



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Médico
Cirúrgicas

MARIA HELANE ROCHA BATISTA GONÇALVES

ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS MARCADORES *cagT*, *LEC* e *oipA*
FUNCIONAL E NÃO FUNCIONAL DO *Helicobacter pylori* EM AFECÇÕES
GÁSTRICAS

FORTALEZA

2015

MARIA HELANE ROCHA BATISTA GONÇALVES

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS MARCADORES *cagT*, *LEC* e *oipA*
FUNCIONAL E NÃO FUNCIONAL DO *Helicobacter pylori* EM AFECÇÕES
GÁSTRICAS**

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

Orientadora:

Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B337a Batista Gonçalves, Maria Helane Rocha.

ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS MARCADORES *cagT*, *LEC* e *oipA* FUNCIONAL E NÃO
FUNCIONAL DO *Helicobacter pylori* EM AFECÇÕES GÁSTRICAS / Maria Helane Rocha Batista
Gonçalves. – 2015.

64 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, 0, Fortaleza, 2015.

Orientação: Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo .

1. *Helicobacter pylori*. 2. Afecções gástricas. 3. Marcadores genéticos. I. Título.
CDD

MARIA HELANE ROCHA BATISTA GONÇALVES

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS MARCADORES *cagT*, *LEC* e *oipA*
FUNCIONAL E NÃO FUNCIONAL DO *Helicobacter pylori* EM AFECÇÕES
GÁSTRICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia 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

Prof. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Cícero Igor Simões Moura Silva
Faculdades INTA

Profa. Dra. Regina Fátima Gonçalves Feitosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Orleânicio Gomes Ripardo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Marta Maria das Chagas Medeiros
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*Agradeço a Deus por mais uma conquista em minha vida.
À Maria Eduarda, minha filha, meu amor, minha vida.
Ao meu marido Pedro Ivo meu companheiro e meu apoio em todos os momentos.
A minha mãe(in memoriam),mesmo não estando neste plano, com certeza está
orgulhosa por essa conquista.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. LÚCIA LIBANEZ BESSA CAMPELO, Professora titular do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, pela orientação, seu empenho, competência e dedicação.

Ao Prof. Dr. LUSMAR VERAS, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará (UFC), por sua admirável doação à Pós-Graduação.

À Profa. Dra. DULCIENE MARIA MAGALHÃES QUEIROZ pela solicitude em receber nossas amostras para realização da técnica molecular de sequenciamento do DNA e pelo apoio e estímulo ao nosso grupo de pesquisa.

À Profa. Dra. REGINA FÁTIMA GONÇALVES FEITOSA Professora da Universidade Federal do Ceará, pela presteza em avaliar este estudo e contribuir para o seu aperfeiçoamento.

À Profa. Dra. MARTA MARIA DAS CHAGAS MEDEIROS Professora da Universidade Federal do Ceará, pela gentileza em avaliar e contribuir para o aperfeiçoamento desse trabalho.

Ao Dr. CÍCERO IGOR SIMÕES MOURO SILVA, pela amizade, parceria no laboratório e auxílio indispensável para a conclusão desse estudo.

Ao Dr. ORLEANCIO GOMES RIPARDO, pela disponibilidade em contribuir para o aperfeiçoamento desse estudo.

Ao Sr. EDERSON LAURINDO, farmacêutico, mestrando do Departamento de Cirurgia, pelo apoio e parceria no laboratório.

À Srta. KASSIANE CRISTINE DA SILVA COSTA MAIA, farmacêutica, mestre em ciências médico cirúrgicas, pela parceria no laboratório.

Às Sras. MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA MARIA GOMES FONTENELE, secretárias do Programa de Pós-graduação do Departamento de Cirurgia da UFC, pelo carinho dispensado e amizade construída.

Ao Dr. FRANCISCO JULIMAR MENEZES, pelo apoio e incentivo, em todos os momentos.

À minha família pelo apoio, incentivo e amor incondicional.

A todos e todas que, de alguma forma, participaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

“Existe apenas um bem, o saber, e apenas um mal, a ignorância”.

Sócrates

RESUMO

ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS MARCADORES *cagT*, *LEC* e *oipA* FUNCIONAL E NÃO FUNCIONAL DO *HELICOBACTER PYLORI* EM AFECÇÕES GÁSTRICAS. MARIA HELANE ROCHA BATISTA GONÇALVES.

Tese de Doutorado Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Universidade Federal do Ceará. Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo.

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria que coloniza a mucosa gástrica de seres humanos. A infecção crônica causada por este patógeno está fortemente associada a um risco aumentado de doenças gástricas diferentes, variando de gastrite crônica e úlcera péptica para dois tipos de câncer gástrico, adenocarcinoma e linfoma do tecido linfóide associado à mucosa. O objetivo do presente estudo foi avaliar a associação dos marcadores *cagT*, *LEC* e *oipA* funcional e não funcional em pacientes portadores das afecções gastrite, úlcera e câncer gástrico. Foi realizada a genotipagem das cepas por meio da técnica de PCR. Foram avaliados 181 pacientes, atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídio, sendo 87(48,1%) homens, 94(51,9%) mulheres, com idade variando de 18-90 anos, com média de $53 \pm 17,8$ anos, com diagnóstico positivo para a infecção por *H. pylori*. Destes, 48 portadores de câncer gástrico, 69 pacientes com úlcera péptica e 64 com gastrite. A prevalência dos genótipos estudados foi: 145/181 (80,1%) *cagT*, 83/181 (45,9%) *LEC*, 81/181 (44,7%) *oipA*, e *oipA* "on" 34/81 (41,9%). No grupo dos pacientes com câncer gástrico observou-se que o genótipo mais frequente foi o *cagT* 43/48 (89,6%), seguido do gene *oipA* "on" 10/18 (55,6%) e *LEC* 17/48 (35,4%). No grupo dos pacientes com úlcera péptica o genótipo mais frequente foi o *cagT* 62/69 (89,8%), seguido do gene *LEC*; 34/69 (49,3%) e *oipA* "on" 13/31 (41,9%). No grupo dos pacientes com gastrite o genótipo mais frequente foi *cagT* 40/64 (62,5%), seguido do gene *LEC* 32/64 (50,0%) e *oipA* "on" 11/32 (34,4%). Não houve associação significativa dos genótipos do *H. pylori* com gênero, nem com faixa etária dos pacientes. O estudo genético dos marcadores de *H. pylori* e sua relação com as afecções gástricas é fundamental para se estabelecer o perfil de virulência das cepas e assim elucidar os variáveis desfechos clínicos envolvidos com essa infecção.

Palavras chave: *H. pylori*. Ilha de patogenicidade *cagPAI*. Marcadores de virulência. Afecções gástricas.

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF MARKERS *caT*, *LEC* and *oipA* FUNCTIONAL AND NON FUNCTIONAL OF *HELICOBACTER PYLORI* IN GASTRIC DISORDERS. MARIA HELANE ROCHA BATISTA Gonçalves. The Doctoral Thesis Postgraduate Program Stricto Sensu in Surgery. Federal University of Ceará. Advisor: Prof. Dr. Lúcia Libanez Bessa Campelo.

The *Helicobacter pylori* is a bacterium that colonizes the gastric mucosa of human beings. The chronic infection caused by this pathogen is strongly associated with an increased risk for gastric illnesses different, ranging from chronic gastritis and peptic ulcer for two types of gastric cancer, adenocarcinoma and lymphoma of the lymphoid tissue associated to mucosa. The aim of this study was to evaluate the association of *cagT* markers, *LEC*, functional and nonfunctional *oipA* in patients with disorders of gastritis, ulcers and stomach cancer. Genotyping of the strains was performed by PCR. Were evaluated 181 patients attended at the University Hospital Walter Cantídio, 87 (48.1%) men, 94 (51.9%) women, with ages ranging from 18-90 years, mean age of 53 + 17.8 years, with a positive diagnosis for *H. pylori* infection, these 48 carriers of gastric cancer, 69 patients with peptic ulcer and 64 with gastritis. The prevalence of the genotypes studied was: 145/181 (80.1%) *cagT*, 83/181 (45.9%) *LEC* 81/181 (44.7%) *oipA* and *oipA*"on"34/81. In the group of patients with gastric cancer was observed that the most frequent genotype was the *cagT* 43/48 (89,5%), followed by the *oipA* gene "on" 10/18 (55.6%) and *LEC* 17/48 (35.4%). In the group of patients with peptic ulcer genotype was the most frequent *cagT* 62/69 (89.8%), followed by gene *LEC*, 34/69 (49.3%) and the *oipA*"on" 13/31 (41.9%). In the group of patients with the most frequent genotype gastritis was *cagT* 40/64 (62.5%), followed by gene *LEC* 32/64 (50.0%) and the *oipA* "on" 11/32 (34.4%). Furthermore, by the presented data there is no association of *H. pylori* and gender and or age of the patients. The genetic study of the markers of *H. pylori* infection and its relationship with the gastric disorders is essential to establish the profile of virulence of strains and thus elucidate the clinical outcomes variables involved with this infection.

Key words: *H. pylori*. The island of cross *cag* PAI. Virulence markers. Gastric disorders.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

cagA – gene associado à citotoxina A do *Helicobacter pylori*

CagA – citotoxina A do *Helicobacter pylori*

cagPAI- ilha de patogenicidade relacionada ao gene *cag*

cagT- gene associado à citotoxina T do *Helicobacter pylori*

LEC- gene da região esquerda da ilha de patogenicidade *cag PAI*

oipA – gene de proteínas inflamatórias do *Helicobacter pylori*

C¹³ - Carbono 13

C¹⁴ - Carbono 14

CO₂- gás carbônico

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

H. pylori - *Helicobacter pylori*

IL-8 – Interleucina-8

IL-1β – Interleucina-1 β

kDa- kilodaltons

MALT- tecido linfóide associado à mucosa

NF-κB- fator nuclear kappa B

OMP- outras proteínas de membrana

TNF – Fator de Necrose Tumoral

rpm – rotações por minuto

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Invasão do <i>Helicobacter pylori</i> à mucosa epitelial gástrica	19
FIGURA 2: Mapa de coleta das biópsia gástricas	29
FIGURA 3: Distribuição dos pacientes quanto ao gênero.....	35
FIGURA 5: Gel de agarose a 2% para visualização das bandas do gene <i>cagT</i> de pacientes com gastrite.....	39
FIGURA 6: Gel de agarose a 2% para visualização das bandas do gene <i>cagT</i> de pacientes com câncer.....	40
FIGURA 7: Gel de agarose a 2% para visualização das bandas do gene <i>cagT</i> de pacientes com úlcera.....	40
FIGURA 8: Gel de agarose a 2% para visualização das bandas do gene <i>LEC</i> de pacientes com gastrite.....	41
FIGURA 9: Gel de agarose a 2% para visualização das bandas do .gene <i>LEC</i> de pacientes com câncer.....	41
FIGURA 10: Gel de agarose a 2% para visualização das bandas do .gene <i>LEC</i> de pacientes com úlcera.....	42
FIGURA 11: Gel de agarose a 2% para visualização das bandas do .gene <i>oipA</i> de pacientes com úlcera péptica.....	42

LISTA DE TABELAS

TABELA1: Primers usados na amplificação dos genes.....	31
TABELA2:Caracterização dos pacientes por grupos quanto ao gênero e idade.....	35
TABELA3: Associação dos genótipos com gênero e idade	36
TABELA4:Associação do genótipo <i>cagT</i> com as afecções gástricas estudadas.....	37
TABELA5:Associação do genótipo <i>LEC</i> com as afecções gástricas estudadas.....	37
TABELA6: Variáveis associadas com o genótipo <i>oipA</i> do <i>H. pylori</i>	38
TABELA7:Prevalência do gene <i>oipA</i> funcional e não funcional nas afecções estudadas.....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Histórico do <i>Helicobacter pylori</i>	14
1.2 Microbiologia do <i>Helicobacter pylori</i>	15
1.3 Epidemiologia do <i>Helicobacter pylori</i>	16
1.4 Patogenicidade do <i>Helicobacter pylori</i>	18
1.5 Genética do <i>Helicobacter pylori</i>	20
1.5.1 Genes <i>cagT</i> e <i>LEC</i>	20
1.5.2 Gene <i>oipA</i>	21
1.6 Relação da infecção pelo <i>Helicobacter pylori</i> e afecções gástricas....	22
1.7 Diagnóstico do <i>Helicobacter pylori</i>	23
1.7.1 Métodos invasivos.....	23
1.7.2 Métodos não invasivos	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. MÉTODO	28
3.1 Casuística	28
3.2. Tipo de Estudo	28
3.3 Seleção dos pacientes	28
3.4 Procedimento	28
3.4.1 Coleta de fragmentos da mucosa gástrica	28
3.4.2 Extração do DNA de <i>H. pylori</i> em tecido de biópsia gástrica...	30
3.4.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	31
3.4.4 Amplificação do gene <i>oipA</i> do <i>Helicobacter pylori</i>	32
3.4.5 Sequenciamento do gene <i>oipA</i>	32
3.5 Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Caracterização dos pacientes estudados	34
4.2. Distribuição dos genótipos com as afecções gástricas.....	36
4.3. Gene <i>oipA</i>	38

4.4. Associação do gene <i>oipA</i> funcional e não funcional com os genótipos <i>cagT</i> e <i>LEC</i> nas afecções gástricas.....	38
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
APÊNDICES	56
ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico do *Helicobacter pylori*

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria que coloniza o estômago e foi isolada pela primeira vez, pelos pesquisadores australianos Robin Warren e Barry Marshall, no ano de 1983 na Austrália, a partir de fragmentos de biópsia gástrica de pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica. Essa descoberta foi um dos avanços mais importantes da Gastroenterologia, tendo levado esses pesquisadores a receber o prêmio Nobel de Medicina em 2005 (GUZMÁN, 2006).

Desde o século passado, estudos, já apontavam micro-organismos encontrados no suco gástrico de pacientes com carcinoma ulcerado do estômago, Krienitz em 1906, foi o primeiro a observar “espiroquetas” no estômago humano (DOENGES, 1938).

Para tentar comprovar que as cepas de *H. pylori* causavam patologias na mucosa gástrica, em 1984, Marshall ingeriu um concentrado da bactéria isolada, e desenvolveu uma gastrite transitória, comprovando, assim, que o *H. pylori* coloniza o epitélio do estômago e passa a desencadear um processo inflamatório no mesmo (MARSHALL *et al.*, 1983).

A princípio, os bacilos foram classificados como pertencentes ao gênero *Campylobacter*, composto por bactérias gram negativas em forma de bastão curvado, oxidase e catalase positivas, que utilizam flagelos polares para locomoção. Dessa forma, foram primeiramente chamados de “gastric *Campylobacter like organism*”, recebendo, posteriormente, as denominações *Campylobacter pyloridis*, *Campylobacter pyloricus* e *Campylobacter pylori* (MURRAY *et al.*, 2010).

A partir de 1989, após estudos ultraestruturais e de análise da sequência de ácidos nucleicos, a bactéria recebeu a denominação *Helicobacter pylori*, diferenciando-se do gênero anteriormente chamado *Campylobacter* para o novo gênero *Helicobacter* (GOODWIN *et al.*, 1989).

A descoberta do *Helicobacter pylori* revolucionou a gastroenterologia e vem possibilitando o esclarecimento sobre várias doenças gástricas como gastrite crônica, úlcera péptica, linfoma MALT (tecido linfóide associado à mucosa) e câncer gástrico. O manejo das doenças gastrointestinais foi notoriamente alterado após a comprovação do papel da infecção por *H. pylori*.

1.2. Microbiologia do *Helicobacter pylori*

O *H. pylori* é uma bactéria Gram negativa, de forma espiralada, medindo 2,5 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de diâmetro. Coloniza a mucosa gástrica produzindo as enzimas: urease, catalase, oxidase, protease e fosfolipase, enzimas importantes para adaptação no epitélio gástrico. O *H. pylori* produz urease que converte a uréia em amônia e CO₂, neutralizando o pH gástrico tornando-o neutro no ambiente intracelular e pericelular bacteriano, proporcionando sua sobrevivência em um meio ácido (MOBLEY, 2001).

A bactéria apresenta de cinco a seis flagelos monopolares embainhados, os filamentos flagelares são protegidos da acidez gástrica por serem constituídos por uma membrana protéica e de lipopolissacárideos. Sua morfologia em espiral, associada aos flagelos, facilita sua locomoção através da camada de muco que é um dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica (EISIG *et al.*, 2002).

São bactérias não esporuladas, e podem formar corpos cocóides ou esferóides em culturas velhas (KUSTERS *et al.*, 1997). A conversão da forma espiral para a cocóide se dá diante das condições adversas: pH alcalino, alta temperatura, incubação prolongada, exposição a concentrações altas de oxigênio, tratamento com inibidor da bomba de prótons, antibióticos, óxido nítrico, etc. Acredita-se que a forma cocóide seja uma forma de resistência capaz de suportar condições ambientais adversas (COLE *et al.*, 1997).

O *H. pylori* é microaerófilo, cresce em uma atmosfera de 5 a 15% de O₂ com 5 a 10% de CO₂, contendo sangue e outros componentes que promovem o seu crescimento, como: vitamina B12 e aminoácidos (L-Glutamina, L-Cysteína). A temperatura ideal para o seu crescimento em meio de cultura é de 37 °C após 3 a 5 dias. (HOLTON *et al.*, 1999).

As culturas são identificadas com base na morfologia da colônia, coloração de Gram e provas bioquímicas positivas para urease, catalase e oxidase. As colônias formadas são circulares, convexas, translúcidas e não apresentam hemólise. (NDIP *et al.*, 2003).

1.3 Epidemiologia do *Helicobacter pylori*

Estima-se que a infecção pelo *H. pylori* afeta aproximadamente metade da população mundial em todos os continentes, é uma das mais prevalentes entre os seres humanos, sendo bem documentada a existência de uma inversa associação entre as taxas de prevalência e os níveis socioeconômicos da população (CORREA; PIAZUELO, 2008).

Existem vários fatores de risco que influenciam a transmissão da bactéria, tais como: baixa condição sócia econômica, baixa nível educacionais baixas condições de saneamento básico e fatores nutricionais. Ainda não está bem definido a via a de transmissão da bactéria., o que se pode afirmar é que a *H.pylori* só consegue alcançar a mucosa gástrica pela boca. Logo, a transmissão é feita de pessoa para pessoa, sendo a principal transmissão oral-oral ou fecal-oral; é provável que essas duas maneiras atuem simultaneamente em níveis populacionais (KODAIRA *et al.*, 2002).

É, principalmente, durante a infância que os indivíduos adquirem as cepas de *Helicobacter pylori* e passam a albergá-la até a vida adulta (MALATY *et al.*,2007). Outros estudos apontam que, a aquisição do *H. pylori* além de ocorre por transmissão intra familiar se dá também por consequência das precárias condições socioeconômicas (MORAES *et al.*,2003; QUEIROZ *et al.*, 2005).

Devido a grande maioria da aquisição da infecção ocorrer durante a infância, os estudos de prevalência mostram um crescente aumento cumulativo de adolescentes e adultos infectados por *H.pylori*. Já entre os adultos há uma menor taxa de aquisição da infecção, que é decorrente de um pequeno incremento na taxa de prevalência ao longo desta fase da vida (MALATY *et al.*, 2007).

Em consequência disso, as taxas de prevalência observadas refletem as condições de vida das populações, principalmente, a condição de vida que o indivíduo infectado tinha durante sua infância, que são considerados fatores de risco determinantes para a contaminação pelas cepas da *H. pylori* (MALATY *et al.*, 2007). Pois como já foi citado, a prevalência da infecção e as doenças associadas a ela estão relacionadas ao desenvolvimento econômico de determinada população (PEURA DAVID *et al.*, 2007).

A infecção pelo *H. pylori* em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos tem uma prevalência bastante elevada, atingindo cerca de 50% das crianças já aos cinco

anos de idade e 70% aos 10 anos de idade nos países em desenvolvimento (PARENTE *et al.*, 2006).

Estudos populacionais feitos no Brasil indicam que as taxas de prevalência da infecção pela bactéria *H. Pylori* ainda são bastante elevadas, tanto em regiões urbanas como nas áreas rurais, em crianças e também em adultos. Pesquisas realizadas nos últimos anos em áreas precárias, com condições de higiene inadequadas, nas cidades de Teresina (Piauí) e Fortaleza (Ceará) demonstraram elevadas taxas de prevalência já nos primeiros anos de vida (PARENTE *et al.*, 2006).

No Ceará estudo realizado na comunidade urbana de baixa renda Parque Universitário em Fortaleza, utilizando teste respiratório marcado com C13, em crianças e adolescentes, encontrou uma prevalência de 30% nas crianças aos 2 anos de idade, atingindo 74% de infectados aos 20 anos (RODRIGUES *et al.*, 2004).

Um estudo de coorte realizado na comunidade urbana Parque Universitário, acompanhou 133 crianças e evidenciou que a prevalência de *H. pylori* foi de 53,4% no início do estudo e de 64,7% oito anos depois. Fatores de risco associados com a infecção foi número de pessoas por residência e sexo masculino (QUEIROZ *et al.*, 2012).

Observa-se que na infância, ocorre um rápido aumento da taxa de prevalência da infecção, principalmente nos cinco primeiros anos de vida. E que a partir dos 15 anos essa prevalência passa a ser lenta. Em pessoas com 60 anos essa prevalência atinge um patamar ou entra em declínio (KODAIRA *et al.*, 2002).

A prevalência da infecção e as doenças associadas a ela estão relacionadas ao desenvolvimento econômico de um país. No Japão, a prevalência diminuiu consideravelmente, de 90% para 25%, no pós Segunda Guerra Mundial, onde o grande desenvolvimento econômico levou a melhorias na higiene e saúde da população. O mesmo aconteceu na Itália, Polônia, Estados Unidos, França e outros países ocidentais desenvolvidos. (PEURA DAVID *et al.*, 2007).

Na Europa, a prevalência de *H. pylori* permanece mais elevada em países da Europa Oriental em relação a Europa Ocidental. Um estudo realizado em hospital na Alemanha Oriental, envolvendo 2318 pacientes demonstrou uma prevalência de *H. pylori* de 44% e evidenciou ainda uma queda significativa na prevalência em indivíduos nascidos após 1980, período em que houve mudanças significativas nas condições socioeconômicas (WEX *et al.*, 2011).

Vários estudos evidenciam que a prevalência da infecção por *H. pylori* está diminuindo em adultos e crianças em países desenvolvidos e em desenvolvimento (TONKIC *et al.*, 2012). Isto é decorrente da melhora das condições de higiene e socioeconômicas da população e da conduta clínica voltada para o combate dessa bactéria.

1.4 Patogenicidade do *Helicobacter pylori*

O *H. pylori* é responsável por 95% das gastrites crônicas e em até nove vezes pelo aumento do risco de câncer (KUIPERS,1998).A degeneração da mucosa gástrica se dá pela ação das suas toxinas e mediadores inflamatórios ativados pela presença da mesma.

Os fatores de virulência do *H. pylori* permitem que ele sobreviva ao ambiente desfavorável do estômago, tais fatores são: o formato espiralado, a motilidade, as enzimas e proteínas de adaptação, a capacidade de aderir às células da mucosa e ao muco gástrico (BRUCE, 1993). Os fatores genéticos e biomoleculares do micro-organismo, também contribuem para essa sobrevivência, entre elas a presença dos genes *vacA*, *cagA* e dos sítios de fosforilação da proteína CagA (Epiya) (YAMAOKA *et al.*, 2002; ARGENT *et al.*, 2004).

Motilidade, aderência e produção de urease são os principais mecanismos patogênicos do *H. pylori*. A motilidade é fundamental para que o micro-organismo penetre na camada de muco que reveste o epitélio gástrico, protegendo-se da acidez e do peristaltismo estomacal (HAZEL *et al.*, 1986).

A capacidade de adesão à mucosa gástrica impede a eliminação da bactéria através dos movimentos peristálticos, além de promover elevadas concentrações de toxinas em determinadas áreas da mucosa gástrica e assim iniciando o processo inflamatório. (BRUCE, 1993).

Uma adesina importante de peso molecular de 78 kDa, presente na membrana externa do *H. pylori*, que reconhece o antígeno B de Lewis da célula epitelial gástrica e liga-se a ele, foi identificada e chamada Adesina ligante ao antígeno B de Lewis ou BabA (ILVER *et al.*, 1998).

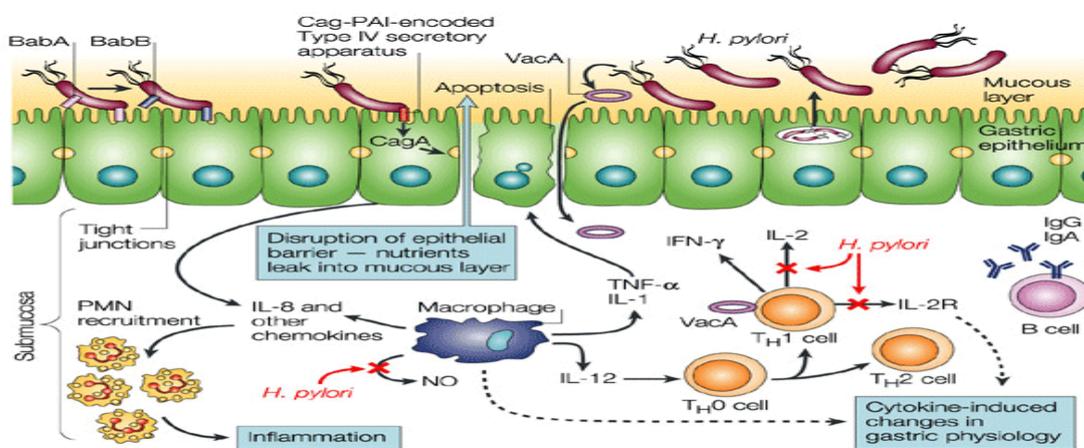
Estudos mostraram também que essa adesão irreversível resulta em intensa inflamação crônica e consequente desenvolvimento de doenças gástricas (FALK *et al.*, 1995; GURUGE *et al.*, 1998).A produção elevada de urease, enzima que converte a uréia em

amônia promove a desestabilização da camada de muco, provocando lesões sobre o revestimento do epitélio (HAZEL *et al.*, 1986).

Após penetrar na camada de muco e entrar em contato com as células epiteliais do estômago, o *H. pylori* multiplica-se e prolifera-se, em seguida, libera agentes quimiotáticos, que induzem a migração de polimorfonucleares para o epitélio. As proteínas bacterianas ativam os mastócitos, liberando ativadores inflamatórios. O *H. pylori* estimula o epitélio gástrico a produzir IL-8, que tem sua produção potencializada pelo TNF- α , pela interelucina-1 (IL-1) e pelo fator nuclear Kappa B (NF- κ B), liberados pelos macrófagos em resposta à parede lipopolissacarídica da bactéria (CRABTREE *et al.*, 1991, 1994; MOBLEY, 2001).

O *H. pylori* invade, inicialmente, o antro gástrico e, depois multiplica-se para colonizar as outras áreas do estômago. A maior parte dos achados endoscópicos nos casos de gastrite em infectados pelo *H. pylori* é de tipo antral (SUERBAUM, MICHETTI, 2002). Podemos enfatizar que a presença de cepas de *H. pylori* de maior virulência, induzem uma maior resposta inflamatória e a instalação da gastrite.

A figura (1) abaixo demonstra a invasão do *Helicobacter pylori* à mucosa epitelial gástrica



1.5 Genética do *Helicobacter pylori*

O *H. pylori* apresenta-se geneticamente diverso, havendo diferenças geográficas entre as cepas e vários fatores de virulência têm sido atribuídos às cepas mais virulentas (COVACCI *et al.*, 1999).

Evidências indicam que cepas do *H. pylori* apresentam diversos genótipos, e que estes ativam o processo inflamatório por meio de mediadores e citocinas, resultando em diversos graus de resposta inflamatória do hospedeiro, como também, diferentes desfechos patológicos (FOX, 2002).

A ilha de patogenicidade *cag* (*cag*-PAI) possui cepas que induzem a resposta inflamatória mais grave, elevando o risco para desenvolvimento de úlcera péptica e câncer gástrico. O estresse oxidativo induzido pela inflamação desempenha importante papel na carcinogênese gástrica, ocasionando danos no DNA, bem como alterações celulares e apoptose (ISRAEL *et al.*, 2001).

Os fatores de virulência do *H. pylori* devem estabelecer correlação com as afecções ou outros marcadores de virulência, ter consistência epidemiológica com a população e a região estudada e ter efeito biológico contundente para redução ou eliminação da expressão gênica pela extinção do genótipo ou reativação do mesmo. (LU *et al.* 2005).

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, evidenciaram uma elevada prevalência de cepas *vacA* s1, que são altamente patogênicas, apresentou-se em crianças assintomáticas de uma comunidade urbana de Fortaleza (81,8%) e em pacientes portadores de câncer gástrico (83,3%), demonstrando o alto potencial patogênico das cepas de *H. pylori* circulantes nessa região (CAVALCANTE *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2013).

1.5.1 Genes *cagT* e *LEC*

Segundo Mattar *et al.*, 2007, a ilha *cag*-PAI pode ser dividida em duas regiões, *cag* I e *cag* II, onde o gene *cagT* foi definido como sendo um marcador da região de *cag*II e pode estar correlacionado com os desfechos clínicos mais graves pelo fato da proteína CagT, ativar o sistema de secreção de IV e desencadear o processo inflamatório.

O gene *LEC* está localizado na região esquerda da ilha de patogenicidade *cag*PAI, é considerado um marcador para identificar pacientes com úlcera péptica (MATTAR *et al.*, 2007).

Existem poucos estudos na literatura a nível mundial e, principalmente nacional e regional sobre os genes em questão. Essa região do DNA do *Helicobacter Pylori*, ainda é pouco conhecida.

1.5.2 Gene oip A

O gene OIP faz parte do sítio de Outras Proteínas de Membrana (OMP) do *H. pylori*, está localizado aproximadamente a 100Kb da cag-PAI e codifica a proteína OipA (Outras proteínas Inflamatórias) e está relacionado com o processo inflamatório (YAMAOKA *et al.*, 2000; 2002; ODENBREIT *et al.*, 2009).

O gene oipA nem sempre é funcional. Quando funcional, o gene expressa a proteína OMP que está associada à indução da IL-8 na mucosa gástrica, à infiltração de neutrófilos funcionando também como uma adesina (KUSTERS *et al.*, 1997).

Seu estado funcional é determinado através do sequenciamento genético, e está baseado no número de repetições da combinação dos nucleotídeos Citosina e Timina no locus gênico, conhecido como dinucleotídeo CT, que indicará se o gene está ativado (oipA “on”) ou inativo (oipA “off”). (SILVA, 2009). Ainda existem poucos estudos que sequenciamento genético do gene oipA.

O gene funcional (*on*) ou não funcional (*off*), é regulado por um mecanismo de reparo genômico de acordo com o número de dinucleotídeos CT. O oipA funcional apresenta 6 e 9 repetições CT e o oipA não funcional apresenta 5 e 7 repetições CT. (YAMAOKA *et al.*, 2000).

Um estudo realizado nos EUA e Colômbia, com diferentes desfechos clínicos, em 247 pacientes, avaliou a relação da expressão ou presença de múltiplos fatores de virulência (oipA, cag PAI, vacA, iceA e babA) e mostrou que o gene oipA funcional, os genótipos cag PAI-positivo, vacA s1 e babA foram todos relacionados ao risco de úlcera duodenal, e que oipA funcional, isoladamente, é um preditor determinante do desenvolvimento de úlcera duodenal a partir da inflamação gástrica (YAMAOKA *et al.*, 2002).

Tal achado foi confirmado em outro estudo, que utilizou uma coorte de 200 pacientes randomizados, que tiveram sua resposta imunológica à infecção por *H. pylori* analisada por immunoblot, para quatro proteínas da membrana exterior: OipA, BabA, BabB e SabA (YAMAOKA *et al.*, 2006).

Como também, um estudo *in vitro* mostrou que cepas mutantes de *H. pylori* com gene *oipA* silenciado não induziram inflamação da mucosa gástrica em ratos que foram infectadas durante 12 semanas, ao passo que as cepas com o gene funcional induziram inflamação da mucosa (YAMAOKA *et al.*, 2002).

Torna-se relevante, portanto, o conhecimento sobre a importância biológica desses fatores de virulência, tendo em vista que eles interagem de forma sinérgica entre si e induzem os mecanismos de desenvolvimento das principais afecções gástricas.

1.6 Relação da infecção pelo *H. pylori* e afecções gástricas

Atualmente o *Helicobacter pylori* é considerado de alto risco para o desenvolvimento de doenças gastrointestinais como gastrite, úlcera péptica e duodenal e câncer gástrico (SATO *et al.*, 2011). Também pode estar associado a manifestações extra gástricas como distúrbios cardiovasculares, neurológicos, metabólicos, doenças de pele e hematológicas como a anemia por deficiência de ferro e púrpura trombocitopênica idiopática (HASNI *et al.*, 2011; KANDULSKI *et al.*, 2008).

A infecção pelo *Helicobacter pylori* induz à inflamação da mucosa gástrica, ocasionando em gastrite crônica não atrófica, progredindo para gastrite atrófica, metaplasia intestinal, e conseqüentemente a displasia e carcinoma gástrico. o desenvolvimento e as conseqüências destas lesões dependem de fatores de virulência da bactéria e da resposta imune do hospedeiro. (SAMPAIO, A, *et al.*, 2008). O estilo de vida e a dieta, tabagismo influencia diretamente no surgimento de lesões gástricas em pacientes infectados pelo *Helicobacter pylori*. Variáveis tais como o tabagismo e etilismo, consumo excessivo de café e condimentos contribuem para o elevado risco do desenvolvimento de úlcera péptica (HORA, J. 2008).

A úlcera péptica é uma patologia heterogênea multifatorial de curso crônico, ocorrendo em 5 a 10% da população mundial, é classificada em gástrica ou duodenal, de acordo com a sua localização nas porções superior ou inferior do estômago. O desenvolvimento da úlcera péptica está associado, a elevada produção ácida, como resultado da infecção pelo *H. pylori*. (CARVALHO, 2000).

A bactéria possui forte relação com a fisiopatologia da doença ulcerosa péptica, estando presente em mais de 90% de pacientes com úlceras gástricas ou duodenais.

Destaca-se que a úlcera péptica por ser considerada a lesão precursora do câncer gástrico.(HORA, J, 2008).

O desenvolvimento do câncer gástrico é um processo multifatorial que se dá pela combinação de fatores hormonais, dietéticos, ambientais e de estilo de vida do indivíduo. O mecanismo atualmente aceito para a carcinogênese gástrica aponta a infecção pelo *H. pylori* como fator preponderante para o aparecimento da metaplasia gástrica e indução neoplásica, pelo desencadeamento de uma intensa e não remissível resposta imune à infecção (SILVA, 2009).

Dados do INCA (2015) demonstram que no Brasil, que o câncer gástrico é o terceiro lugar na incidência entre homens e em quinto, entre as mulheres. No resto do mundo, dados estatísticos revelam declínio da incidência, especificamente nos Estados Unidos, Inglaterra e outros países mais desenvolvidos. O pico de incidência se dá em sua maioria em homens, por volta dos 70 anos. Cerca de 65% dos pacientes diagnosticados com câncer de estômago têm mais de 50 anos. (INCA, 2015).

A alta mortalidade é registrada atualmente na América Latina, principalmente na Costa Rica, Chile e Colômbia. Porém, o maior número de casos ocorre no Japão, onde são encontrados 780 doentes por 100.000 habitantes. Estima-se, que em 2016, surgirão 20.520 novos casos sendo 12.920 em homens e 7.600 em mulheres (INCA, 2015).

1.7 Diagnóstico do *Helicobacter pylori*

O *H.pylori* pode ser diagnosticado através de vários métodos que são classificados em métodos invasivos, os quais utilizam endoscopia digestiva alta para coleta de fragmentos da mucosa gástrica e os não invasivos tais quais sorologia e teste respiratório da uréase, e antígeno ou PCR nas fezes. Testes não invasivos são de fácil realização, porém, necessitam de equipamento adequado e validação dos métodos em cada região, população e idade (ANDREIAS; PHILIPPE; MEGRUAD, 2015).

1.7.1 Métodos invasivos

O exame endoscópico permite obter-se fragmentos da mucosa gástrica para realização de testes que identificam *H.pylori* tais quais teste da urease, exame histopatológico, cultura e biologia molecular.

O teste da urease é um método simples, que fornece resultado dentro de poucas horas ou até mesmo minutos, consiste em colocar fragmento de biópsia em tubo contendo meio em um meio contendo ureia. Baseia-se na capacidade do *H. pylori* produzir a enzima urease que, presente na amostra do tecido, desdobra a uréia, produzindo amônia e bicarbonato. A amônia eleva o pH do meio com mudança na cor de amarelo para vermelho, indicando resultado positivo (MARSHALL *et al.*, 1987).

A realização de biópsia da mucosa gástrica permite o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* em esfregaços e cortes histológicos fixados e corados nas preparações em lâminas. São utilizadas diversas técnicas de coloração para detecção do *H. pylori*: Gram, Gimenez, Hematoxilina & Eosina, Giemsa modificado ou não, Laranja acridine e Carbolfucsina, como também a coloração pela prata (Warthin Starry). Porém com a vasta distribuição do *H. pylori* no estômago, todos os testes baseados em biópsias podem apresentar falhas no diagnóstico. Para minimizar e/ou tentar eliminar este risco, diversas amostras do corpo e antro devem ser pesquisadas (VAN ZWET *et al.*, 1996).

A cultura é considerada um método bastante específico para estabelecer o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*, além de, permitir avaliar a sensibilidade da bactéria a agentes usados no tratamento, fator primordial para a prática clínica (VAN ZWET *et al.*, 1996). No entanto, é uma técnica diagnóstica de alto custo e requer um laboratório especializado (TONELLI *et al.*, 2000).

O PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é um método que detecta sequências específicas de ácidos nucleicos da bactéria, através da utilização de oligonucleotídeos sintéticos, que agem como “primers” para a replicação enzimática das sequências de DNA definidas (CLAYTON *et al.*, 1992). O PCR apresenta elevada sensibilidade e especificidade, podendo ser realizado diretamente das biópsias gástrica ou duodenal, do suco gástrico, da placa dentária, da saliva, da cultura e até mesmo das fezes. É muito utilizada em estudos epidemiológico devido sua alta sensibilidade (LEHOURS *et al.*, 2003). É possível também diferenciar entre novas infecções e recidivas, pois permite comparar as cepas do micro-organismo antes e após o tratamento.

1.7.2 Métodos não invasivos

O método sorológico se baseia na presença de anticorpos anti-*h. pylori*, que está pautado na detecção de anticorpos específicos imunoglobulina G (IgG), em amostras de soro

das pessoas infectadas pela bactéria. São realizados pela técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e pelo Western Blotting. É importante lembrar que, podem ocorrer resultados falsos negativos em crianças, idosos e em pessoas imunodeprimidas, por estas não desenvolverem reação imunológica contra a infecção (PORTORREAL *et al.*, 2002).

Já o teste respiratório, utiliza o isótopo estável, não radioativo (C13), ou o isótopo pouco radioativo (radioatividade equivalente à do meio ambiente) (C14), como marcadores da uréia (GRAHAM *et al.*, 1991). O paciente ingere uma solução de uréia marcada com o carbono, geralmente é o C13. A uréia é convertida em amônia e bicarbonato, em seguida é absorvido e convertido em CO₂ nos pulmões (TONELLI *et al.*, 2000). Portanto o teste baseia-se na atividade de produção de urease pelo *H. pylori* utilizando um espectômetro de massa (se usa no C13) ou pelo contador de cintilação líquida (se usa no C14) (GONZÁLEZ *et al.*, 2014). O método utilizando o C13 não-radioativo, é o teste ideal para o diagnóstico da infecção em crianças por não ser invasivo. O teste respiratório foi validado para uso em crianças brasileiras com uma sensibilidade de 95,5% e especificidade de 99,0% (CARDINALI *et al.*, 2003).

Outro método para diagnóstico pode ser realizado pela pesquisa de antígenos do *H. pylori* nas fezes (HpSA). Este teste é tão eficaz quanto o teste respiratório e ainda tem a vantagem de ser mais barato, ter o resultado em aproximadamente 60 minutos e ainda 24 não requer equipamentos de alto custo e o material pode ainda ser estocado para pesquisas futuras. (GONZÁLEZ *et al.*, 2014).

Um teste pouco conhecido, porém muito acurado e minimamente invasivo é o Enteroteste que foi validado no Brasil em 2011 em Fortaleza e publicado em 2013. Este teste permite extrair suco gástrico sem a necessidade de endoscopia digestiva alta. Nesse teste o indivíduo ingere uma cápsula contendo um fio no seu interior. Após 1 hora, o fio é retirado e o suco gástrico aderido ao fio poderá ser utilizado para testes moleculares e microbiologia onde é possível detectar *H. pylori* a partir do cultivo do suco gástrico e da realização da técnica de PCR. (GONÇALVES, 2013). Os resultados encontrados com esse método variam, com sensibilidade de 75% a 100%, em países como Austrália (SAMUELS *et al.*, 2000), Brasil (GONÇALVES, 2013) e México (TORRE *et al.*, 2001) respectivamente.

É importante salientar que é recomendada a realização de pelo menos, dois métodos para um diagnóstico mais preciso da infecção pelo *H. pylori*.

1.8 Justificativa

A incidência da infecção pelo *H. pylori*, diverge nas diversas regiões do planeta devido a alta variedade genética de suas cepas, o que resulta também em diferenças na relação da infecção com as afecções gástricas. Vários estudos, foram conduzidos por nosso laboratório (Labgastro), envolvendo os genes do *H. pylori*(*ureA*, *cagA*, *cag E*, *vacA*, *babA*, *iceA* *hopA*, *hopB* e suas associações com pacientes portadores das principais afecções gástricas. Em face, a associação de genes ainda poucos estudados a nível regional, nacional e mundial e que estão envolvidos na patogênese do *H. pylori*, despertou a necessidade de investigar os genes *cagT* e *Lec*, presentes na ilha *cagPAI*, onde a mesma, está relacionada ao aumento da inflamação na mucosa gástrica. Além de investigar tais genes, estabelecer também uma possível relação com gene *oipA*, que promove o aumento da indução inflamatória. Esses genes mostram-se como importantes marcadores de virulência da bactéria uma vez que estão envolvidos em mecanismos moleculares que levam ao aparecimento de afecções gástricas, entre elas, câncer gástrico, úlcera péptica e gastrite. É fundamental a descoberta dos fatores envolvidos com o *H. pylori*, que resultam em desfechos clínicos mais graves e assim contribuir para a elaboração de protocolos de prevenção e tratamento.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Investigar a associação dos marcadores *cagT*, *LEC* e *oipA* funcional e não funcional do *H. pylori* em pacientes portadores das afecções gastrite, úlcera e câncer gástrico.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Determinar a prevalência dos marcadores *cagT* e *LEC*, em portadores de gastrite, úlcera e câncer gástrico.

2.2.2 Verificar a relação dos genótipos estudados com o gênero e a faixa etária dos pacientes.

2.2.3 Avaliar a prevalência do gene *oipA* funcional, em portadores de gastrite, úlcera e câncer gástrico.

2.2.4 Averiguar a associação entre os genes *oipA* funcional *cagT* e *LEC* com as afecções estudadas.

3 MÉTODO

3.1. Casuística

Participaram do estudo pacientes dispépticos, atendidos no ambulatório de Gastroenterologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC. Foram selecionados 181 pacientes, infectados por *H. pylori*, sendo 48 portadores de câncer gástrico, diagnosticado por meio de cirurgia e confirmado por histopatológico, 69 portadores de úlcera péptica e 64 portadores de gastrite, submetidos à endoscopia digestiva alta, entre janeiro de 2009 e setembro de 2013, que aceitaram participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram aplicados questionários avaliando dados demográficos, clínicos e epidemiológicos (Apêndice B, D). Porém foram utilizadas somente as variáveis que tivessem maior significância para o presente estudo, uma vez que, o perfil sócio econômico destes pacientes são semelhantes por serem provenientes do Sistema único de Saúde (SUS).

O estudo foi submetido à análise e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEPE- do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, (Anexo B).

3.2. Tipo de Estudo

Estudo, descritivo e transversal

3.3. Seleção dos Participantes

Foram critérios de inclusão:

-Pacientes *H. pylori* positivo, pelo teste da Urease, realizado pelo tecido gástrico colhido na endoscopia digestiva

-Participantes ou, responsável legal, que assinaram o termo de consentimento informado.

-Idade mínima de 18 anos e máxima de 90 anos de ambos os sexos.

-Pacientes portadores de úlcera péptica, gastrite e câncer gástrico.

Foram critérios de exclusão:

-Indivíduos portadores de doenças prévias, tais como, Insuficiência Renal,

-Insuficiência Hepática e Insuficiência Cardíaca Congestiva.

3.4. Procedimento

3.4.1 Coleta de fragmentos da mucosa gástrica

Foram colhidos fragmentos da mucosa gástrica durante endoscopia digestiva alta de cinco sítios diferentes do estômago, de acordo com o recomendado pelo Sistema de classificação de gastrite de Sydney (DIXON *et al.*, 1996). Dois fragmentos da mucosa antral foram destinados para o teste da urease e para investigar a presença de genes de *H. pylori*. A positividade da infecção foi confirmada por resultado positivo em pelo menos dois testes, incluindo a análise histológica da urease e a presença de gene ureA de *H. pylori*.

A coleta dos fragmentos obedeceu ao protocolo validado do Sistema de Sydney (DIXON *et al.*, 1996), os locais da coleta dos espécimes foram os seguintes: (IA): 2 fragmentos da Incisura Angularis; (A1): 2 fragmentos da pequena curvatura do antro; (A2): 2 fragmentos da grande curvatura do antro; (B1) : 2 fragmentos da pequena curvatura do corpo; (B2): 2 fragmentos da grande curvatura do corpo gástrico. Obtendo-se 10 fragmentos em frascos separados com as seguintes especificações a depender do local da coleta: IA, A1, A2, B1, B2 . A figura 2 abaixo representa o mapa de coleta das biópsias gástricas.

Um fragmento extra foi colhido para a realização do teste da urease, utilizando o URETESTE[®] (Renylab Minas Gerais). Nele, o fragmento da região antral é imerso em um tubo contendo uma solução de ureia e indicador de pH. A análise foi efetuada imediatamente após a coleta do material e uma leitura final foi realizada vinte e quatro horas após. O teste da urease foi considerado positivo quando houve mudança da coloração da uréia de “amarelo” para “vermelho”. Nos casos em que a solução permaneceu “amarela” por vinte e quatro horas após a coleta, o teste foi considerado negativo. Quando houve dificuldade em estabelecer a mudança de coloração, o teste foi tido como indeterminado.

O procedimento do exame endoscópico tinha duração de, aproximadamente, 20 minutos. Após na realização do mesmo, as amostras coletadas foram armazenadas, imediatamente, a 4°C para serem transportadas até o laboratório, onde eram estocadas em freezer -70°C, até o seu processamento e análise.

3.4.2 Extração do DNA de *Helicobacter pylori* em tecido de biópsia gástrica

A extração do DNA do *H. pylori* das amostras de tecido gástrico colhidas dos pacientes estudados, foi feita a partir da maceração dos fragmentos de biópsia gástrica. O material genômico foi extraído das amostras seguindo o protocolo de QIAGEN[®], com os

reagentes do QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), conforme orientação do fabricante.

A princípio foi realizada a digestão do material tecidual, onde foi colocado em tubos de 2 mL, com 180µL de tampão ATL e 20µL de Proteinase K, e submetidos a banho maria a 56°C por vinte e quatro horas.

Após a digestão, seguiu-se a lise celular, onde foram adicionados 200µL de tampão AL, e incubou-se novamente as amostras em banho-maria, a 70 °C, por dez minutos. Em seguida, adicionou-se 200µL de Etanol 100%.

O material da lise celular foi transferido para coluna Spin QIAamp[®], para filtrar o conteúdo celular, o primeiro filtrado foi centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto em tubo de microcentrífuga de 2 mL, depois foi descartado e foram adicionados 500µL de tampão AW1 (QIAGEN[®]), e foi feita eluição por centrifugação a 8.000 rpm por um minuto. Em seguida, foram colocados 500µL de tampão AW2 (QIAGEN[®]), com centrifugação a 14.000 rpm por três minutos.

Por fim, foram adicionados 200µL de tampão AE, centrifugando a 8.000 rpm por um minuto e repetindo essa última etapa para uma extração precisa do material genético. Após a extração do DNA, as amostras foram estocadas em freezer a -20°C até o seu processamento.

3.4.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

O DNA do *H. pylori* extraído das biópsias gástricas foi utilizado para a amplificação dos genótipos de interesse nesse estudo, a partir das sequências de nucleotídeos (primers) específicos, previamente descritos na literatura. A solução “*Master mix*” para amplificação do DNA, continha: 12,5µL da enzima Taq-DNA polimerase GoTaq green - Promega[®]; 1,0µL dos “primers” específicos para cada gene a ser estudado, partindo da terminação 5’ para a 3’, em ambos os sentidos (senso e antisenso). Em cada microtubo, foram acrescentados 5,0µL do DNA extraído em microtubos específicos de 200µL. As reações ocorreram separadas para cada gene. A tabela 1 indica os primers que foram utilizados para cada marcador.

Tabela 1: Primers usados na amplificação dos genótipos estudados

Primer	Sequência (5' - 3')	Pares de base	Referência
oipA - F	GTTTTTGATGCATGGGATTT	401	Kauser <i>et al.</i> , 2005
oipA - R	GTGCATCTCTTAGGCTTT		
cagT- F	CCATGTTTATACGCCTGTGT	301	Ikenoue <i>et al.</i> , 2001
cagT- R	CATCACCACACCCTTTTGAT		
LEC- F	ACATTTTGGCTAAATAAACGCTG	320–550	Akopyants <i>et al.</i> , 1998
LEC-R	TCTCCATGTTGCCATTATGCT		

Fonte: Elaborada pelo autor

A amplificação do DNA extraído foi realizada em termociclador, obedecendo ao protocolo de ciclos específicos para cada gene estudado. O protocolo de amplificação dos genes *cagT* e *LEC* correspondem: a um ciclo a 94 ° C durante 5 min, 40 ciclos de 94 ° C durante 30 seg, 55 ° C durante 30 seg e 72 ° C durante 30 seg e um ciclo de extensão final a 72 ° C durante 10 min .

Após a amplificação de cada gene, foi realizada à corrida eletroforética de géis de agarose a 2%, corado com brometo de Etídio, para visualização das bandas dos marcadores genéticos do *H. pylori*. Foi utilizado tampão Tris Acetato EDTA (TAE) como veículo líquido para a corrida dos géis. A eletroforese ocorreu nas seguintes condições: 100 volts, 400 miliampères por 40 minutos.

Os géis foram revelados em aparelho trans luminador com câmara eletrônica de ultravioleta para evidenciação dos pares de bases, estabelecendo assim, o resultado positivo ou negativo para os marcadores genéticos estudados, a partir da presença ou ausência das bandas de nucleotídeos pertencentes a esses genes.

Para monitorar possíveis contaminações, foi estabelecido o controle da qualidade, pela presença de controle positivo e controle negativo para cada marcador genético estudado. O peso molecular dos pares de base foram aferidos por padrão de bandas de DNA (DNA *Ladder*), adicionado aos géis.

3.4.4 Amplificação do gene *oipA* do *Helicobacter pylori*

A amplificação do DNA bacteriano foi realizada utilizando os iniciadores específicos para o gene *oipA*.

O protocolo de amplificação corresponde a um ciclo a 95 ° C durante 5 min, 35 ciclos de 95 ° C durante 30 seg, 58 ° C durante 30 seg e 72 ° C durante 30 s e um ciclo de extensão final a 72 ° C durante 10 min . A amostra amplificada foi visualizada depois de corrida eletroforética em um gel de agarose a 2%.

3.4.5 Sequenciamento do gene *oipA*

Os produtos de PCR foram purificados utilizando Wizard SV Gel[®] e PCR Clean-up System[®] (Promega, Madison, MI), de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados usando o kit Big Dye Terminator versão 3.1 Cycle Sequencing[®], no aparelho ABI 3130 Genetic Analyzer[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA). As sequências obtidas foram alinhadas com o Programa CAP3 de conjunto de Sequências (disponível em: <http://pbil.univlyon1.fr/cap3.php>). Após o alinhamento, as sequências de nucleotídeos foram transformadas em sequências de aminoácidos usando o programa Blastx (disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e comparado com as sequências depositadas no GenBank do *H. pylori* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) O sequenciamento foi realizado pela Professora Maria Dulciene de Queiroz em Belo Horizonte no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da Univesidade Fedral de Minas Gerais.

3.5 Análise Estatística

Foi utilizado o software SPSS for Windows, versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, Illinois. A presença dos genótipos *cagT*, *LEC* e *oipA on* e *off* foi analisada de acordo com a idade, gênero e afecção gástrica. A comparação de variáveis contínuas foi realizada pelo teste t de Student e as categorias pelo teste do qui-quadrado de Pearson. O nível de significância considerado foi $p < 0.05$. O risco foi estimado utilizando-se *Odds Ratio* (OR) e o intervalo de confiança de 95%. Modelos de regressão logística foram construídos e ajustados para potenciais fatores de confusão, tais como gênero e idade.

4 RESULTADOS

4.1. Caracterização dos pacientes estudados

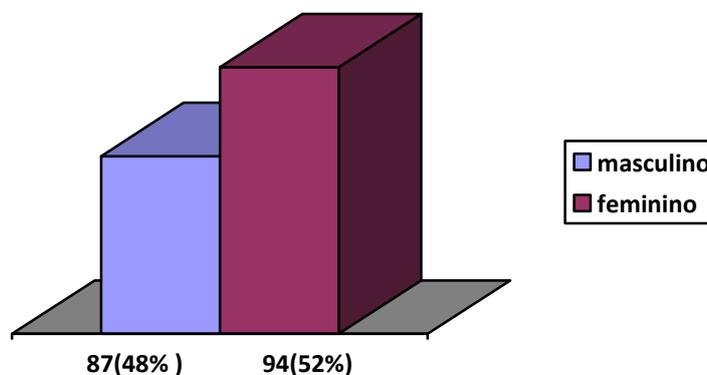
Participaram do estudo 181 pacientes infectados por *H. pylori*, que foram submetidos a endoscopia digestiva alta, no Hospital Universitário Walter Cantídeo(HUWC). Destes, 48 eram portadores de câncer gástrico, 64 portadores de gastrite e 69 portadores de úlcera péptica.

Dos 181 pacientes, 87(48,1%) eram do gênero masculino e 94(51,9%) do gênero feminino. A idade dos pacientes estudados variou de 18 a 90 anos, com média de $53 \pm 17,8$ anos. **(Figura 3)**

Dos pacientes com câncer gástrico, 29/48 (60.4%) eram do gênero masculino e 19 (39.6%) do gênero feminino. A idade variou de 35 a 84 anos, com média de $59 \pm 14,7$ anos. Houve correlação estatística significativa dessa afecção com gênero masculino ($p = 0.04$) e não houve significância com a idade ($p = 0.19$). **(Tabela 2)**

No grupo dos portadores de úlcera péptica, 33/69 (47,8%) eram homens e 36/69 (52,2%) eram mulheres. A idade variou de 20 a 88 anos, com média de $52,5 \pm 12,5$ anos. Não houve relação estatística dessa afecção com o gênero ($p = 0.96$) nem com a idade ($p = 0.20$). **(Tabela 2)**

Com relação aos portadores de gastrite: 25/64 (39.1%) eram homens e 39/64 (60.9%) eram mulheres. A idade variou de 18 a 75 anos, com média de $47,9 \pm 15,1$ anos. Não houve relação estatística dessa afecção com o gênero ($p = 0.07$) nem com a idade ($p = 0.20$). **(Tabela 2)**

Figura 3: Distribuição dos pacientes quanto ao gênero

A Tabela 2 apresenta a caracterização dos grupos dos pacientes estudados com as afecções gástricas e relação quanto ao gênero e faixa de idade. O câncer gástrico teve maior prevalência no gênero masculino, com significância estatística com valor de $p < 0,04$. A úlcera péptica, assim como a gastrite, foi mais prevalente no gênero feminino, não havendo significância estatística para ambas. A média de idade para as afecções gástricas, câncer gástrico, úlcera péptica e gastrite foram respectivamente: $59,0 \pm 14,7$, $52,5 \pm 12,5$ e $47,9 \pm 15,1$. Não houve significância estatística para as afecções gástricas e faixa de idade.

Tabela 2: Caracterização dos pacientes estudados com as afecções gástricas, quanto ao gênero e a média de idade.

	Masculino n (%)	Feminino n (%)	valor de p	Faixa de Idade (anos)	valor de p
Câncer gástrico (n= 48)	29 (60,4%)	19 (39,6%)	0,04	$59,0 \pm 14,7$	0,19
Úlcera péptica (n = 69)	33 (47,8%)	36 (52,2%)	0,96	$52,5 \pm 12,5$	0,20
Gastrite (n= 64)	25 (39,1%)	39 (60,9%)	0,07	$47,9 \pm 15,1$	0,20

4.2 Distribuição dos genótipos *cagT* e *LEC* nas amostras estudadas

De acordo com as afecções gástricas estudadas, 145/181 (80,1%) das amostras, apresentaram o gene *cagT* e 83/181(45,8%) das amostras apresentaram o gene *LEC*. Dentre as amostras dos genes *cagT* e *LEC* ,36(19,8%) destas expressaram ambos os genes.

Na tabela 3 observa-se a distribuição dos genótipos *cagT* e *LEC* de acordo com gênero e faixa etária. Dentre os pacientes com *cagT* presentes: o gênero masculino foi mais associado do que o gênero feminino, e na faixa etária que compreende os pacientes com idade maior que 45 anos. A prevalência do gene *LEC* foi maior no gênero feminino, assim como, na faixa etária acima de 45 anos. Foi escolhido esse intervalo, por ser uma etária onde as morbidades são mais prevalentes. Não houve significância estatística tanto para gênero e idade, para o gene *LEC*. No entanto, houve significância estatística da presença de cepas *cagT* no gênero masculino.

Tabela 3 : Associação dos genótipos com gênero e faixa etária em pacientes infectados por *H. pylori*

	<i>cagT</i>	valor de <i>p</i>	<i>LEC</i>	valor de <i>p</i>
masculino	76/145 (52,4%)	0,02	40/83 (48,2%)	1,00
feminino	69/145 (47,6%)	0,02	43/83 (51,8%)	1,00
< 45 anos	46/145 (31,7%)	0,22	30/83 (36,1%)	0,07
> 45 anos	99/145 (68,3%)	0,22	53/83 (63,9%)	0,07

Na tabela 4, pode-se observar a associação do genótipo *cagT* com as afecções gástricas, onde nos pacientes com câncer, 43/48(89,6%) expressaram o gene *cagT*, nos acometidos com úlcera péptica 62/69(89,8%) expressaram o gene *cagT*, nos portadores de gastrite, 40/64(62,5%) expressaram o gene *cagT* .Houve significância estatística ($p = 0.01$; O.R: 1,21; 95% I.C: 1,06 - 1,39) com relação ao gene *cagT* e os pacientes com úlcera péptica. Após regressão logística multivariada do genótipo *cagT* com as afecções gástricas, o mesmo permaneceu fortemente associado a úlcera péptica e não associado ao câncer e associado negativamente a gastrite.

Tabela 4: Associação do genótipo cagT com as afecções gástricas estudadas

Afecções	cagT (%)	Univariada			Multivariada		
		<i>p</i>	O.R	IC (95%)	<i>p</i>	O.R	IC (95%)
Câncer Gástrico	43/48 (89,6%)	0,06	2,61	0,95-7,17	0,07	2,63	0,92-7,52
Úlcera péptica	62/69 (89,8%)	0,01	1,21	1,06-1,39	0,01	3,25	1,31-8,01
Gastrite	40/64 (62,5%)	0,001	0,69	0,57-0,85	0,001	0,15	0,06-0,35

Na tabela 5, observa-se a associação do genótipo *LEC* com as afecções gástricas, onde pacientes com câncer, 17/48 (35,4%) expressaram o gene *LEC*, naqueles acometidos com úlcera péptica 34/69(49,3%) expressaram o gene *LEC* já nos portadores de gastrite, 32/64(50%) expressaram o gene *LEC*. Não houve significância estatística nas amostras estudadas.

Tabela 5: Associação do genótipo Lec com as afecções gástricas estudadas

	<i>Lec</i>	<i>p</i>
Câncer Gástrico	17/48 (35,4%)	0,09
Úlcera péptica	34/69 (49,3%)	0,54
Gastrite	32/64 (50,0%)	0,44

4.3 Gene *oipA*

Das 181 amostras estudadas, 81 destas expressaram o gene *oipA*, através da biologia molecular e conseqüentemente foram sequenciadas para analisar a funcionalidade do gene *oipA* (gene *opiA on e off*). Destes, 38/81 (49,3%) eram do gênero masculino e 43/81 (53,1%) do gênero feminino, não havendo diferença estatística entre os grupos estudados.

Foi realizado um corte na faixa etária de 45 anos, optou-se por esse grupo por apresentarem mais comorbidades. No grupo dos menores de 45 anos, 30 (37,0%) expressaram o gene *oipA* e no grupo dos maiores de 45 anos, 51 (63,0%) apresentaram o gene *oipA*. A expressão do gene *oipA* nas afecções gástricas pesquisadas se

apresentaram da seguinte forma: gastrite 32 (39,5%), úlcera péptica 31 (38,3%) e câncer gástrico 18 (22,2%). (Tabela 6).

Tabela 6 : Variáveis associadas com o genótipo *oipA* do *H. pylori*

	<i>oipA</i> (n = 81)
Gênero	
Masculino	38 (46,9%)
Feminino	43 (53,1%)
Faixa Etária	
<45 anos	30 (37,0 %)
>45 anos	51 (63,0%)
Afecções Gástricas	
Câncer gástrico	18 (22,2%)
Úlcera péptica	31 (38,3%)
Gastrite	32 (39,5%)

4.4 Associação do gene *oipA* funcional e não funcional com os genótipos *cagT* e *Lec* nas afecções gástricas.

No sequenciamento do gene *oipA*, os seguimentos CT indicam a funcionalidade do gene. No presente estudo foram encontrados em 34/81 (42,0%) das cepas dos pacientes analisados. A associação do gene *oipA on* com o genótipo *cagT*, demonstrou uma expressão deste de 100%, revelando ser estatisticamente significativa ($p= 0,002$). A relação entre o gene *oipA on* e o genótipo *LEC* foi de 33/34 (97,1%).

A tabela 7 demonstra a prevalência do gene *oipA* funcional e não funcional nas afecções estudadas. Dos 32 pacientes com gastrite, 11(34,4%) apresentaram o gene *oipA* funcional e 21(65,6%) apresentaram o gene *oipA* silenciado. Dos 31 pacientes acometidos de úlcera péptica, 13(41,9%) expressaram o gene *oipA* funcional e 18(58,1%) apresentaram *oipA* silenciado. Dos 18 pacientes portadores com câncer gástrico, 10 (55,6%) apresentaram *oipA* funcional e 08(44,4%) apresentaram o gene *oipA* silenciado. Não houve significância estatística entre as afecções e a funcionalidade e não funcionalidade do gene *oipA*.

Tabela 7: Prevalência do gene *oipA* funcional e não funcional nas afecções estudadas

	oipA "on"	oipA "off"	valor de <i>p</i>
Câncer gástrico(n=18)	10 (55,6%)	8 (44,4%)	0.28
Úlceras pépticas (n=31)	13 (41,9%)	18 (58,1%)	1.00
Gastrite (n=32)	11 (34,4%)	21 (65,6%)	0.36
<hr/>			
Total (n= 81)	34	47	

As figuras de 5-11 ilustram alguns géis de agarose a 2% dos marcadores estudados.

Figura 5: Gel de agarose a 2% para visualização das bandas do gene *cagT* em pacientes portadores de gastrite.

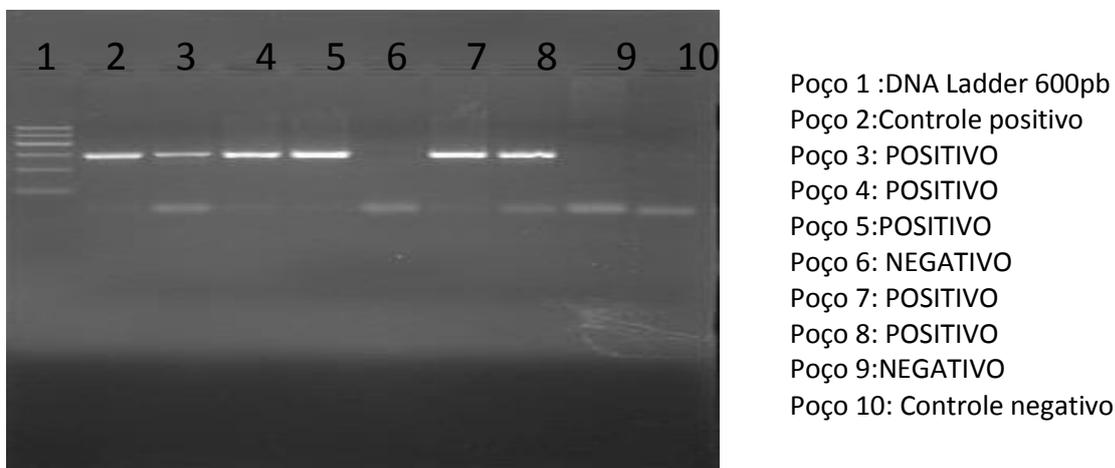


Figura 6: Gel de agarose a 2% para visualização das bandas do gene *cagT* em pacientes portadores de câncer.

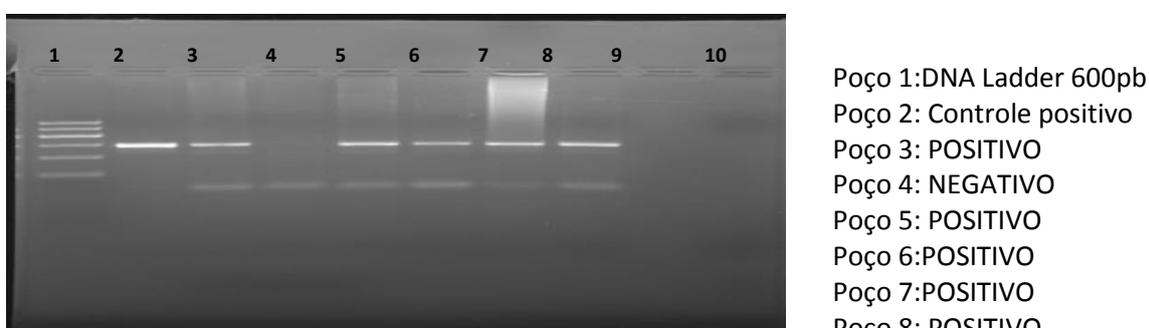
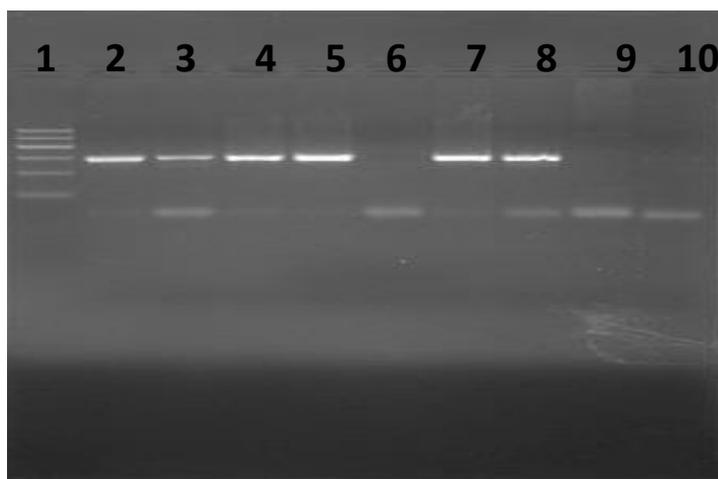
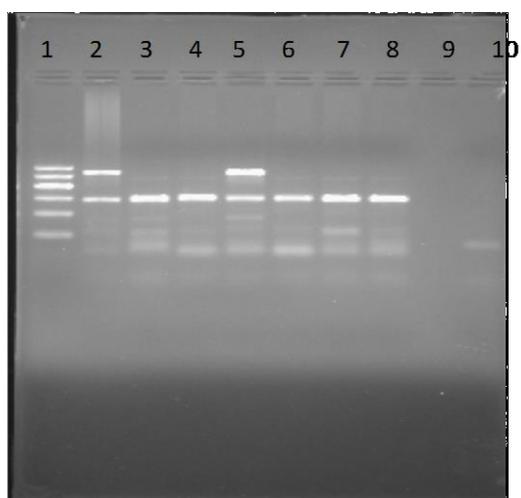


Figura 7: Gel de agarose a 2% para visualização das bandas do gene *cagT* em pacientes portadores de úlcera péptica.



Poço 1: DNA Ladder 600pb
 Poço 2: Controle positivo
 Poço 3 : POSITIVO
 Poço 4: POSITIVO
 Poço 5: POSITIVO
 Poço 6: NEGATIVO
 Poço 7: POSITIVO
 Poço 8: POSITIVO
 Poço 9: NEGATIVO
 Poço 10: Controle negativo

Figura 8 : Gel de agarose a 2% para visualização das bandas do gene *LEC* em pacientes portadores gastrite.



Poço 1: DNA Ladder
 Poço 2: Controle positivo
 Poço 3: POSITIVO
 Poço 4: POSITIVO
 Poço 5: POSITIVO
 Poço 6: POSITIVO
 Poço 7: POSITIVO
 Poço 8: POSITIVO
 Poço 9: SEM AMOSTRA
 Poço 10: Controle negativo

Figura 9 : Gel de agarose a 2% para visualização das bandas do gene *LEC* em pacientes portadores de câncer.

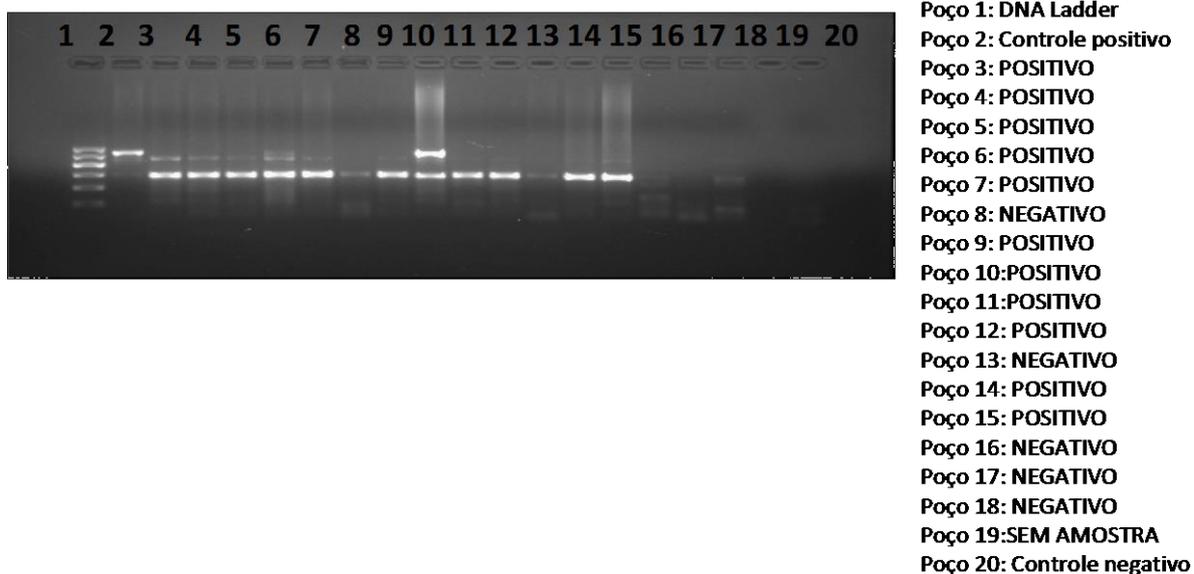
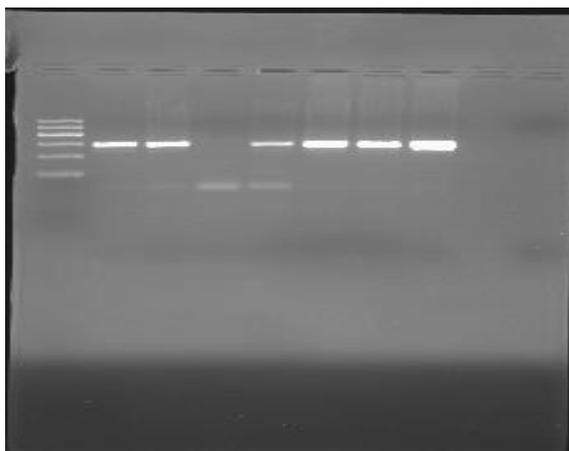


Figura 10 : Gel de agarose a 2% para visualização das bandas do gene *LEC* em pacientes portadores úlcera.



Figura 11 : Gel de agarose a 2% para visualização das bandas do gene *oipA* em pacientes portadores de úlcera péptica



- Poço 1: DNA Ladder 600pb
- Poço 2: Controle positivo
- Poço 3: POSITIVO
- Poço 4: NEGATIVO
- Poço 5: POSITIVO
- Poço 6: POSITIVO
- Poço 7: POSITIVO
- Poço 8: POSITIVO
- Poço 9: SEM AMOSTRA
- Poço 10: Controle negativo

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a presença de marcadores de virulência *cagT* e *LEC* que compõem a ilha de Patogenicidade *cagA* (*cagA*-PAI), e o gene *oipA* que pertence a região de plasticidade do *Helicobacter pylori*, relacionando-os com as principais afecções gástricas: gastrite, úlcera e câncer gástrico.

Foi avaliado o perfil genotípico de 181 cepas de *H. pylori*, a partir de 64 pacientes portadores de gastrite, 69 portadores de úlcera péptica e 48 portadores de câncer gástrico.

O gene *cagT* mostrou-se presente em 145/181(80,1%) das cepas analisadas e o gene *LEC* em 83/181(45,9%) das cepas estudadas.

Avaliando o genótipo *cagT* entre os portadores das afecções gástricas, esse genótipo esteve presente em 89,6% dos casos de câncer gástrico, 89,8% em úlcera péptica e 62,5% em gastrite. O gene *cagT* foi relacionado significativamente à úlcera péptica, e não mostrou relação com o câncer gástrico.

A prevalência achada no presente estudo é similar à encontrada em estudo anterior realizado no Brasil, na região Sudeste, por Mattar et al. (2007), estudando 215 pacientes, sendo 150 portadores de úlcera péptica e 65 portadores de gastrite, onde encontraram prevalências de 98,0% e 58,5% para os grupos estudados, respectivamente. O gene *cagT* foi associado à úlcera péptica e à gastrite, resultados similares aos encontrados nesse estudo. Diferentemente, estudo realizado na Turquia (GOKBEN OZBEY et al, 2013), investigando a ilha de patogenicidade *cag* em 69 pacientes, portadores de gastrite e úlcera péptica, acharam prevalência do gene *cagT* em 17/48 (35,4%) em gastrite e 7/21 (33,3%) em úlcera, sem relação de significância deste gene com os desfechos clínicos. Outro estudo conduzido no Brasil por Mattar et al (2010), investigando o genótipo *cagT* em 34 pacientes com câncer gástrico, apresentaram uma prevalência de 16/34 (47.1%) para o gene *cagT*, diferentemente da prevalência encontrada no presente estudo. No estudo de Mattar et al. (2010) não foi encontrada relação do gene *cagT* com o câncer gástrico, similarmente ao encontrado nesse estudo.

Em estudo conduzido na Túrquia, por Ozbey et al. (2013), acharam prevalência do gene *LEC* em 5/48(10,4%) e 3/21(14,3%), em portadores de gastrite e úlcera, respectivamente. Diferentemente das prevalências encontradas no presente estudo.

A prevalência do gene *LEC* nos grupos estudados nesse trabalho foi de 32/64(50,0%) em portadores de gastrite, 34/69 (49,3%) nos pacientes com úlcera péptica e 17/48 (35,4%) em câncer gástrico. Estudo realizado no Brasil com 150 pacientes com úlcera péptica investigando o gene *LEC* encontrou 87/150 (58%) de prevalência desse gene, estando associado à úlcera péptica (MATTAR *et al*, em 2007). Resultados similares aos encontrados nesse estudo com relação à prevalência. No entanto, diferentes com relação à associação com a afecção, que não foi observada com o gene *LEC* no presente estudo.

Outro estudo conduzido no Brasil por Mattar *et al* em 2010 investigando os genótipos *LEC* em 34 pacientes com câncer gástrico, apresentaram prevalência de 20/34 (58,8%) para o gene *LEC*. Tais achados divergem dos encontrados no presente estudo, onde a prevalência do gene *LEC* em portadores de câncer foi de 17/48 (35,4%). No estudo de Mattar et al. (2010), foi observada relação do gene *LEC* como câncer gástrico, diferentemente do observado no presente estudo.

Vale salientar que, a prevalência dos marcadores da ilha de patogenicidade *cag*, varia de acordo com as diferentes regiões geográficas, possivelmente pela diversidade de cepas circulantes nas diversas regiões do mundo.

No presente estudo das 181 amostras estudadas, 81 apresentaram o gene *oipA*. De acordo com as afecções gástricas relacionadas, 31(38,3%) cepas são de úlcera péptica, 32 (39,5%) de portadores de gastrite e 18(22,2%) de portadores de câncer.

Estudo realizado na Turquia por Gokben Ozbey et al, 2013 em 48/69 pacientes com gastrite e 21/69 pacientes com úlcera foi encontrado respectivamente 75% e 85,7%. Esse achado é divergente do encontrado por esse estudo.

Dois estudos relacionando o gene *oipA* com gastrite, realizados por Oleastro, em Portugal um em 2008 e o outro em 2010, mostraram respectivamente 17/53(32,1%) e 18/60(30%). Tal achado sugere uma similaridade com o nosso estudo que foi de 34,4%.

Vários estudos apontam a presença do *oipA on* estar relacionada a úlceras pépticas e câncer gástrico. No presente estudo 81 amostras expressaram o gene *oipA*, onde foi realizado o sequenciamento genético, com o objetivo de evidenciar a funcionalidade *oipA* “on”) e não funcionalidade (*oipA* “off”) deste gene. Destes 34 (42%) expressaram o

gene *oipA* funcional e 47(58%) o gene *oipA* não funcional. Das 31 cepas oriundas de úlcera péptica 13 (41,9%), apresentaram gene *oipA* funcional. Das 32 amostras de portadores de gastrite, 11 (34,4%) expressaram o gene *oipA* funcional e dos 18 portadores de câncer gástrico, 10 (55,6%) expressaram o gene *oipA* funcional.

Um estudo realizado por Matteo et al em 2010 na Argentina analisando 229 fragmentos revelou que 136/229 (59,4%) apresentaram o gene *oipA* funcional. Foi observado em estudos realizados na Europa, Ásia, América do Norte e América do Sul que a prevalência do *oipA* funcional varia de 68% a 97%. Tais achados divergem do encontrado no presente estudo.

Estudo realizado por Yamaoka et al em 2002 nos Estados Unidos em 30 pacientes com câncer gástrico, demonstrou que 20 destes (66,7%) tinha relação com o gene *oipA* funcional. Esse achado é o qual os nossos resultados (55,6%) mais se aproximam.

Não foi encontrada significância estatística entre a expressão de *oipA* e as afecções estudadas. Este resultado está de acordo com os achados por Dabiri et al. (2009), no Irã, em estudo com pacientes portadores de gastrite, úlcera péptica e câncer gástrico. O que difere do achado de Mansour et al. (2010), realizado na Tunísia, onde foi evidenciada alta prevalência de *oipA* nas gastrites, 95.3% (186/195) e estatisticamente significante. Divergindo de outros estudos que mostraram uma relação significativa entre cepas *oipA* positivo e úlcera péptica (YAMAOKA et al., 2002, MARKOVSKA et al., 2011).

Outro trabalho relata que *oipA* induz inflamação através de mecanismos de fosforilação em diversas vias de sinalização celular e que têm uma forte interação com a fosforilação induzida pela proteína CagA (TABASSAM et al., 2008).

Algumas pesquisas, sugerem que o gene *oipA* funcionante é um marcador efetivo de desfechos clínicos graves, e correlaciona a expressão da proteína OipA com a presença dos genes da ilha de patogenicidade *cag* (YAMAOKA et al, 2002; YAMAOKA et al., 2006).

Ainda existem poucos estudos relacionando a ilha de patogenicidade *cagPAI*, os genes *cagT* e *LEC*, e o genótipo *oipA* com afecções gástricas. Porém, tais achados apontam que não só o Brasil, mas, várias regiões geográficas, tem um padrão de cepas de *H. pylori* circulantes variáveis e assim podem apresentar diferente relação dos seus genótipos com a capacidade de virulência da bactéria. É essencial um mapeamento desse perfil

genético do *H. pylori* e o estabelecimento de suas devidas correlações nas cepas circulantes do Brasil e sua associação com as principais afecções gástricas.

6 CONCLUSÃO

O gene *cagT* mostrou associação com úlcera péptica. Mas, não esteve relacionado com gastrite e câncer gástrico. O gene *LEC* não foi associado a nenhuma das afecções estudadas. O gene *oipA* funcional não foi associado a nenhuma afecção estudada.

Houve associação significativa do câncer gástrico com o gênero masculino. Não houve associação das demais afecções com gênero e idade dos pacientes. A presença do gene *oipA* funcional foi relacionada ao gene *cagT*.

REFERÊNCIAS

ANDREIA, M.; PHILIPPE, L.; FRANCES, MEGRAUD, F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter.**, v. 20, p. 1-7, 2015.

ARGENT, R. H.; KIDD, M.; OWEN, R. J.; THOMAS, R. J.; LIMB, M. C.; ATHERTON, J. C. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 127: p. 514-523, 2004.

BRUCE, E. D. Mecanismos patogênicos do *Helicobacter pylori*. **Clínicas de Gastroenterologia da América do Norte**, v. 1: p.43-57, 1993.

CARDINALI, L.C.C; ROCHA, G.A; ROCHA, A.M . Evaluation of C-urea breath test and *Helicobacter pylori* stool antigen test for diagnosis of *H. pylori* infection in children from a developing country. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 334-335, 2003.

CARVALHO, A. S. T. Peptic ulcer. **Jornal de Pediatria**, supl. 2/ S127, 2000.

CAVALCANTE, M. Q.; SILVA, C. I.; BRAGA-NETO, M. B.; FIALHO, A.B.; NUNES FIALHO, A.; BARBOSA, A. M.; ROCHA, G. A. ; QUEIROZ, D. M.; BRAGA, L. L. *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107: p. 561–563, 2012.

CLAYTON, C.L; KLEANTOUS, H; COATES, P.J MORGAN, D.D; TABAQCHALLI S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol**, v.30, p.192-200, 1992.

COLE, S.P.; CIRILLO, D.; KAGNOFF, M.F.; GUINEY, D.G.; ECKMANN, L. Coccoid and spiral *helicobacter pylori* differ in their abilities to gastric epithelial cells and induce interleukin-8 secretion. **Infect Immun.**, v. 65, n. 2, p. 843-846, 1997.

CORREA, P; PIAZUELO, MB. Natural history of *Helicobacter pylori* infection. **Digestive Liver Disease.**, v. 40, p. 490-496, 2008.

COVACCI, A., FALKOW, S.; BERG, D.E.; RAPPUOLI, R. Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? **Trends Microbiol** 5:205–8,1997.

CRABTREE, J. E.; SHALLCROSS, T. M.; HEATLEY, R. V.; WYATT, J. I. Mucosal tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. **Gut**, v.32: p.1473-1477, 1991.

CRABTREE, J. E.; WYATT, J. I.; TREJDOSIEWICZ, L. K. Inteleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. **J. Clin. Pathol.**, v.47: p.61-66, 1994.

DABIRI, H.; MALEKNEJAD, P.; YAMAOKA, Y.; FEIZABADI, M.; JAFARI, F.; REZADEHBASHI, M.; NAKHJAVANI, F.; MIRSALEHIAN, A.; ZALI, M. Distribution of *Helicobacter pylori* cagA, cagE, oipA and vacA in different major ethnic groups in Tehran, Iran. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 24: p. 1380–1386, 2009.

DIXON, M. F. Classification and Grading of Gastritis:The Updated Sydney System. **The American Journal of Surgical Pathology**, v.20, p.1161-1181, Oct.1996.

DOENGES, J. L.Spirochetes in the gastric glands of macacus rhesus and humans without definite history of related disease. **Proc. Soc. Exp. Med. Biol.**, v. 38, p. 536-538, 1938.

EISIG, J.N.; SILVA, FM - *Helicobacter pylori*. **Rev Bras Med.**, v. 59, n. 6, p. 439-442, 2002.

FALK, P. G.; BRY, L.; HOLGERSSON, J.; GORDON, J. I. Expression of a human alpha-1,3/4-fucosyltransferase in the pit cell lineage of FVB/N mouse stomach results in production of Leb- model for studying *Helicobacter pylori* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92: p. 1515-1519, 1995.

FOX, J.G.; WANG, T.C. *Helicobacter pylori* infection: pathogenesis. **Curr. Opin. Gastroenterol**, 18: 15-25, 2002.

GOODWIN, C. S. Campylobacter pylori become Helicobacter pylori. **Int J Bacteriol.**, v. 39, p. 353-405, 1989.

GONÇALVES, M. H.; SILVA, C. I.; BRAGA-NETO, M. B.; FIALHO, A. B.; NUNES FIALHO, A. M.; QUEIROZ, D. M.; BRAGA, L. L. *Helicobacter pylori* virulence genes detected by string PCR in children from an urban community in northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 51, n. 3: p. 988–989, 2013.

GOKBEN, O.; ULVI D.; CEM, A.; HASAN, B. E. Investigation of the association between clinical outcome and the cag pathogenicity-island and other virulence genes of *Helicobacter pylori* isolates from patients with dyspepsia in Eastern Turkey- **Brazilian Journal of Microbiology** 44, 4, 1267-1274 2013.

GRAHAM, D. Y.; ADAM, E.; REDDY, G. T.; ARGAWAL, J. P.; ARGAWAL, R.; EVANS, D. J.; MALATY, H. M.; EVANS, D. G. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Índia: Comparison of developing and developed countries. **Dig. Dis. Sci.**, v.36, n.8, p. 1084-1088, 1991.

GURUGE, J. L.; FALK, P. G.; LORENZ, R. G.; DANS, M.; WIRTH, H. P.; BLASER, M. J.; BERG, D. E.; GORDON, J. I. Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95: p. 3925-3930, 1998.

GUZMÁN, M. El premio de fisiología y medicina 2005. **Biómedica**, Bogota, v. 26, n. 2, p. 7-8, marzo, 2006.

HASNI, S.; IPPOLITO, A.; ILLEI, G. G. *Helicobacter pylori* and autoimmune diseases. Oral dis., **Copenhagen.**, v. 17, n. 7, p. 621-627, 2011

HAZEL, S. L.; LEE, A.; BRADY, L.; HENNESSEY, W. *Campylobacter pyloridis*: association with intracellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factor in colonization of the gastric epithelium. **J. Inf, Dis.**, v. 153: p. 658-663, 1986.

HOLTON, J. Clinical relevance of culture: why, how, and when. **Helicobacter.**, v. 2, p. 25-33, 1999.

HORA, J. **Principais temas em gastroenterologia para residência médica**. São Paulo: Medcel; 2008

IKENOUE, T. et al. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the cag pathogenicity island. **Clin Diagn Lab Immunol.**, v. 8, p. 181- 186, 2001.

INCA- Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em 09/12/2015.

ISRAEL, D.A.; PEEK, R.M. Review article: pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 15: 1271-90, 2001.

ILVER, D.; ARNQVIST, A.; OGREN, J.; FRICK, I. M.; KERSULYTE, D.; INCECIK, E. T.; BERG, D. E.; COVACCI, A.; ENGSTRAND, L.; BOREN, T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. **Science**, v. 279: p. 373-377, 1998.

KANDULSKI, A.; SELGRAD, M.; MALFERTHEINER, P. *Helicobacter pylori* infection: a clinical overview. **Dig. liver dis.**, Rome, v. 40, n. 8, p. 619-626, 2008.

KAUSER, F. et al. Comparative genomics of *Helicobacter pylori* isolates recovered from ulcer disease patients in England. **BMC Microbiol.**, v. 5, p. 32-42, 2005.

KODAIRA, M. S.; ESCOBAR, A.M. U.; GRISI, S. Epidemiological aspects of *helicobacter pylori* infection in childhood and adolescence. **Rev Saúde Pública.**, v.36, p. 356-359, 2002.

KREINITZ, W. Ueber das auftreten von spirochaeten verschiedener form im mageninhalte bei carcinoma ventriculi. **Dtsch. Med. Wochenshr.**, v. 32, p. 872, 1906.

KUIPERS, E.J. Relationship between *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis and gastric cancer. **Aliment Pharmacol Ther.**, v.12(Suppl 1), p.25-36, 1998.

KUSTERS, J. G.; GERRITS, M.M.; VAN STRIJP, J.A.G.; VANDENBROUCKE-GRAULS, M.J.E. Coccoid forms of *helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. **Infect Immun.**, v 65, n. 9, p. 3672-3679, 1997.

KUSTERS J. G., VAN VLIET A. H. M. & KUIPERS E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 19, p. 449-490, 2006.

LEHOURS, P.; RUSKONE, F.A., VERGNE, A.; CANTET, A.; MÉGRAUD, F. Which test to use to detect *Helicobacter pylori* infection in patients with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma? **Am J Gastroenterol.** 98: 291-5, 2003.

LIMA V. P. ; RABENHORST S. H. B. Genes Associados à Virulência de *Helicobacter pylori*. *Revista Brasileira de Cancerologia* 54: 389-396,2009.

LINZ B, BALLOUX F, MOODLEY Y, et al. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. **Nature** 2007; 445:915.

LU, H.; WU, J. Y.; KUDO, T.; OHNO, T.; GRAHAM, D. Y.; YAMAOKA, Y. Regulation of interleukin-6 promoter activation in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 10: p. 4954–4966, 2005.

MAEDA, S.; AKANUMA, M.; MITSUNO, Y.; HIRATA, Y.; OGURA, K.; YOSHIDA, H.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. Distinct mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells.

MALATY, HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Best Pract & Res Clin Gastroenterol.**, v. 2, p. 205-214, 2007.

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

MARSHALL, B.J.; WARREN, J.R.: Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet.**, v. 1, p. 1273-1275, 1983.

MARSHALL, B.J.; WARREN, JR.; FRANCIS, G.J.,; LANGTON, S.R.; GOODWIN, C.S.; BLINCOW. E.D. Rapid urease test in the management of *Campylobacter pylori* associated gastritis. *Am J Gastroenterol* 82:200-10, 1987.

MATTAR . Association of LEC and tnpA *Helicobacter pylori* genes with gastric cancer in a Brazilian population. **Infectious Agents and Cancer** 2010 5:1.

MATTAR, R SERGIO B. M.; MARIA DO SOCORRO, M.; ANIBAL, F. S.; KIYOSHI, I.; FLAIR, J. C. *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. *Journal of Medical Microbiology* , 56, 9–14,2007.

MATTEO MJ, GRANADOS G, PÉREZ CV, OLMOS M, SANCHEZ C, CATALANO M. *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island genotype diversity within the gastric niche of a single host. *J Med Microbiol* 56:664-669,2007 .

MENDALL, M.A.; GOGGIN, P.M.; MOLINEAUX, N.; LEVY, J.; TOOSY, T.; STRACHAN, D.; NORTHFIELD, T.C. Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. **Lancet.** v. 339,p. 896–897, 1992.

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.

MORAES, M.M.; SILVA, G.A. Risk factors for *Helicobacter pylori* infection in children. **J Pediatr.**, v. 79, p. 21-8, 2003.

MURRAY, P. R. *et al.* **Microbiologia médica.**, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

NDIP, R.N.; MACKAY, W.G.; FARTHING, M.J.G.; WEAVER, L.T. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 36, n. 5, p. 616-622, 2003.

NILSSON, C., SILLE´ N, A., ERIKSSON, L., STRAND, M.-L., ENROTH, H., NORMARK, S., FALK, P. & ENGSTRAND, L. . Correlation between cag pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori* associated gastroduodenal disease. **Infect Immun** 71, 6573–6581, 2003.

ODENBREIT, S. et al. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. **Science**, v.287, p.1497–1500, 2000.

PARENTE, JML, *et al.* *Helicobacter pylori* infection in children of low and high socioeconomic status in northeast Brazil. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 75, p. 509-512, 2006.

PARSONNET, J.; FRIEDMAN, G. D.; ORENTREICH, N.; VOGELMAN, H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v. 40: p. 297-301, 1997.

PEURA DAVID A, *et al.* *Helicobacter pylori* infection. **Up To Date.**, march 2007.

PORTORREAL, A.; KAWAKAMI, E. Avaliação do método imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes. **Arq Gastroenterol.** 39: 198-203, 2002.

QUEIROZ, D. M.; CUNHA, R. P.; SARAIVA, I. E.; A. M. *Helicobacter pylori* virulence factors as tools to study human migrations. **Toxicon.**, v. 56, n. 7, p. 1193-1197, dec. 2010.

QUEIROZ, D. M. M.; BITTENCOURT, P.; GUERRA, J. B.; ROCHA, A. M.; ROCHA G. A.; CARVALHO, A. S. IL1RN polymorphism and cagA-positive *Helicobacter pylori* strains increase the risk of duodenal ulcer in children. **Pediatr. Res.**, v. 58, p. 892-896, 2005.

RODRIGUEZ, M. N.; QUEIROZ, D. M.; BEZERRA, F. J.G. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children from an urban community in north-east Brazil and risk factors for infection. **Eur. J. Gastroenterol.Hepatol.**, v.16, p. 201-205, 2004.

SAMPAIO, A.; SANTOS, P. Factores Genéticos do *Helicobacter Pylori* e do Hospedeiro na Carcinogénese Gástrica. **Rev Port Cienc Biom.** 72-8,2008.

SAMUELS, A.L.H.M.; WINDSOR, H.M.; HO, G.Y.; GOODWIN, L.D.; MARSHALL, B.J. Culture of *Helicobacter pylori* from a gastric string may be an alternative to endoscopic biopsy. **J Clin Microbiol.** v.38, p.2438-2439, 2000.

SATO, R. et al. Development of corpus atrophic gastritis may be associated with *Helicobacter pylori*-related idiopathic thrombocytopenic purpura. **J. Gastroenterol.**, Tokyo, v. 46, n. 8, p. 991-997, 2011.

SHAO S.-H., WANG H., CHAI S.-G. & LIU L.M. Research progress on *Helicobacter pylori* outer membrane protein. **World Journal of Gastroenterology.**, 11: 3011-3013, 2005.

SILVA, C.; I.; S.; M. Genótipos *cagA*, *vacA* e alelos e sítios de fosforilação de tirosina da proteína *cagA* do *H. pylori* em pacientes com e sem história familiar de câncer gástrico. **Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia**, Fortaleza-Ce, 2009.

TABASSAM, F. H.; GRAHAM, D.Y.; YAMAOKA, Y. *OipA* plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal reorganization. **Cell Microbiol.** v. 10, n.4:p. 1008-1020, 2008.

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

TONKIC, A. et al. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, v. 17, Supl.1, p. 1–8, 2012.

TORRES, J.; CAMORLINGA, M.; PÉREZ-PERÉZ, G.; GONZALEZ, G.; MUÑOZ, O. Validation of the string test for the recovery of **Helicobacter pylori** from gastric secretions and correlation of its results with urea breath test results, serology, and gastric pH levels. **J Clin Microbiol.** 2001.

VAIRA, D.; MALFERTHEINER, P.; MERGRAUD, F. Noninvasive antigen-based assay for assessing *Helicobacter pylori* eradication; a European multicenter study. The European *Helicobacter pylori* HpSA study group. **Am J Gastroenterol.**, v. 95, p. 925-9, 2000.

VAN ZWET, A.A.; THIJSS, J.C.; ROOSENDAAL, R.; KUIPERS, E.J.; PENA, S.G.J. Practical diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v 8,p.501-07, 1996.

WATANABE, T. et al. Nucleolin as cell surface receptor for tumor necrosis factor-alpha inducing protein: a carcinogenic factor of *Helicobacter pylori* **J Cancer Res Clin Oncol.** n. 6, v. 136, p. 911-21, 2010.

WEX, T. et al. Serological prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Saxony-Anhalt, Germany, in 2010. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, p. 2109–12, 2011.

YAMAOKA, Y.; KWON, D. H.; GRAHAM, D. Y. A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 13: p. 7533–7538, 2000.

YAMAOKA, Y.; KIKUCHI, S.; EL-ZIMAITY, H.M.; GUTIERREZ, O.; OSATO, M.S.; GRAHAM, D.Y. Importance of *Helicobacter pylori* a in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. **Gastroenterology**;123(2):414-24, 2002.

YAMAOKA, Y.; KIKUCHI, S.; ELZIMAITY, H. M. T.; GUTIERREZ, O.; OSATO, M. S.; GRAHAM, D. Y. Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. **Gastroenterology**, v. 123, n. 2: p. 414–424, 2002.

YAMAOKA, Y.; OJO, O.; FUJIMOTO, S. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. **Gut**, v. 55, n. 6: p. 775–781, 2006.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar do estudo que visa avaliar o papel de uma bactéria chamada *Helicobacter pylori*, que causa as principais doenças gástricas. A azia é um dos sintomas mais comuns de problemas gastrointestinais e está relacionada a doenças como gastrite e úlcera. Você que apresenta sintomas de doenças no estômago e está sendo atendido neste serviço de saúde, poderá ser portador desta bactéria, por isso está sendo convidado a participar do estudo. Antes de aceitar participar, é necessário que você leia e compreenda as explicações sobre os procedimentos propostos e, quaisquer dúvidas podem ser esclarecidas pelos pesquisadores responsáveis.

Caso compreenda e deseje participar, você fará alguns exames: endoscopia. A endoscopia é um exame onde é introduzido, pela boca, um pequeno tubo flexível, que poderá gerar algum desconforto, para evitar isso, será aplicada uma injeção de um medicamento que minimizará o desconforto. Neste exame, serão colhidos pequenos fragmentos do seu estômago para serem analisados (biópsia). Será colhido também amostras de sangue para exames, pode haver dor local e ocasionar a formação de hematomas no local da punção. Porém, o risco de gravidade é mínimo para você. 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.

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. No momento não há benefícios diretos para você, uma vez que o estudo visa descobrir os possíveis mecanismos de infecção e desenvolvimento de doenças por parte da bactéria, que se traduzirão em benefícios futuros na prevenção e no tratamento das doenças gástricas. Você não terá nenhuma despesa pessoal para a realização do estudo em qualquer uma de suas fases, incluindo exames e consultas e também não receberá nenhum pagamento relacionado à sua participação.

Os resultados dos seus exames serão entregues a você e serão mantidos em sigilo pelos pesquisadores, que se comprometem a utilizar esses resultados somente para os fins dessa pesquisa. Em nenhum momento você 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. Você poderá sair desse estudo 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.

Os pesquisadores responsáveis por este estudo são: Dra Lucia Libanez B.C. Braga, que pode ser encontrada pelo telefone: (085) 3366-8444 ou 8865-2042. Dr. Igor Simões pelos telefones: (85) 8825-8623 ou 9690-7567. 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) 3366-8589.

Declaro que li e entendi as informações que me foram prestadas. 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:

_____,
____ anos, RG: _____, órgão expedidor: _____ Data _____

Assinatura da testemunha:

Assinatura do responsável pelo estudo:

APÊNDICE B

Estudo clínico, epidemiológico do câncer gástrico e sua associação com o *H. pylori* Questionário para Pacientes com Câncer Gástrico

CÓDIGO: _____ DATA: ____/____/____

Preenchido por: _____

1. IDENTIFICAÇÃO

1.1. Paciente: _____ Prontuário: _____

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 N° Lâmina da peça cirúrgica _____

2. HISTÓRIA CLÍNICA

2.1) Queixa Principal: _____

2.2) Data do início dos sintomas: _____ 2.3) 1ª Consulta: _____

2.4) Anemia: 1. Sim 2. Não Hemoglobina: _____ Hemácias: _____ Hematócrito: _____

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

5. Outra: _____

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

4. Outra: _____

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

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

2.9) Alívio da Dor: 1. Alimentação 2. Antiácidos 3. Antagonista H2

4. Inibidor de bomba de próton 5. Outros: _____

2.10) Hematêmese : 1. Sim 2. Não. 2.11) Melena: 1. Sim 2. Não

2.12) Perda de peso: 1. Sim 2. Não Quantos quilos? _____ Há quanto tempo? _____

2.13) Saciedade precoce: 1. Sim 2. Não 2.14) Azia: 1. Sim 2. Não

2.15) Disfagia: 1. Sim 2. Não 2.16) Vômito: 1. Sim 2. Não

2.17) Ascite: 1. Sim 2. Não 2.18) Icterícia: 1. Sim 2. Não 2.19) Outro: _____

2.20) Comorbidades: _____

2.21) Tipo sanguíneo: _____ 2.22) Transfusões sanguíneas: 1. Sim _____ 2. Não

2.23) Cirurgia gástrica anterior: 1. Sim Qual? _____ Há quanto tempo? _____ 2. Não

2.24) Endoscopia; TC; US : 1. Sim 2. Não

Resultados: _____

2.25) Infecção por *H. pylori*: 1. Sim 2. Não 3. Não informa

2.26) Doença de Ménétrier: 1. Sim 2. Não 3. Não informa

2.27) Uso frequente de AINES (Anti-inflamatórios Não-Esteroidais)?

1. Sim. Qual? _____ 2. Não

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

2.29) Fumante (atual) 1. Sim Idade de início: _____ Quantos maços/dia: _____

O que fuma? _____ Há quanto tempo? _____ Se parou, há quanto tempo? _____

2. Não

2.30) Etilista? 1. Sim Idade de início: _____ Quantidade: _____

O que bebe? _____ Há quanto tempo? _____ Se parou, há quanto tempo? _____

2. Não

- 2.31) Uso freqüente de antibióticos? 1. Sim 2. Não
 2.32) Em uso atual (Últimos 30 dias)? 1. Sim Qual _____ 2. Não
 2.33) Uso freqüente de anti-secretores? 1. Sim Qual: _____ 2. Não
 2.34) Em uso atual (Últimos 30 dias)? 1. Sim Qual: _____ 2. Não

3. HISTÓRIA FAMILIAR

- 3.1) História de úlcera na família? 1. Sim; Qual o parentesco? _____
 2. Não
 3.2) 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
 3.3) Câncer na família em outros sítios? 1. Sim Quem? _____ Local _____
 2. Não

4. CONDIÇÕES PSICO-SOCIAIS

- 4.1 Tipo de moradia: 1. Alvenaria; 2. Taipa; 3. Madeira; 4. Papelão; 5. Outro
 4.2 Quantos cômodos? _____ 4.3 Quantas pessoas residem? _____
 4.4 Possui rede de esgoto? 1. Sim 2. Não
 4.5 Possui água encanada? 1. Sim 2. Não
 4.6 Possui banheiro na casa? 1. Sim 2. Não
 4.7 Tipo de ingesta da água? 1. Sem tratamento 2. Filtrada 3. Fervida
 4. Ozonizada 5. Mineral 6. Outros _____
 4.8 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
 4.9 Estado civil: 1. Solteiro 2. Casado 3. Divorciado 4. Outros _____
 4.10 Profissão: _____
 4.11 Renda mensal 1. < 1SM 2. 1SM a 2 SM 3. 2SM a 3SM
 4. 3SM a 5SM 5. > 5 SM

Números de irmãos _____ Número de irmãos mais novos _____

Posição na família: _____

5. HÁBITOS ALIMENTARES

- 5.1 Ingesta frequente de defumados? 1. Sim Freqüência: _____ 2. Não
 5.2 Ingesta frequente de carnes secas/salgadas? 1. Sim Freqüência: _____ 2. Não
 5.3 Ingesta frequente de farináceos? 1. Sim Freqüência: _____ 2. Não
 5.4 Ingesta frequente de verduras/frutas cítricas? 1. Sim Freqüência: _____ 2. Não
 5.5 Forma de armazenamento/estocagem dos alimentos? _____
 5.5.1 Geladeira/Freezer: 1. Sim Uso habitual? _____ 2. Não
 5.5.2 "Salga" e "Seca" as carnes 1. Sim Freqüência: _____ 2. Não
 5.5.3 Outros: 1. Sim Qual? _____ 2. Não

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. Não**APÊNDICE C****Estudo clínico e epidemiológico do câncer gástrico e sua associação com *H. pylori*.****Ficha de Endoscopia**Caso N°

Nome: _____

Sexo: 1. M 2. FIdade: (em anos)

Topografia	Descrição das lesões	Marcar a casa Adequada	não escrever
1. Esôfago	1.1 Normal*	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	
	1.2 Hérnia Hiatal	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	
	1.3 Exulceração	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	
	1.4 Erosões	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
	1.5 Ulcerações	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	
	1.6 Barrett	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	
	1.7 Outro(s) _____	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	
2. Antro Gástrico	2.1 Normal	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	
	2.2 Enantema	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	
	2.3 Erosões	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
	2.4 Edema	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	
	2.5 Micronodularidade/ Padrão Nodoso	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	
	2.6 Atrofia	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	
	2.7 Metaplasia Intestinal	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	
	2.8 Úlcera	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	
	2.9 Pólipo(s)	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	
	2.10 Outro(s) _____	<input type="checkbox"/> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não	

3. Corpo Gástrico	3.1 Normal	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	
	3.2 Enantema	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	
	3.3 Erosões	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	_ _ _ _
	3.4 Edema	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	
	3.5 Micronodularidade	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	
	3.6 Atrofia	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	
	3.7 Metaplasia Intestinal	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	
	3.8 Úlcera	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	
	3.9 Pólipo(s)	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	
	3.10 Outro(s) _____	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	

4. Duodeno	4.1 Normal	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	
	4.2 Hiperemia	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	
	4.3 Erosões	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	_ _ _ _
	4.4 Linfangiectasia	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	
	4.5 Metaplasia Gástrica	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	
	4.6 Úlcera Péptica	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	
	4.7 Outro(s) _____	<input type="checkbox"/> 1.Sim	<input type="checkbox"/> 2.Não	

5. Diagnóstico	5.1. Normal	_
	5.2. Gastrite do antro	_
	5.3. Gastrite do Corpo	_
	5.4. Gastrite do antro e corpo	_
	5.5. Úlcera Gástrica	_
	5.6. Atrofia Antral	_
	5.7. Atrofia Corpal	_
	5.8. Atrofia Corpo e Antro	_
	5.9. Metaplasia Intestinal	_
	5.10. Outro(s): _____	_

6. Teste da Urease: |_| 6.1 Positivo |_| 6.2 Negativo |_| 6.3 Indeterminado

7. Observações:

**Plexo veno-capilar da extremidade distal do esôfago visível;*

APÊNDICE D

Estudo clínico, epidemiológico do câncer gástrico e sua associação com *H. pylori* Ficha para Pacientes Dispépticos

CÓDIGO: _____ DATA: ____/____/____

Preenchido por: _____

1. IDENTIFICAÇÃO

1.3. Paciente: _____

1.4. 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. Freqüente 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. Não

2.20) Etilista? 1. Sim Idade de início: _____ Quantidade: _____

O que bebe? _____ Há quanto tempo? _____ Se parou, há quanto tempo? _____
2. Não

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

Números de irmãos _____ Número de irmãos mais novos _____

Posição na família: _____

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

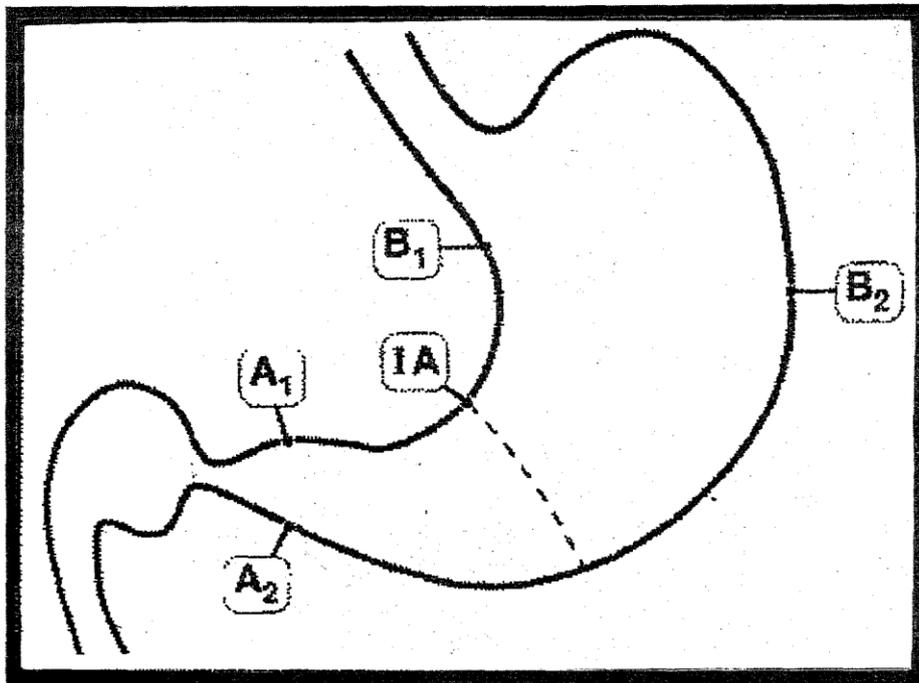
ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ-UFC

Faculdade de Medicina

Estudo clínico e epidemiológico do câncer gástrico e sua associação com
Helicobacter pylori

MAPA DE BIÓPSIAS



(IA) : 1 fragmento do antro, seguindo pela pequena curvatura, junto a incisura angularis - histopatologia; (A1) : 1 fragmento do antro seguindo pela pequena curvatura à cerca de 2-3 cm do piloro - histopatologia; (A2) : 3 fragmentos do antro seguindo pela grande curvatura à cerca de 2-3 cm do piloro - histopatologia, urease e cultura; (B1) : 1 fragmento do corpo, seguindo pela pequena curvatura do corpo à aproximadamente 4 cm do ângulo. (B2) : 1 fragmento da porção média do corpo, pela grande curvatura, à aproximadamente 8 cm da cárdia.

Representação Esquemática dos locais de biópsias seguindo o protocolo de biópsias do Sistema de Sydney Modificado

ANEXO B - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

HUWC/UFCE
Comitê de Ética em Pesquisa
C6d CEP- 081.12.08



**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 / 4011-8213 - FAX: (85) 281-4961 - E-MAIL: cephuwc@huwc.ufc.br

Protocolo nº: 081.12.08

Pesquisadora Responsável: Lúcia Libanez Bessa Campelo Braga

Departamento / Serviço: Gastroenterologia

Título do Projeto: "Estudo clínico e epidemiológico do câncer gástrico e sua associação com *Helicobacter pylori*"

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou em sessão ordinária o projeto de pesquisa: "**Estudo clínico e epidemiológico do câncer gástrico e sua associação com *Helicobacter pylori***", tendo como pesquisadora responsável Lúcia Libanez Bessa Campelo Braga.

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), o Comitê de Ética resolve classificar o referido projeto como: **APROVADO.**

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista: 14/05/10).

Fortaleza, 14 de maio de 2009.

Dra. Mônica Cardoso Façanha
Coordenadora do CEP-HUWC

