos a endoscopia digestiva alta, e 104 pacientes com história familiar de câncer gástrico, convidados a realizar endoscopia digestiva alta de triagem, a fim de comparar a prevalência de lesões pré-cancerosas e prevalência de *H. pylori*, demonstrou que, ambos os grupos estudados apresentaram elevada prevalência de *H. pylori*, no entanto, não houve diferença entre os grupos (84.7% no grupo de familiares de pacientes com câncer gástrico e 75.9% no grupo controle). Contudo, o estudo encontrou que os familiares de pacientes com câncer gástrico apresentaram maior prevalência de pangastrite,

gastrite corporal, metaplasia intestinal e displasia e todas essas alterações significativamente associadas a presença de *H. pylori* (MOTTA *et al.*, 2008). Esses resultados são corroborados por outros estudos, em que também foi evidenciado maior prevalência de pangastrite em pacientes com história familiar de câncer (SEPULVEDA *et al.*, 2002) Essas observações reforçam a hipótese que esses pacientes possam possuir maior risco para o desenvolvimento de câncer gástrico em decorrência não apenas da susceptibilidade genética do indivíduo para desenvolver lesões precursoras de câncer gástrico, mas também por esses indivíduos estarem infectados com cepas de *H. pylori* mais virulentas, já que somente o status infectado ou não infectado por *H. pylori* não foi diferente entre os grupos avaliados (MOTTA *et al.*, 2008). Estudo subsequente realizado em Fortaleza, avaliando o perfil de cepas *cagA*, *vacA* e número de sítios de fosforilação na região 3´da proteína CagA (EPIYA) em indivíduos, com ou sem história de câncer gástrico, respectivamente (QUEIROZ *et al.*, 2012) encontrou que os familiares de pacientes portadores de câncer gástrico têm maior prevalência de cepas mais virulentas de *H. pylori vacAs1m1* e maior número de segmentos EPIYA-C, relacionados com patologias gástricas mais graves. A prevalência de *vacS1m1* nos grupos de familiares de pacientes com câncer gástrico e sem história familiar foi de 65.4 % e 47.9%, respectivamente, enquanto a prevalência de cepas com mais de um segmento EPIYA C foi de 18.6% e 43.1%, respectivamente. Outro achado interessante desse estudo foi a associação entre as cepas com maior número de segmentos EPIYA C, que confere maior patogenicidade a bactéria, com gastrite corporal e atrofia corporal. Estudo realizado na Escócia avaliando familiares de pacientes com câncer gástrico demonstrou uma forte associação entre a presença de cepas *vacS1m1* e hipocloridria, uma condição precursora do desenvolvimento do câncer gástrico (ARGENT *et al.*, 2008).

Apesar do gene *cagA* ser amplamente usado como marcador de patogenicidade de cepas do *H. pylori*, outros genes pertencentes a ilha de patogenicidade *cag*, como o gene *cagE*, tem sido sugerido como um marcador possivelmente mais acurado de virulência do que o gene *cagA*, já que o gene *cagE* se encontra sempre localizado perto da região promotora do gene *cagA* e sofre menos modificações genéticas do que o gene *cagA* (KAUSER *et al.*, 2004; YÁÑEZ *et al.*, 2009), além de ser necessário para induzir secreção de IL-8 pelas células epiteliais gástricas (CENSINI *et al.* 1996). Estudo realizado na Turquia envolvendo 93 pacientes (30 pacientes com úlcera duodenal, 33 com câncer gástrico e 30 com dispepsia não ulcerosa) evidenciou prevalência de *cagE* de 59,3% e associação desse genótipo com úlcera duodenal e câncer gástrico (ERZIN *et al.*, 2006). Em contraste, no Iran, estudo avaliando 231



pacientes portadores de câncer gástrico, úlcera e gastrite, não encontrou associação do gene *cagE* com as afecções gástricas (BAGHAEI *et al.*, 2009). Estudos realizados na Índia, Tailândia e no Brasil encontraram prevalência de gene *cagE* em pacientes com câncer de 100%, 93,8% e 53,2%, respectivamente (CHOMVARIN *et al.* 2008, ERZIN *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2011).

Em estudo prévio, realizado em Fortaleza, a prevalência do gene *cagE* foi relatada em pacientes portadores de câncer gástrico, entretanto não foi avaliada a associação desse marcador com o desfecho clínico neoplasia, uma vez que, participaram do estudo apenas o grupo de pacientes portadores de neoplasia gástrica (LIMA *et al.*, 2011). Em outro estudo, foi avaliado o gene *cagE* em grupos de pacientes portadores de gastrite e doença ulcerosa péptica tendo sido encontrada significativa associação com úlcera péptica (OLIVEIRA, 2013).

No presente estudo, dos 183 indivíduos em que os marcadores de virulência foram avaliados, em 101 (54,3% ) o gene *cagE* foi positivo pela técnica de PCR. O gene *cagE* estava presente em 23 dos 64 (36%) NFC em 25 dos 48 (52%) portadores de câncer e em 53 (70 %) dos 74 FC. Não houve significativa associação desse gene com neoplasia gástrica quando foi comparado câncer gástrico versus não portadores de câncer gástrico FC e NFC em conjunto, nem câncer gástrico versus FC e NFC especificamente. Entretanto, houve significativa e independente associação entre a presença do gene *cagE* e FC, mesmo quando o modelo logístico foi ajustado para gênero e faixa etária e relação inversa com NFC. Como não existe na literatura estudo avaliando o gene *cagE* em familiares de pacientes portadores de câncer gástrico, não foi possível fazer nenhuma comparação.

Um outro marcador de virulência de *H. pylori* avaliado nesse estudo foi o gene *hom*. Esse gene codifica uma proteína da membrana externa do *H. pylori* que tem importante papel na adesão da bactéria nas células gástricas. Vários estudos sugerem que o genótipo *homB* é um possível marcador de virulência para o desenvolvimento de patologias gástrica mais graves como doença ulcerosa péptica e câncer gástrico.

A presença do genótipo *homB* foi associada com doença ulcerosa péptica e com as cepas *vacAs1* em crianças, e em adultos abaixo de 40 anos em estudo realizado em Portugal, envolvendo 84 crianças e 106 adultos, (OLEASTRO *et al.* 2009). Outro estudo, analisando 415 amostras de diversos países Orientais e Ocidentais (incluindo 37 amostras do Brasil), concluiu que as cepas *homB* positivas provenientes de países Ocidentais, quando analisadas

em conjunto, foram significativamente associadas com DUP, diferentemente das cepas países Orientais (OLEASTRO *et al.*, 2009). Estudo realizado em Fortaleza, evidenciou associação significativa do gene *homB* com DUP em adultos independentemente da idade. Além disso, não se encontrou associação entre o gene *homB* e câncer gástrico (BRAGA NETO *et al.*, 2013). Em contraste, estudo envolvendo 286 pacientes da Colômbia e EUA encontrou que o *homB* foi significativamente associada com câncer gástrico, e não com úlcera péptica (JUNG *et al.*, 2009). Similarmente, estudo realizado no Irã, encontrou associação significativa entre o genótipo *homB* com câncer gástrico (ABADI *et al.*, 2011). Por outro lado, outro estudo realizado no Irã e Turquia, não evidenciou diferença significativa entre os grupos de gastrite e DUP em relação a prevalência *homB*, demonstrando que, na população estudada, o gene *homB* não foi um marcador capaz de diferenciar os grupos de gastrite e DUP (HUSSEIN *et al.*, 2011). Estudo coreano não evidenciou associação entre o genótipo *homB* e câncer gástrico ou úlcera péptica e postulou que exista uma hierarquia dos fatores de virulência e que, nas cepas do Sudeste Asiático, a presença de EPIYA-ABD CagA pode ser o principal marcador de virulência para o desenvolvimento de câncer gástrico (KANG, *et al.*, 2012).

No presente estudo, evidenciou-se que a prevalência do genótipo *homB* foi significativamente maior no grupo de familiares de pacientes com câncer gástrico (42%) do que a encontrada nos pacientes sem história familiar de câncer (22%), havendo significativa associação com os FC mesmo após análise multivariada ajustada para gênero, idade.

Os resultados desse estudo evidenciam que FC estão infectados com cepas de *H. pylori* com mais de um genótipo de virulência o que pode conferir maior patogenicidade a essa bactéria. Esses indivíduos estão possivelmente sob maior risco de desenvolver câncer gástrico pelo fato desses genótipos quando associados, causarem mais lesões precursoras de câncer gástrico. Será importante em estudo posterior averiguar se esses marcadores estão associados a lesões precursoras de câncer nos FC tipo metaplasia, displasia ou gastrite corporal, uma vez que, demonstrou-se previamente que esse grupo de indivíduos têm maior prevalência dessas lesões (MOTTA *et al.*, 2008).

Com relação a caracterização dos sítios EPIYA da proteína CagA, nos pacientes portadores de câncer gástrico, não foi encontrado nenhuma cepa apresentando padrão oriental tipo EPIYA D, em concordância com estudos realizados em Belo Horizonte (BATISTA *et al.*, 2011), e em estudos prévios realizados em Fortaleza pelo nosso grupo em familiares de câncer (BRAGA *et al.*, 2014), crianças assintomáticas (QUEIROZ *et al.*, 2012),

e em pacientes portadores de úlcera péptica e gastrite (OLIVEIRA 2014). Esses resultados demonstram que, no Brasil, as cepas de *H.pylori* *cagA* positivas têm o padrão EPIYA esperado para o ocidente tanto na região Sudeste quanto na região Nordeste do país.

A presença EPIYA-A e B foi detectado na maioria das cepas *cagA*-positivas, apenas duas cepas apresentaram EPIYA-BC, estando de acordo com o que é nos encontrado nos países ocidentais (YAMAOKA *et al.*, 1999). A presença de cepas mistas (indicando colonização por mais de uma cepa) encontrada no grupo de pacientes portadores de câncer gástrico foi alta, esse resultado está em consonância com estudo realizado em Minas Gerais (BATISTA *et al.*, 2011), onde as cepas mistas de *H.pylori* também foi elevada e mais freqüentemente encontrada nos pacientes de câncer gástrico do que no grupo de gastrite ou ulcera duodenal. Estudos posteriores são necessários para se melhor compreender o papel do gene *cagA* na carcinogênese gástrica.

Pelo exposto, possivelmente, diminuir a peroxidação lipídica, aumentar a reserva de antioxidantes e identificar grupos de maior risco quanto ao perfil de cepas de *H. pylori* poderá ser importante para a prevenção do câncer gástrico.

## 6 CONCLUSÃO

Pacientes portadores de câncer gástrico apresentam estresse oxidativo aumentado, quando comparado com pacientes sem neoplasia.

Os familiares de primeiro grau de portadores de câncer gástrico apresentam menor anti-oxidação do que os não familiares, porém sem significância estatística.

A infecção gástrica por *H. pylori* está associada com concentrações mais elevadas de MDA e diminuída de GSH sérico nos

A prevalência dos genótipos *homB* e *cagE* do *H.pylori* foi mais alta nos familiares de portadores de câncer gástrico e, significativamente, associado a esse grupo quando comparada com os não familiares.

Não houve diferença significativa entre cepas de *H.pylori* provenientes de pacientes portadores de câncer gástrico e gastrite com relação a prevalência do gene *cagE*.

A avaliação dos sítios de fosforilação EPYIA da proteína CagA de cepas de *H.pylori* provenientes de pacientes portadores de câncer gástrico, apresentou padrão ocidental EPYIA-C, e elevada prevalência de cepas mistas.

## REFERÊNCIAS

- ABADI, A. T. B. *et al.* *Helicobacter pylori* *homB*, but not *cagA*, is associated with gastric cancer in Iran. **J Clin Microbiol.**, v. 49, p. 3191-3197, 2011.
- AMORIM, C. A. *et al.* Ecological study of gastric cancer in Brazil: Geographic and time trend analysis. **World J Gastroenterol.**, v. 20, n. 17, p. 5036-5044, 2014.
- ARGENT, R. H. *et al.* Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. **J Med Micro.**, v. 57, p. 1062-1067, 2008.
- ARIVAZHAGAN, S.; KAVITHA, K.; NAGINI, S. Erythrocyte lipid peroxidation and antioxidants in gastric cancer patients. **Cell Biochem Funct.**, v. 15, n. 1, p. 15-8, 1997.
- ASPHOLM-HURTIG, M. *et al.* Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. **Science.** v. 305, p. 519-522, 2004.
- ATHERTON, J.C. *et al.* Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J Biol Chem.**, v. 270, p. 1771-1777, 1995.
- ATHERTON, J.C. The pathogenesis of *Helicobacter pylori* induced gastro-duodenal disease. **Annu Rev Pathol Mech Dis.**, v. 1, p. 63-96, 2006.
- BAGHAEI K. *et al.* Determination of *Helicobacter pylori* virulence by analysis of the *cag* pathogenicity island isolated from Iranian population. **Dig Liver Dis.**, v. 41, p. 634-638, 2009.
- BAIK, S.C. *et al.* Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. **Cancer Res.**, v 56, n. 6, p. 1279-82. 1996.
- BAKAN, E.; TAYSI, S.; POLAT, M.F. Nitric oxide levels and lipid peroxidation in plasma of patients with lipid peroxidation. **Jpn J Clin Oncol.**, v. 35, p. 162-166, 2002.
- BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, aging. **Cell.**, v. 120, p. 483-495, 2005.
- BAROUDI, O. *et al.* Status of antioxidant enzyme: glutathione peroxidase and total polyphenol level in plasma of Tunisian patients suffering from colorectal and gastric cancer: interaction with clinical outcome. **Med Oncol.**, v. 30, n. 4, p. 013-0731, 2013.
- BATISTA S.A. *et al.* Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. **BMC Microbiol.**, v. 11, n. 61, 2011.
- BHATTACHARYA, A. *et al.* Oxidative stress an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiol Rev.**, v. 94, p. 329-354, 2014.

- BLASER, M. J. *et al.* Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Res.**, v. 55, p. 2111-5, 1995.
- BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. **BMJ.**, v. 316, p. 1507-10, 1998.
- BRAGA-NETO, M. B. *Helicobacter pylori* virulence genes detected by string PCR in children from an urban community in northeastern Brazil. 2013. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Médico-cirúrgicas)- Faculdade de Medicina- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- CENSINI, S. *et al.* Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 93, p. 14648-14653, 1996.
- CHANG, D. *et al.* Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients. **Biomed Environ Sci.**, v. 21, p. 286-289, 2008.
- CHOMVARIN, C. *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. **Int J Infect Dis.**, v. 2, p. 30-6, 2008.
- CHU, F. F. *et al.* Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. **Cancer Res.**, v. 64, p. 962-968, 2004.
- CHU, F. F.; DOROSHOW, J. H.; ESWORTHY, R. S. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. **J Biol Chem.**, v. 268, p. 2571-2576, 1993.
- CLAYTON, C. L. *et al.* Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol.**, v. 30, p. 192-200, 1992.
- CRABTREE, J. E. *et al.* Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection. **Scand J Immunol.**, v. 37, n. 1, p. 65-70, 1993.
- DALLE-DONNE, I. *et al.* Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin. Chem.**, v. 52, p. 60-623. 2006.
- DELLA ROVERE, F. *et al.* SH groups and glutathione in cancer patient's blood. **Anticancer Res.**, v. 20, p. 1595-8, 2000.
- DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 421-431, 1990.
- EL-OMAR, E.M. *et al.* *Helicobacter pylori* infection and chronic gastric acid hyposecretion. **Gastroenterology**, v. 113, p. 15-24. 1997.
- EL-OMAR, E.M. *et al.* Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of *H. pylori*. **Gastroenterology.**, v. 118, p. 22-30, 2000.
- EL-OMAR, E.M. *et al.* Increased risk of noncardia gastric cancer associated with

proinflammatory cytokine gene polymorphisms. **Gastroenterology**, v. 124, p. 1193-1201, 2003.

ERNST, P. B.; GOLD, B. D. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. **Annu Rev Microbiol.**, v. 54, p. 615-640, 2000.

ERZIN, Y. *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA e babA2*, Genotypes and Correlation with Clinical Outcome in Turkish Patients with Dyspepsia. **Helicobacter**, v. 11, p. 574-580, 2006.

EVERHART, J. E. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol Clin N Am.**, v. 29, p. 559-578, 2000.

FIALHO, A. M. *et al.* Younger siblings play a major role in *Helicobacter pylori* transmission among children from a low-income community in the Northeast of Brazil. **Helicobacter**, v. 15, n. 6, p. 491-6, 2010.

FORD, A. C. *et al.* *Helicobacter pylori* eradication therapy to prevent gastric cancer in healthy asymptomatic infected individuals: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BMG.**, v. 348, 2014.

FURUTA, T. *et al.* Effect of genotypic differences in interleukin-1 beta on gastric acid secretion in Japanese patients infected with *Helicobacter pylori*. **Am J Med.**, v. 112, p. 141-143. 2002.

GARZA-GONZÁLEZ, E. *et al.* Role of polymorphism of certain cytokines in gastric cancer in Mexico. Preliminary results. **Rev Gastroenterol Mex.**, v. 68, p. 107-112, 2003.

GEBERT, B. *et al.* *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. **Science.**, v. 301, p. 1099-110210, 2003.

GOTO, T. *et al.* Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients. **Clin Cancer Res.**, v. 5, p. 1411-5. 1999.

GRAHAM, Y.H.; LIPSITCH, M.; AIELLO, A.E. Secular trends in *Helicobacter pylori* seroprevalence in adults in the United States: evidence for sustained race/ethnic disparities. **Am J Epidemiol.**, v. 175, p. 54-9, 2012.

GUO X.; ZHAO B.H.; ZHANG M.X. Risk factors of *Helicobacter pylori* infection among adults in Northern China. **Hepatogastroenterology.**, v. 105, p. 306-310, 2011.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ Health Perspect.**, v. 102, Suplemento 10, p. 5-12, 1994.

HARDBOWER, D.M.; PEEK R.M.; WILSON K.T. At the bench: *Helicobacter pylori* disregulated host responses, DNA damage, gastric cancer. **J Leuk Biol.**, v. 96, p. 201-212. 2014.

HATAKEYAMA, M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. **Nat Rev Cancer.**, v. 4, p. 688-694, 2004.

HIGASHI, H. *et al.* Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 99, p. 14428-14433, 2002.

HUSSEIN, N. R. A study of *Helicobacter pylori* outer-membrane proteins (*hom*) A and B in Iraq and Turkey. **J Infect Public Health.**, v. 3, p. 135-139, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR (INCA/MS). Câncer de estômago. Disponível: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/es tomago/definição>>.

ISHIJIMA, N.; SUZUKI, M.; ASHIDA, H. *et al.* BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. **J Biol Chem.**, v. 286, p. 25256-25264, 2011.

JANJETIC, M.A. *et al.* Decreasing trend of *Helicobacter pylori* infection in children with gastrointestinal symptoms from Buenos Aires, Argentina. **Helicobacter**, v. 16, p. 316-319, 2011.

JONES, K.R. *et al.* Polymorphism in the CagA EPIYA motif impacts development of gastric cancer. **J Clin Microbiol.**, v. 47, p. 959-968, 2009. JUNG, S. W. *et al.* *homB* status of *Helicobacter pylori* as a novel marker to distinguish gastric cancer from duodenal ulcer. **J Clin Microbiol.**, v. 47, p. 3241-3245, 2009.

KANG, J. *et al.* The Geographic Origin of *Helicobacter pylori* Influences the Association of the *homB* Gene with Gastric Cancer. **J Clin Microbiol.**, v. 50, p. 1082-1085, 2012.

KAUSER, F. *et al.* The Cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* is disrupted in the majority of patient isolates from different human populations. **J Clin Microbiol.**, v. 42, p. 530-538, 2004.

KELLY, S.M., *et al.* Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. **Gastroenterology.**, v. 107, p.1671-1674, 1994.

KHANZODE, S. S.; KHANZODE, S. D.; DAKHALE, G. N. Serum and plasma concentration of oxidant and antioxidants in patients of *Helicobacter pylori* gastritis and its correlation with gastric cancer. **Cancer Lett.**, v. 195, n. 1, p. 27-31, 2003.

KILIC, N. *et al.* An investigation into the sérum thioredoxin, superoxide dismutase, malondialdehyde and advanced oxidation protein products in patients with breast cancer. **Ann Surg Oncol.**, v. 21, p. 4139-4143, 2014.

KIM, S. Y. *et al.* *Helicobacter pylori* CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. **Cell Microbiol.**, v. 8, p. 97-106, 2006.

KIM, Y.J.; KIM, E.H.; HAHM, K.B. Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: challenges and opportunities. **J Gastroenterol Hepatol.**, v. 27, p. 1004-1010, 2012.



KONG, X. *et al.* Comparison of the clinicopathological characteristics of young and elderly patients with gastric carcinoma: a meta analysis. **J Surg Oncol.**, v. 106, p. 346-352, 2012.

KULKARNI, A. C.; KUPPUSAMY, P.; PARINANDI, N. Oxygen, the lead actor in the pathophysiological drama: enactment of the trinity of normoxia, hypoxia, and hyperoxia in disease and therapy. **Antioxid Redox Signal.**, v. 9, p. 1717-1730, 2007.

LA VECCHIA, C. *et al.* Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. **Cancer.**, v.70, p. 50-55. 1992.

LAPOINTE, T. K. *et al.* Interleukin-1 receptor phosphorylation activates Rho kinase to disrupt human gastric tight junctional claudin-4 during *Helicobacter pylori* infection. **Cell Microbiol.**, v. 12, p. 692-703, 2010.

LAUREN ,P.: The two histological main types of gastric cancer: Diffuse and so-called intestinal type carcinoma. **Acta Path Microbiol Scand**, v.64, p.31, 1965.

LEE, I. O. *et al.* *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation status determines the gp130-activated SHP2/ERK and JAK/STAT signal transduction pathways in gastric epithelial cells. **J Biol Chem.**, v. 285, p. 16042-16050, 2010.

LETLEY, D. P. *et al.* Allelic diversity of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in South Africa: rarity of the *vacA* s1a genotype and natural occurrence of an s2/m1 allele. **J Clin Microbiol.**, v. 37, p. 1203-1205, 1999.

LIMA, V.P. *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.**, v. 35, p. 32-37, 2011.

LIMA, V.P. *et al.* The relationship between *Helicobacter pylori* genes *cagE* and *virB11* and gastric cancer. **Int J Infect Dis.**, v. 14, p. 613-617, 2010.

MA, Y. *et al.* Relation between gastric cancer and protein oxidation, DNA damage, and lipid peroxidation. **Oxid Med Cell Longev**, v. 543760, n. 10, p. 24, 2013.

MACHADO, J.C. *et al.* Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. **Gastroenterology**, v. 121, p. 823-829, 2001.

MARSHALL, B. J. *et al.* Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. **Med J Austr.**, v. 142, p. 436-439, 1985.

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

MATTAR, R. *et al.* Association of *LEC* and *tnpA* *Helicobacter pylori* genes with gastric cancer in a Brazilian population. **Infect Agent Cancer.**, v. 5, p. 1, 2010.

MATTAR, R. *et al.* *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. **J Med Microbiol.**, v. 56, p. 9-14, 2007.

- MATYSIAK-BUDNIK, T.; F. MEGRAUD. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection with special reference to professional risk. **J Physiol Pharmacol.**, v. 48 Suplemento 4, p. 3-17, 1997.
- MIEHLKE, S. *et al.* The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. **Int J Cancer.**, v. 87, p. 322-327, 2000.
- MISIEWICZ, J.J. The Sydney System: a new classification of gastritis. Introduction. **J Gastroenterol Hepatol.**, v. 6, p. 207-208, 1991.
- MOBLEY, H. L. T. *Helicobacter pylori* urease. In: ACHTMAN, M.; SUERBAUM, S. (Ed.) *Helicobacter pylori: molecular and cellular biology*. Wymondham, United Kingdom: **Horizon Scientific Press**, p. 155-170, 2001.
- MOTTA, C. R. A. *et al.* Gastric precancerous lesions and *Helicobacter pylori* infection in relatives of gastric cancer patients. **Digestion.**, v. 78, p. 3-8, 2008.
- NAGASE, L.; MURATA-KAMIYA, N.; HATAKEYAMA, M. Potentiation of *Helicobacter pylori* CagA protein virulence through homodimerization. **J Biol Chem.**, v. 286, p. 33622-33631, 2011.
- NAITO, M. *et al.* Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. **Gastroenterology**, v. 130, p. 1181-1190, 2006.
- NOMANI, H. *et al.* Glutathione S-transferases activity in patients with colorectal cancer. **Clin Biochem**, v. 38, n. 7, p. 621-4, 2005.
- OBST, B. *et al.* *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells, **Carcinogenesis**, v. 21, p. 1111-1115, 2000.
- OLEASTRO, M. *et al.* Disease association with two *Helicobacter pylori* duplicate outer membrane protein genes, *homB* and *homA*. **Gut Pathogens**, v. 1, p. 12, 2009.
- OLEASTRO, M.; MÉNARD, A. The Role of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis. **Biology** (Basel), v. 2, p. 1110-1134, 2013.
- OLIVEIRA, M. A. A. Sítios de fosforilação de tirosina da proteína CagA e genótipos cagE do *H. pylori* em pacientes com gastrite e úlcera péptica. 2014. **Tese** (Doutorado em Ciências Médico-cirúrgicas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- PACHATHUNDIKANDI, S.K.; TEGTMEYER, N.; BACKERT: Signal transduction of *Helicobacter pylori* during interaction with host cell protein receptors of epithelial and immune cells. **Gut Microbes.**, v. 4, p. 454-474, 2013.
- PALLI, D. *et al.* Family history and risk of stomach cancer in Italy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 3, p. 15-18, 1994.
- PANDEYA, N.; WHITEMAN, D.C. Prevalence and determinants of *Helicobacter pylori* sero-positivity in the Australian adult community. **J Gastroenterol Hepatol.**, v. 26, p. 1283-1289, 2011.

PARSONNET, J. *et al.* *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. **N Engl J Med**, v. 325, p. 1127-1131, 1991.

PEEK JUNIOR, R. M. *et al.* 1995. Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. **J Clin Microbiol.**, v. 33, p. 28-32, 1995.

PERSSON, C. *et al.* Polymorphisms in inflammatory response genes and their association with gastric cancer. A HuGE systematic review and meta-analysis. **Am J Epidemiol.**, v. 173, p. 259-270, 2011.

PETERSON, A. J. *et al.* *Helicobacter pylori* infection promotes methylation and silencing of trefoil factor 2, leading to gastric tumor development in mice and humans. **Gastroenterology**, v. 139, p. 2005-2017, 2010.

QUEIROZ, D. M. *et al.* Natural history of *Helicobacter pylori* infection in childhood: eight-year follow-up cohort study in an urban community in Northeast of Brazil. **Helicobacter**, v. 17, p. 23-29, 2012.

RAMARAO, N.; GRAY-OWEN, S.D.; MEYER, T.F. *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity. **Mol Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 103-13. 2000.

RAY, G. *et al.* Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 59, n. 2, p. 163-70, 2000.

RILEY, P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **Int J Radiat Biol.**, v. 65, p. 27-33, 1994.

ROCHA, G. A. *et al.* Transmission of *Helicobacter pylori* infection in families of preschool-aged children from Minas Gerais, Brazil. **Trop Med Int Health**, v. 18, n. 11, p. 987-911, 2003.

ROCHA, G.A. *et al.* IL1RN polymorphic gene and cagA-positive status independently increase the risk of noncardia gastric carcinoma. **Int J Cancer.**, v. 115, p. 678-683, 2005.

RODRIGUES, M. N. *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children from a north-east Brazilian urban community and risk factors for infection. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 2, p. 201-205, 2004.

SAVAGE, S.A. *et al.* Variants of the IL8 and IL8RB genes and risk for gastric cardia adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 13, p. 2251-2257, 2004.

SCIBIOR, D. *et al.* Glutathione level and glutathione-dependent enzyme activities in blood serum of patients with gastrointestinal tract tumors. **Clin Biochem.**, v. 41, p. 852-8, 2008.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, proteinbound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

- SEPULVEDA, A. R. *et al.* CpG methylation and reduced expression of O-6-Methylguanine DNA methyltransferase is associated with *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology**, v. 138, p. 1836-1844, 2010.
- SEPULVEDA, A.R. *et al.* Histological patterns of gastritis in *H. pylori* - infected individuals with a family history of gastric cancer. **Am J Gastroenterol**, v. 97, p. 1365-1370, 2002.
- SHIN, C. *et al.* Stomach Cancer Risk in Gastric Cancer Relatives: Interaction Between *Helicobacter pylori* Infection and Family History of Gastric Cancer for the Risk of Stomach Cancer. **J. Clin Gastroenterology**, v. 44, n.2,p.34-39,2010.
- SHIRIN, H.; PINTO, J. T.; MOSS, S. F. Influence of clinical factors, drug use, and food intake on the glutathione system. **Gut.**, v. 52, n. 1, p. 154-155, 2003.
- SU, B.; CEPONI, P. J.; SHERMAN, P. M.; CYTOSKELETAL rearrangements in gastric epithelial cells in response to *Helicobacter pylori* infection. **J Med Microbiol.**, v. 52, p. 861–867, 2003.
- TAYLOR, D. N. *et al.* The epidemiology of *helicobacter pylori* infection. **Epidemiol Rev.**, v. 13, p. 42-59, 1991.
- TOMASINI, M. L. *et al.* Heterogeneity of *cag* genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. **J Clin Microbiol.**, v. 41, p. 976–980, 2003.
- TOMITA, H. *et al.* Inhibition of gastric carcinogenesis by the hormone gastrin is mediated by suppression of TFF1 epigenetic silencing. **Gastroenterology.**, v. 140, p. 879-91, 2011.
- TONKIC, A. *et al.* Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori*. **Helicobacter.**, v. 17, p. 1-18, 2012.
- UEMURA, N. *et al.* *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. **N Engl J Med.**, v. 345, p. 784-789, 2001.
- WEX, T. *et al.* P. Serological prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Saxony-Anhalt, Germany, in 2010. **Clin Vaccine Immunol.**, v.18, p. 2109-12, 2011.
- WINGLER, K. *et al.* Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. **Gastroenterology.**, v. 119, p. 420-430, 2000.
- YAMAOKA, Y. *et al.* Importance of *Helicobacter pylori oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. **Gastroenterology.**, v. 123, p. 414-424, 2002.
- YAMAOKA, Y. *et al.* Relationship between the *cagA* 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. **Gastroenterology.**, v. 117, p. 342-349, 1999.
- YAMAOKA, Y. Mechanisms of Disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. **Nat. Rev. Gastroenterol Hepatol.**, n. 7, v.11, p. 629-641, 2010.

YAMAOKA, Y., *et al.* Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. **J Clin Microbiol.**, v. 36, p. 2258-2263. 1998.

YÁÑEZ, M.A. *et al.* Quantitative detection of *Helicobacter pylori* in water samples by real-time PCR amplification of the *cag* pathogenicity island gene, *cagE*. **J Appl Microbiol.**, v. 107, p. 416-24, 2009.

ZAMBON, C. F. *et al.* *Helicobacter pylori* *babA2*, *cagA* and *s1 vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. **J Clinic Pathol.**, v. 56, p. 287-291, 2003.

## APÊNDICE A - DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO *H. PYLORI* E A AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER GÁSTRICO E FAMILIARES DE CÂNCER GÁSTRICO

**Introdução:** Antes de aceitar participar desta pesquisa, é necessário que você leia e compreenda as explicações sobre os procedimentos propostos. Esta declaração esclarece o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e precauções do estudo. Também descreve os procedimentos alternativos que estão disponíveis para você e o seu direito de se retirar do estudo a qualquer momento.

**Objetivo:** Esse trabalho tem como objetivo investigar o papel de determinados tipos (cepas) da bactéria *Helicobacter pylori* nas alterações encontradas na mucosa do estômago de pacientes com sintomas de dispepsia (azia, desconforto abdominal, dor epigástrica, etc.), através de biópsias (pequenos fragmentos) colhidas durante o exame endoscópico, de forma totalmente indolor, permitindo identificar a presença de alterações na mucosa gástrica. As biópsias também serão utilizadas para se avaliar, através de técnica de biologia molecular (extração do DNA da bactéria), os determinados tipos fenotípicos (cepas) de *Helicobacter pylori*.

**Resumo:** O *H. pylori* é uma bactéria que causa gastrite e úlcera péptica. A dispepsia é um dos sintomas mais comuns de problemas gastrointestinais e está relacionada a doenças como gastrite e úlcera. O *Helicobacter pylori* apresenta características distintas entre suas populações (cepas) que podem torná-lo mais ou menos perigoso à saúde humana, dentre elas, está a produção de proteínas que danificam a mucosa gástrica denominadas HomA e HomB, que são alvo deste estudo, por isso procuramos identificar e estudar as cepas desta bactéria. Como a infecção pelo *Helicobacter pylori* acomete cerca de 50% das pessoas no mundo, é muito importante esclarecer o papel desta bactéria no desenvolvimento das doenças gástricas e também procurar alternativas de tratamento para essa infecção.

**Procedimento:** Serão realizadas biópsias da mucosa gástrica, por ocasião desse estudo, nos pacientes com sintomas dispépticos. Essa coleta nos permitirá identificar a presença ou não de *Helicobacter pylori*, bem como avaliar mais detalhadamente as alterações microscópicas, após análise complementar de um médico patologista. Com relação à punção venosa para a colheita de sangue, pode haver dor local e ocasionar a formação de hematomas no local da

punção. Risco de gravidade mínima para o paciente. A colheita de sangue será feita por profissionais devidamente treinados, o que certamente tende a minimizar o desconforto causado e evitar a formação de hematomas no local da punção. Não há benefício direto, tratando-se de estudo experimental, com a finalidade de testar a hipótese de que o *Helicobacter pylori* se relaciona com algumas patologias gástricas. Somente ao final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

**Despesas:** Não há despesas pessoais do paciente para a realização do estudo em qualquer uma de suas fases, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo de causa comprovado), o paciente tem direito a tratamento médico, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

**Benefícios:** A sua participação será muito importante para o conhecimento médico da infecção pelo *H. pylori* e poderá contribuir no futuro para a melhoria do controle da infecção em nosso país. Vale ressaltar que ao participar da pesquisa não haverá nenhum tipo de prejuízo para você e seu filho assim como não haverá nenhuma remuneração.

**Confidencialidade:** Os seus resultados serão fornecidos individualmente e mantidos em sigilo. Nenhum paciente será identificado quando da exposição ou divulgação dos resultados finais deste estudo. A equipe de profissionais da saúde responsável pelo estudo o manterá informado(a) quanto ao progresso da pesquisa, de acordo com suas solicitações.

**Desligamento:** Você poderá se afastar a qualquer momento sem prejuízo para o seu acompanhamento médico. O seu médico poderá finalizar a sua participação neste estudo em qualquer ocasião sem prejuízo para o seu acompanhamento.

**Contato com o pesquisador:** Dr Manuel Bonfim Braga Neto pode ser feito pelo telefone (085) 3366-8444. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, você poderá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC no número (085) 3366-8338.

**Consentimento Livre e Esclarecido:**

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por

mim, indicando o meu consentimento para que participe do estudo, até que eu decida o contrário. Receberei uma cópia assinada deste consentimento.

Assinatura do Paciente

---

RG: \_\_\_\_\_, órgão expedidor: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha:

---

Data: \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável pelo estudo: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_



## APÊNDICE B – Questionário

**TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO *H. PYLORI* E A AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER GÁSTRICO E FAMILIARES DE CÂNCER GÁSTRICO**

CÓDIGO: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Preenchido por:

\_\_\_\_\_

### 1. IDENTIFICAÇÃO

1.1 Paciente: \_\_\_\_\_

1.2 Sexo: 1.  Masculino 2.  Feminino 1.3 Idade: \_\_\_\_\_

1.4 Data de Nascimento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

1.5 : Naturalidade \_\_\_\_\_ 1.6 Procedência

\_\_\_\_\_

1.7 Endereço:

\_\_\_\_\_

1.8 Fones contato: \_\_\_\_\_ 1.9 Referência:

\_\_\_\_\_

1.10 Cidades: \_\_\_\_\_ 1.11 Estado:

\_\_\_\_\_

1.12 Qual parentesco como caso índice: \_\_\_\_\_

### 2. HISTÓRIA CLÍNICA

2.1) Queixa Principal:

\_\_\_\_\_

2.2) Dor: 1.  Queimação 2.  Pontada 3.  "Roendo" 4.  Tipo "fome"

5.  Outra: \_\_\_\_\_

2.3) Localização: 1.  Epigástrica 2.  Hipocôndrio direito 3.  Costas

4.  Outra: \_\_\_\_\_

2.4) Dor noturna: : 1.  Frequente 2.  Rara 3.  Nunca

2.5) Relação com o estresse: 1.  Sim 2.  Não

2.6) Alívio da Dor: 1.  Alimentação 2.  Antiácidos 3.  Antagonista H2  
4.  Inibidor de bomba de próton 5.  Outros: \_\_\_\_\_

2.7) Hematêmese : 1.  Sim 2.  Não. 2.8) Melena: 1.  Sim 2.  Não

2.9) Perda de peso? 1.  Sim 2.  Não Quantos quilos? \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

2.10) Empachamento? 1.  Sim 2.  Não 2.11) Azia: 1.  Sim 2.  Não

2.12) Disfagia? 1.  Sim 2.  Não

2.13) Endoscopia prévia? 1.  Sim Quantas: \_\_\_\_\_ 2.  Não

Resultados: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

2.14) História de úlcera na família? 1.  Sim; Qual o parentesco?  
\_\_\_\_\_

2.  Não

2.15) Câncer gástrico na família? 1.  Sim; Qual o parentesco?

1.1  Irmão (ã); 1.2  Tio/Tia; 1.3  Pai; 1.4  Mãe; 1.5  Avô/Avó; 1.6  Filho(a); 1.7  Pai e Mãe Qual a idade de aparecimento do Câncer? \_\_\_\_\_

2.  Não

2.16) Câncer na família em outros sítios? 1.  Sim; Local \_\_\_\_\_

2.  Não

2.17) Uso freqüente de AINES (Anti-inflamatórios Não-Esteroidais)?

1.  Sim. Qual? \_\_\_\_\_ 2.  Não

2.18) Em uso atual (Últimos 30 dias)? 1.  Sim 2.  Não

2.19) Fumante (atual) 1.  Sim Idade de início: \_\_\_\_\_ Quantos maços/dia: \_\_\_\_\_

O que fuma? \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ Se parou, há quanto tempo? \_\_\_\_\_

2.20) Etilista? 1.  Sim 2.  Não Idade de início: \_\_\_\_\_ Quantidade: \_\_\_\_\_

O que bebe? \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ Se parou, há quanto tempo? \_\_\_\_\_

2.21) Uso freqüente de antibióticos? 1.  Sim 2.  Não

2.22) Em uso atual (Últimos 30 dias)? 1.  Sim Qual \_\_\_\_\_ 2.  Não

2.23) Uso freqüente de anti-secretores? 1.  Sim Qual: \_\_\_\_\_ 2.  Não

2.24) Em uso atual (Últimos 30 dias)? 1.  Sim Qual: \_\_\_\_\_ 2.  Não

### 3.CONDIÇÕES PSICO-SOCIAIS

3.1 Tipo de moradia: 1.  Alvenaria; 2.  Taipa; 3.  Madeira; 4.  Papelão; 5.  Outro

3.2 Quantos cômodos? \_\_\_\_\_ 3.3 Quantas pessoas residem? \_\_\_\_\_

3.4 Possui rede de esgoto? 1.  Sim 2.  Não

3.5 Possui água encanada? 1.  Sim 2.  Não

3.6 Possui banheiro na casa? 1.  Sim 2.  Não

3.7 Tipo de ingestão da água? 1.  Sem tratamento 2.  Filtrada 3.  Fervida  
4.  Ozonizada 5.  Mineral 6.  Outros\_

3.8 Formação escolar: 1.  Analfabeto 2.  Semi-analfabeto 3.  1º grau incompleto

4.  1º completo 5.  2º incompleto 6.  2º completo 7.  3º incompleto 8.  Nível Superior

3.9 Estado civil: 1.  Solteiro 2.  Casado 3.  Divorciado 4.  Outros \_\_\_\_\_

3.10 Profissão:

---

3.11 Renda mensal 1.  < 1SM 2.  1SM a 2 SM 3.  2SM a 3SM

4.  3SM a 5SM 5.  > 5 SM

### 4.HÁBITOS ALIMENTARES

4.1 Ingesta frequente de defumados? 1.  Sim Freqüência: \_\_\_\_\_  
2.  Não

4.2 Ingesta frequente de carnes secas/salgadas? 1.  Sim Freqüência: \_\_\_\_\_  
2.  Não

4.3 Ingesta frequente de farináceos? 1.  Sim Freqüência: \_\_\_\_\_ 2.  
 Não

4.4 Ingesta frequente de verduras/frutas cítricas? 1.  Sim Freqüência: \_\_\_\_\_  
2.  Não

4.5 Forma de armazenamento/estocagem dos alimentos?  
\_\_\_\_\_

4.5.1 Geladeira/Freezer: 1.  Sim Uso habitual? \_\_\_\_\_ 2.  Não

4.5.2 “Salga” e “Seca” as carnes 1.  Sim Freqüência: \_\_\_\_\_ 2.  Não

4.5.3 Outros: 1.  Sim Qual? \_\_\_\_\_ 2.  Não

**5. CASO INDEX:** 5.1 Data do Diagnóstico: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

5.2 Evolução  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

5.3: Data do último acompanhamento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

OBS: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

5.4: Número de irmãos na família: \_\_\_\_\_ 5.5: Posição na  
família: \_\_\_\_\_

## 6. CIRURGIA, ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E ACOMPANHAMENTO

6.1 Data da cirurgia: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 6.2 Idade na cirurgia: \_\_\_\_\_

6.3 Sobrevida no pós-operatório (meses) \_\_\_\_\_

6.4 Data da última consulta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

6.5 Gastrectomia: 1.  Curativa 2.  Paliativa / 1.  Total 2.  Subtotal

6.6 Outras: \_\_\_\_\_

6.7 Invasão da parede gástrica: 1.  Até a mucosa 2.  Até a submucosa 3.   
Até a muscular 4.  Até a serosa

- 6.8 Metástase para linfonodo regional: 1.  Sim Quantos? \_\_\_\_\_ 2.  Não
- 6.9 Metástase à distância: 1.  Sim \_\_\_\_\_ 2.  Não
- 6.10 Tipo histopatológico: \_\_\_\_\_ 6.11 T \_\_\_\_\_ N \_\_\_\_\_ M \_\_\_\_\_
- 6.12 Tipo de Lauren: 1.  Difuso 2.  Intestinal 3.  Misto
- 6.13 Bohrmann: \_\_\_\_\_
- 6.14 Diferenciação: 1.  Bem diferenciado 2.  Moderadamente 3.  Pouco  
4.  Indiferenciado
- 6.15 Invasão de vasos sanguíneos: 1.  Sim 2.  Não
- 6.16 Invasão de órgãos adjacentes: 1.  Sim Qual (is) \_\_\_\_\_ 2.  Não
- 6.17 Invasão peritoneal: 1.  Sim 2.  Não
- 6.18 Recidiva: 1.  Sim 2.

## ANEXO -A

<p>HUWC/UFC          Comitê de Ética em Pesquisa          Cód. CEP - 023.04.12</p>
--



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
 Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430-370 – Fortaleza-CE  
 FONE: (85) 3366-8589 / 3366.8613 E-MAIL: [cephuwc@huwc.ufc.br](mailto:cephuwc@huwc.ufc.br)

Protocolo nº: 023.04.12

Pesquisador Responsável: Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

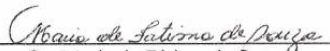
Departamento / Serviço:

Título do Projeto: "Avaliação do papel das proteínas Hom A/Hom B do *H.pylori* e do estresse oxidativo em pacientes com câncer gástrico e seus familiares".

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou o projeto de pesquisa supracitado e, em tendo sido atendidas as pendências, baseando-se nas normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05), resolveu classificá-lo como: **APROVADO**.

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista: 02/10/13).

Fortaleza, 02 de outubro de 2012.

  
 Dr. Maria de Fátima de Souza  
 Coordenadora do CEP - HUWC