



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

FELIPE SILVA MACIEL

AVALIAÇÃO DE SIMILARIDADE GENÉTICA POR *RANDOM*
***AMPLIFIED POLIMORPHIC DNA (RAPD-PCR)* ENTRE AS CEPAS DE**
***Helicobacter pylori* EM ADULTOS E EM SEUS FAMILIARES.**

FORTALEZA

2018

FELIPE SILVA MACIEL

AVALIAÇÃO DE SIMILARIDADE POR GENÉTICA POR *RANDOM AMPLIFIED POLIMORPHIC DNA (RAPD-PCR)* ENTRE AS CEPAS DE *Helicobacter pylori* EM ADULTOS E EM SEUS FAMILIARES.

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

Orientadora:

Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo

FORTALEZA

2018

FELIPE SILVA MACIEL

AVALIAÇÃO DE SIMILARIDADE POR *RANDOM AMPLIFIED
POLIMORPHIC DNA (RAPD-PCR)* ENTRE AS CEPAS DE *Helicobacter
pylori* EM ADULTOS E EM SEUS FAMILIARES.

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

Aprovada em 11/07/2018

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Orleânicio Gomes Ripardo de Azevedo
Faculdade Paulo Picanço

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)

M138a Maciel, Felipe Silva.
AVALIAÇÃO DE SIMILARIDADE GENÉTICA POR RANDOM AMPLIFIED POLIMORPHIC DNA
(RAPD-PCR) ENTRE AS CEPAS DE *Helicobacter pylori* EM ADULTOS E EM SEUS FAMILIARES. /
Felipe Silva Maciel. – 2018.
45 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Lucia Libanez Bessa Campelo Braga.

1. *Helicobacter pylori*. 2. RAPD-PCR intrafamiliar. 3. Câncer gástrico. I. Título.

CDD 615.1

Agradeço a Deus por mais uma conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. LUSMAR VERAS RODRIGUES *in memoriam*, Coordenador da Pós-graduação em ciências-médico cirúrgicas.

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

Ao Dr. ORLEANCIO GOMES RIPARDO, Professor da Faculdade Paulo Picanço, pela disponibilidade em contribuir para o aperfeiçoamento desse estudo e pela presteza em avaliar este estudo e contribuir para o seu aperfeiçoamento.

Às Dras. MARIA APARECIDA ALVES OLIVEIRA, da Universidade Federal do Maranhão, e REGINA DE FÁTIMA GONÇALVES FEITOSA, da Universidade Federal do Ceará, pela presteza em avaliar este estudo e contribuir para o seu aperfeiçoamento.

Ao Me. TIAGO GOMES DA SILVA BENIGNO, farmacêutico, doutorando do Departamento de Ciências Médico-Cirúrgicas, pelo apoio e 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.

À FUNCAP pelo financiamento durante a pesquisa de mestrado.

À CAPES pelo fomento a bolsa de mestrado.

À minha família pelo apoio e incentivo.

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

RESUMO

O *Helicobacter pylori* infecta, aproximadamente, 50% da população mundial, com prevalência variável, essa relacionada com o desenvolvimento econômico do país. Estudos moleculares de *H. pylori* reforçam a hipótese, de que a transmissão da bactéria ocorre no grupo familiar ocorre, principalmente, entre mãe e filho, bem como entre irmãos. Em parentes de primeiro grau de pacientes com câncer gástrico, ocorrem de maneira mais frequente alterações na mucosa gástrica. Considerando a infecção desde a infância é maior o risco de desenvolver câncer gástrico em indivíduos com história familiar de câncer gástrico positiva, a análise do padrão molecular das cepas de *H. pylori* nos familiares apresenta-se como uma importante ferramenta, para determinar o acompanhamento desses indivíduos. Desse modo, este trabalho teve o objetivo de realizar uma análise genômica entre as cepas de *H. pylori* em pacientes com câncer gástrico e em seus familiares. O estudo foi realizado no laboratório de Gastroenterologia da Universidade Federal do Ceará. Foram avaliados 41 indivíduos positivos para *H. pylori*, divididos em 8 famílias com 1 caso de câncer gástrico (caso index) em cada, e 72 indivíduos sem patologias gástricas. O DNA genômico do *H. pylori* foi extraído das biopsias dos indivíduos com câncer, e de seus familiares para identificação dos principais marcadores de virulência, bem como dos indivíduos controle. Em seguida foram obtidos *fingerprints* de DNA por *RAPD-PCR*, posteriormente analisados no software GelJ2.0., determinando a similaridade das cepas. O teste não paramétrico de *Mann Whitney* foi utilizado para comparação das similaridades entre as famílias e a população sem relação familiar. Consideramos estatisticamente diferentes o valor de $p < 0,05$. A similaridade média do conjunto das famílias foi de 18,24% contra 8,12% da população sem relação familiar (72 indivíduos), ($p < 0,001$). A similaridade média de cada família quando comparada a população sem relação familiar foi, significativamente, superior, variando de 10,00 – 44,44% contra 8,12% ($p < 0,05$). Desse modo os resultados desse estudo apontam para a necessidade de acompanhamento próximo dos familiares de indivíduos portadores de câncer gástrico, especialmente os irmãos, devido à alta similaridade das cepas no nicho familiar.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, *RAPD-PCR*, intrafamiliar, câncer gástrico.

ABSTRACT

Helicobacter pylori infects approximately 50% of the world's population, with variable prevalence, this related to the economic development of the country. Molecular studies of *H. pylori* reinforce the hypothesis, that the transmission of the bacteria occurs in the family group occurs mainly between mother and son, as well as between brothers. In first-degree relatives of patients with gastric cancer, occur more frequent changes in the gastric mucosa. Considering the infection since childhood is greater than the risk of developing gastric cancer in individuals with a family history of gastric cancer, the analysis of the molecular pattern of *H. pylori* strains in the family is an important tool to determine the follow-up of those individuals. Thus, this work had the objective of realizing a genomic analysis among the strains of *H. pylori* in patients with gastric cancer and their families. The study was conducted in the laboratory of Gastroenterology of the Federal University of Ceará. 41 individuals were evaluated positive for *h. pylori*, divided into 8 families with 1 case of gastric cancer (index case) in each, and 72 individuals without gastric pathologies. The genomic DNA of *H. pylori* was extracted from the biopsies of patients with cancer, and their families to identify the main virulence markers, as well as of individuals control. Then DNA fingerprints were obtained by *RAPD-PCR*, subsequently analyzed in the software GelJ 2.0., determining the similarity of the strains. The non-parametric Mann Whitney test was used for comparison of the similarities between the families and the population with no family relationship. We considered statistically different the value of $p < 0.05$. The average similarity of all the families was 18.24% versus 8.12% of the population with no family relationship (72 individuals), ($p < 0.001$). The average similarity of each family when compared to population with no family relationship was significantly higher, ranging from 10.00-44.44% versus 8.12% ($p < 0.05$). Thus the results of this study point to the need for close monitoring of the relatives of individuals with gastric cancer, especially the brothers, because of the high similarity of the strains in the family niche.

Keywords: *Helicobacter pylori*, *RAPD-PCR*, intrafamiliar, gastric cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organograma do estudo.....	18
Figura 2 – Famílias analisadas no estudo.	22
Figura 3 – Dendrograma da Família 1.....	24
Figura 4 – <i>Fingerprints</i> de DNA para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 1.	24
Figura 5 – Dendrograma da Família 2.....	25
Figura 6 – <i>Fingerprints</i> de DNA para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 2.	26
Figura 7 – Dendrograma da Família 3.....	27
Figura 8 – <i>Fingerprints</i> de DNA para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 3.	27
Figura 9 – Dendrograma da Família 4.....	28
Figura 10 – <i>Fingerprints</i> de DNA para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 4.	29
Figura 11 – Dendrograma da Família 5.....	30
Figura 12 – <i>Fingerprints</i> de DNA para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 5.	30
Figura 13 – Dendrograma da Família 6.....	32
Figura 14 – <i>Fingerprints</i> de DNA para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 6.	32
Figura 15 – Dendrograma da Família 7.....	33
Figura 16 – <i>Fingerprints</i> de DNA para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 7.	34
Figura 17 – Dendrograma da Família 8.....	35
Figura 18 – <i>Fingerprints</i> de DNA para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 8.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados no estudo de PCR.	20
Tabela 2 – Primers <i>RAPD-PCR</i> utilizados no estudo.	21
Tabela 3 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de <i>H. pylori</i> (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 1.	23
Tabela 4 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de <i>H. pylori</i> (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 2.	25
Tabela 5 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de <i>H. pylori</i> (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 3.	26
Tabela 6 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de <i>H. pylori</i> (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 4.	28
Tabela 7 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de <i>H. pylori</i> (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 5.	29
Tabela 8 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de <i>H. pylori</i> (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 6.	31
Tabela 9 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de <i>H. pylori</i> (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 7.	33
Tabela 10 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de <i>H. pylori</i> (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 8.	34
Tabela 11 – Média de similaridade para 4 marcadores (1254, 1281, 1283, 1290) por família em comparação com o grupo de dispépticos sem relação familiar, e agrupados no grupo familiar em comparação com o grupo de dispépticos.	36
Tabela 12 – Média de similaridade das cepas de <i>H. pylori</i> entre os familiares com o respectivo index na mesma família em 4 níveis de proximidade.	37

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	EPIDEMIOLOGIA DO <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	10
1.2	DOENÇAS ASSOCIADAS AO <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	11
1.3	ESTUDOS NO BRASIL E NO CEARA	12
1.4	INFECÇÃO NA INFANCIA.....	12
1.5	TRANSMISSÃO INTRAFAMILIAR.....	12
1.6	DIVERSIDADE GENÉTICA	13
1.7	HISTÓRIA FAMILIAR E CÂNCER GÁSTICO	14
1.8	RANDOM ANALISYS POLIMORPHISM DNA	14
1.9	JUSTIFICATIVA	15
2	OBJETIVO GERAL	16
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	MATERIAL E METODO	17
3.1	TIPO DO ESTUDO	17
3.2	CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES	17
3.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	17
3.4	CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE PARA O <i>H. PYLORI</i>	18
3.5	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	19
3.6	EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS GÁSTRICAS	19
3.7	GENOTIPAGEM PARA OS GENES <i>UREA, CAGA, VACAS1S2, VACAM1M2, CAGE20</i>	
3.8	<i>RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)</i>	20
3.9	ANÁLISE DO RAPD	21
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4	RESULTADOS	22
4.1	RESULTADOS PARA AS FAMILIAS.....	23
4.1.1	Família 1	23
4.1.2	Família 2	25
4.1.3	Família 3	26
4.1.4	Família 4	28

4.1.5 Família 5	29
4.1.6 Família 6	31
4.1.7 Família 7	32
4.1.8 Família 8	34
4.2 RESULTADOS PARA POPULAÇÃO SEM PARENTESCO	36
4.3 RESULTADOS COMPARADOS ENTRE O GRUPO FAMILIAR E O GRUPO CONTROLE	36
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	42
REFERENCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO *Helicobacter pylori*

O *Helicobacter pylori* infecta, aproximadamente, 50% da população mundial (Hunt *et al.*, 2011). A prevalência dessa infecção é variável, possuindo estrita relação com o desenvolvimento econômico do país analisado (Kauser *et al.*, 2004; Hunt *et al.*, 2011).

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a epidemiologia da infecção pelo *H. pylori* é caracterizada por uma infecção, em geral, nas primeiras décadas de vida, de modo que, aproximadamente, 80% dos infectados, se infectam até os 20 anos de idade (Burucoa e Axon, 2017). Apesar disso, vale destacar que, dentro do mesmo país, a prevalência da infecção varia em subpopulações, especialmente, em relação à idade (Graham *et al.*, 1991; Hunt *et al.*, 2011).

Graham *et al.* (1991) foram um dos primeiros a demonstrar um aumento na prevalência da infecção para cada ano de vida. Esse aumento com a idade pode estar relacionado ao aumento do risco de infecção com o passar dos anos.

Outro estudo, em Minas Gerais, verificou uma prevalência de 34,1% em crianças (Oliveira *et al.*, 1994). No Mato Grosso do Sul, a prevalência foi de 77,5% em crianças e jovens, e de 84,7% em adultos, pertencentes a uma população da área rural (Souto *et al.*, 1998).

Nesse contexto, percebe-se que a prevalência da infecção pelo *H. pylori* esta relacionada com baixas condições socioeconômicas, principalmente, durante a infância, quando o risco de aquisição da infecção é maior (Burucoa e Axon, 2017). Outro fator importante é a quantidade de pessoas que residem na mesma habitação e dividindo o mesmo cômodo (Mitchell *et al.*, 1992; Malaty *et al.*, 1996). Um estudo realizado com gêmeos encontrou como os principais fatores de risco para a aquisição da infecção a densidade das habitações e a baixa renda familiar durante a infância (Malaty *et al.*, 1998).

Dentre os fatores que influenciam a patogenicidade do *H. pylori*, destacam-se a citotoxina associada ao gene A (*CagA*) e a toxina vacuolizante A (*VacA*). A proteína imunorreativa *CagA*, é codificada pelo gene *cagA*, encontrado na maioria das cepas de *H. pylori* (Parsonnet, 1998; Blaser e Berg, 2001; Mégraud, 2001; Suerbaum e Michetti, 2002).

O gene *cagA*, mapeado a partir da ilha de patogenicidade *cagPAI* (conjunto de 29 genes abrangendo 37kb de DNA genômico). Alguns dos genes na região *cagPAI* codificam o aparelho de secreção bacteriano tipo IV, que é capaz de translocar a *CagA* para dentro das células hospedeiras. A fosforilação da *CagA* pode ativar cascatas de sinalização e conseqüentemente influenciar as funções celulares do hospedeiro, incluindo proliferação, apoptose, liberação de citocinas e motilidade celular (Parsonnet, 1998; Blaser e Berg, 2001; Mégraud, 2001; Suerbaum e Michetti, 2002).

Em paralelo, aproximadamente metade das cepas de *H. pylori* produzem *VacA*, que induz vacuolização de células epiteliais e morte celular (Israel e Peek, 2001; Mégraud, 2001; Peek, 2002; Björkholm e Salama, 2003). O gene *vacA* apresenta variações na sequência de sinalização (s1a, s1b, s1c, s2) e nas regiões intermediárias (m1, m2) do gene (Blaser e Berg, 2001; Israel e Peek, 2001; Mégraud, 2001; Peek, 2002).

Cepas do *H. pylori* que possuem o alelo sinal s1 produzem toxina *VacA* funcional, enquanto aquelas cepas que possuem o alelo sinal s2 apresentam baixa capacidade citotóxica (Israel e Peek, 2001; Peek, 2002; Björkholm e Salama, 2003). Nesse sentido, cepas s1m1 são mais tóxicas do que cepas s1m2 e estão associados com formas mais severas de gastrite, atrofia e metaplasia intestinal (Nogueira *et al.*, 2001).

1.2 DOENÇAS ASSOCIADAS AO *Helicobacter pylori*

A infecção por *H. pylori* é um cofator no desenvolvimento de doenças gastrointestinais. O risco de desenvolvimento dessas doenças em pacientes com *H. pylori* varia entre populações. Diversos estudos epidemiológicos associam a infecção por *H. pylori* e o desenvolvimento de câncer gástrico em regiões não cárdicas (Sjomina *et al.*, 2017). Em virtude disso, o *H. pylori* é classificado como carcinogêno pela OMS.

Além disso, em estudos com indivíduos com história familiar de câncer gástrico o desenvolvimento de câncer gástrico se apresenta 10% maior em relação a população com história negativa (Venerito *et al.*, 2017).

Além da infecção por *H. pylori*, que é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do câncer gástrico, a presença de cepas mais patogênicas *cagA*

positivas, fatores ambientais, predisposição genética, história familiar positiva, conferem maior risco para o desenvolvimento de câncer gástrico (Braga *et al.*, 2014)

1.3 ESTUDOS NO BRASIL E NO CEARÁ

Em estudo realizado no Ceará, em uma comunidade urbana de baixa renda, 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). Estudos anteriores relataram que, nos indivíduos acima de 20 anos residentes em comunidade urbana, a prevalência foi em torno de 82% (Braga *et al.*, 1995; Motta *et al.*, 2008).

Outro estudo realizado no Ceará demonstrou, que a infecção pelo *H. pylori* e a presença de cepas *cagA* estão, significativamente, associados ao câncer gástrico, e que esses indivíduos são infectados na infância (Cavalcante *et al.*, 2012).

1.4 INFECÇÃO NA INFANCIA

A infecção pelo *H. pylori* está associada com baixo nível socioeconômico, grande concentração de pessoas por residência, maus hábitos alimentares e falta de higiene pessoal, sendo geralmente adquirida na infância (Sarker *et al.*, 1997).

A transmissão ocorre, principalmente, de indivíduo para indivíduo, por via oral-oral e fecal-oral, principalmente, durante a infância (Tindberg *et al.*, 2001). A infecção também pode ser oriunda da água e da comida contaminadas (Hopkins *et al.*, 1993).

Desse modo, a maioria das pessoas nos países em desenvolvimento tornou-se cronicamente infectados pelo *H. pylori* desde a infância (Rodrigues *et al.*, 2004) podendo ser reinfectadas posteriormente. Estudos em comunidades pobres do Peru, avaliando o percentual de adultos infectados, encontrou uma taxa em torno de 20% de reinfecção por pessoa por ano (Soto *et al.*, 2003). Esta taxa de reinfecção é muito maior do que a observada em estudos clínicos equivalentes em nações industrializadas (< 1% por pessoa por ano) (Soto *et al.*, 2003).

1.5 TRANSMISSÃO INTRAFAMILIAR

Estudos moleculares de DNA das cepas de *H. pylori* em grupos familiares obtido por biópsia gástrica (Roma-Giannikou *et al.*, 2003), aspirado gástrico (enteroteste) (Konno *et al.*, 2005) ou fezes reforçam essa hipótese, de transmissão da bactéria no grupo familiar (Kivi *et al.*, 2003; Konno *et al.*, 2005). Nesse sentido, destaca-se, principalmente, a transmissão entre mãe e filho e entre irmãos (Goodman e Correa, 2000; Tindberg *et al.*, 2001).

O destaque para o papel materno na transmissão se dá principalmente pelo fato de, em alguns países, onde por razões culturais o contato paterno com os filhos é, significativamente, menor, a infecção seria transmitida, principalmente pelas mães (Malaty *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2004).

Alguns estudos avaliam a transmissão do *H. pylori* entre irmãos e demonstram a relevância desses na infecção, contudo esses estudos não consideraram o status infeccioso materno na cadeia de transmissão (Goodman e Correa, 2000; Weyermann *et al.*, 2009).

Ademais, poucos estudos com irmãos avaliaram a ordem de nascimento e a infecção pela bactéria. Em princípio, crianças mais velhas seriam responsáveis por transmitir a infecção para os mais novos. Esse achado pode variar em diferentes populações (Goodman e Correa, 2000).

1.6 DIVERSIDADE GENÉTICA

Existe uma importante diversidade genética nas diversas cepas de *H. pylori*, demonstrada em isolados clínicos obtidos de diferentes pacientes (Thorell *et al.*, 2017). Nesse sentido, estudos baseados nas sequências genômicas de duas cepas de *H. pylori* (26695 e J99) revelaram que 22% dos genes não são essenciais e aproximadamente 6% são únicos a cada linhagem (Björkholm *et al.*, 2001). Além disso, é notável a variação na sequência de alguns genes ou regiões, como a ilha de patogenicidade *cagPAI* (Guillemin *et al.*, 2002) e genes de resistência a drogas (Ribeiro *et al.*, 2004).

1.7 HISTÓRIA FAMILIAR E CÂNCER GÁSTRICO

Nesse sentido, o câncer de estômago é o segundo mais frequente nas regiões Norte e Nordeste em homens e o quarto mais frequente na Norte em mulheres (INCA, 2016).

Muitos cânceres gástricos são esporádicos ou por vezes se desenvolvem devido à concomitância com a infecção com *H. pylori*, no entanto, em estudos com familiares o desenvolvimento do câncer gástrico em familiares se apresenta em torno de 10% maior (Garziera *et al.*, 2013).

A literatura sugere uma predisposição genética entre história familiar positiva e o desenvolvimento de câncer gástrico de 10-20% dos casos (Zanghieri *et al.*, 1990; La Vecchia *et al.*, 1992). Relacionando esse dado a um risco três vezes maior de desenvolvimento de câncer gástrico em parentes de primeiro grau (Lissowska *et al.*, 1999). Quando soma-se à equação a infecção do *H. pylori* este aumenta acima de 6 vezes (Hansen *et al.*, 1999; Brenner, Bode, *et al.*, 2000).

Em parentes de primeiro grau de pacientes com câncer gástrico, ocorrem de maneira mais frequente alterações na mucosa gástrica. Tal fato justifica o maior risco de desenvolver câncer gástrico em virtude da maior prevalência de lesões precursoras do câncer, relacionadas à presença do patógeno *Helicobacter pylori*. (El-Omar *et al.*, 2000). A infecção do *H. pylori* é alta em familiares, especialmente mãe e irmãos (Brenner, Arndt, *et al.*, 2000). Além disso, os familiares têm maiores chances de adquirir cepas virulentas ainda na infância (Parsonnet, 2000).

Motta *et al.* (2008) encontraram uma maior prevalência de lesões precursoras de câncer gástrico nos familiares quando comparado aos controles, ratificando os familiares como um grupo de risco.

1.8 RANDOM ANALISYS POLIMORPHISM DNA (RAPD-PCR)

Considerando a diversidade e variação genética, as técnicas de genotipagem bacteriana e o estudo de marcadores genéticos são importantes objetos de estudos epidemiológicos, patogênicos e de resistência bacteriana. Duas técnicas de genotipagem, que utilizam a técnica de PCR, têm se mostrado importantes no estudo de genes do *H. pylori* são “restriction fragmente length polymorphisms” (RFLP), “random amplified polymorphic DNA” (RAPD) (Burucoa *et al.*, 1999).

Considerando a infecção por *H. pylori* desde a infância e que em estudos prévios familiares de câncer têm maior risco de desenvolver câncer gástrico (Herrera *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 2008) a análise de padrão molecular das cepas de *H. pylori* nos familiares de primeiro grau de câncer gástrico apresenta-se como uma importante ferramenta para o acompanhamento desse indivíduos.

1.9 JUSTIFICATIVA

A maioria dos estudos avaliando a transmissão do *H. pylori* no grupo familiar através da análise da similaridade de cepas de *H. pylori* foram realizados em crianças (Schwarz *et al.*, 2008), e uma vez que se postula que a infecção é adquirida na Infância, e quando não tratada, permanece por toda a vida, consideramos importante avaliar o padrão de similaridade de cepas adultos. Essa investigação se torna mais importante ao avaliar familiares de indivíduos com câncer gástrico, uma vez que estudos prévios realizados pelo nosso grupo demonstram que esses pacientes quando comparados com controle apresentam maior risco de desenvolver câncer gástrico, maior prevalência de lesões precursoras de câncer associadas à presença de *H.pylori*, bem como cepas mais virulentas da bactéria. Além disso, o risco maior de desenvolver câncer gástrico pode ser decorrente da interação entre a genética do indivíduo com a infecção do *H. pylori* que deve ter sido adquirida no grupo familiar. Dessa forma, o presente estudo poderá trazer informações para melhor embasamento dessa hipótese.

2 OBJETIVO GERAL

- Avaliar através de análise genômica a similaridade entre as cepas de *Helicobacter pylori* encontradas nos pacientes portadores de câncer gástrico e em seus familiares de primeiro grau.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a similaridade das cepas de *H. pylori* em indivíduos da mesma família;
- Estudar a similaridade da cepa de *H. pylori* do paciente portador de câncer com a relação de parentesco dentro da mesma família;
- Estudar a similaridade das cepas de *H. pylori* entre indivíduos sem parentesco;
- Estudar a similaridade das cepas *H. pylori* entre grupos de indivíduos com e sem parentesco.

3 MATERIAL E METODO

3.1 TIPO DO ESTUDO

Estudo prospectivo observacional, transversal, analítico.

3.2 CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES

O presente estudo foi realizado no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) da Universidade Federal do Ceará, e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEPE – desse Hospital.

Todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre esclarecido. Foi aplicado questionário padronizado onde foram avaliados vários aspectos epidemiológicos.

Os participantes foram atendidos no ambulatório de Gastroenterologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC.

Todos os participantes após o atendimento clínico foram submetidos a endoscopia na qual foram colhidos fragmentos da mucosa gástrica. Esses fragmentos foram extraídos da pequena curvatura do antro e na grande curvatura do corpo gástrico para PCR e teste da urease pré-formada.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo indivíduos com idade mínima de 18 anos, portadores de câncer gástrico distal confirmado através de exame histopatológico, familiares de primeiro grau de câncer e dispépticos que iam se submeter à endoscopia digestiva alta.

O organograma dos indivíduos incluídos no trabalho encontra-se descrito na figura 1.

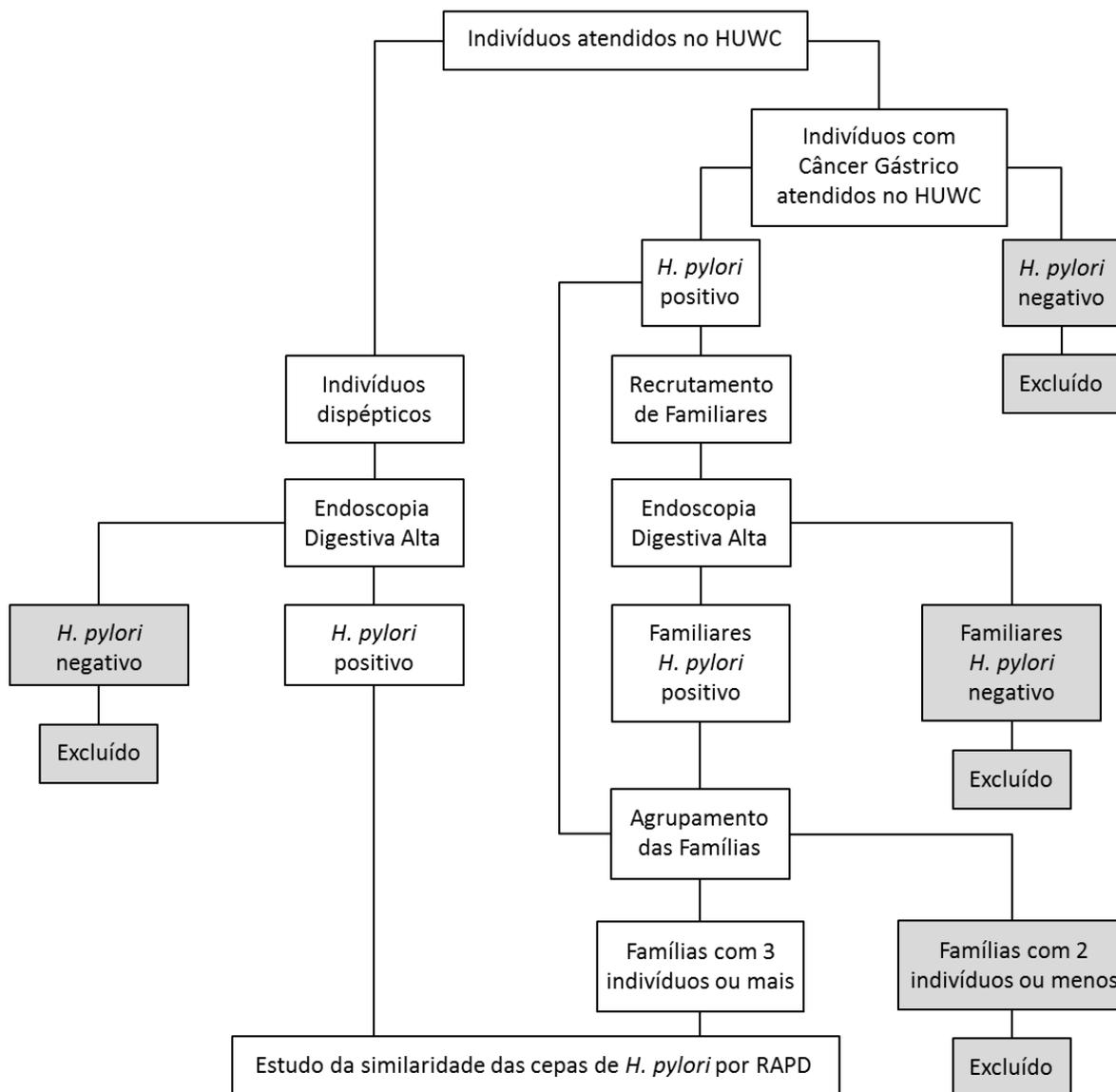


Figura 1 – Organograma do estudo.

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

3.4 CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE PARA O *H. pylori*

Os participantes foram considerados *H. pylori* positivos pelo teste da urease pré-formada e pelo PCR para o gene ureA.

3.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

O diagnóstico de câncer foi confirmado por análise histopatológica realizada pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC utilizando os parâmetros determinados por meio da metodologia de Lauren.

3.6 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS GÁSTRICAS

As biópsias dos pacientes e de seus familiares foram coletadas, anteriormente, pelo laboratório de gastroenterologia da Universidade Federal do Ceará.

Para a extração do DNA as amostras foram transportadas ao laboratório de Gastroenterologia e armazenadas em freezer -70°C , para posterior realização dos protocolos moleculares.

A extração do DNA do *H. pylori* das amostras de tecido gástrico colhidas dos indivíduos estudados, procedeu a partir da maceração dos fragmentos de biópsia gástrica. O material genômico foi extraído utilizando QIAamp DNA mini kit (QIAGEN®, Hilden, Alemanha), conforme orientação do fabricante.

Foi realizada a digestão do material tecidual, na qual as amostras foram colocadas em tubos de 2 mL, com 180 μL de tampão ATL e 20 μL de Proteinase K, e submetidos a 56°C em banho-maria por vinte e quatro horas. Após a digestão, foram adicionados 200 μL de tampão AL, e incubados novamente a 70°C em banho-maria, por dez minutos. Em seguida, foi adicionado 200 μL 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 descartado, em seguida adicionou-se 500 μL de tampão AW1 (QIAGEN®), feita eluição por centrifugação a 8.000 rpm por um minuto. Em seguida, foram colocados 500 μL de tampão AW2 (QIAGEN®), com centrifugação a 14.000 rpm por três minutos.

Por fim, adicionou-se 200 μL de tampão AE, centrifugando-se 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 processamento.

3.7 GENOTIPAGEM PARA OS GENES *ureA*, *cagA*, *vacAs1s2*, *vacAm1m2*, *cagE*

O DNA genômico de *H. pylori* foi submetido a amplificação para os principais marcadores de virulência de *H. pylori*, Tabela 1.

A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25µL contendo 1µL tampão, MgCl₂ 1,5 mM, 200µM cada um dos quatro desoxinucleotideo trifosfato, 0,2µM, sendo cada um dos iniciadores, 1 µL de Taq polimerase (EUROBIO), e 3µL do DNA extraído. A amplificação do DNA foi realizada em um termociclador iCycler BioRad (California, USA) Nas condições da **Tabela1**.

Tabela 1 – Primers utilizados no estudo de PCR.

Primer	Sequência 5' - 3'	Amp.	Referência
<i>ureA</i>	F GCCAATGGTAAATTAGTT	411	(Clayton <i>et al.</i> , 1992)
	R CTCCTTAATTGTTTTTAC		
<i>cagA</i>	F ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGGGA	298	(Covacci e Rappuoli, 1996)
	R TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT		
<i>cagE</i>	F TTGAAAACCTTCAAGGATAGGATAGAGC	498	(Sozzi <i>et al.</i> , 2005)
	R GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC		
<i>vacAs1</i>	F ATGGAAATACAACAAACACAC	259	(Atherton <i>et al.</i> , 1995)
	R CTGCTTGAATGCGCCAAAC		
<i>vacAs2</i>	F ATGGAAATACAACAAACACAC	286	(Atherton <i>et al.</i> , 1995)
	R CTGCTTGAATGCGCCAAAC		
<i>vacAm1</i>	F GTAATGGTGGTTTCAACACC	630	(Atherton <i>et al.</i> , 1999)
	R TAATGAGATCTTGAGCGCT		
<i>vacAm2</i>	F GGAGCCCCAGGAAACATTG	352	(Atherton <i>et al.</i> , 1995)
	R CATAACTAGCGCCTTGAC		

3.8 RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD-PCR)

Para a busca de parentesco genético entre as cepas e *H. pylori* extraídas dos indivíduos com câncer gástrico (Index) e de seus familiares (irmãos – FCI, e filhos – FCF), foi realizado o protocolo de *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR)*, que consiste em uma técnica de PCR para análises filogenéticas de regiões conservadas do DNA, na qual as amostras diagnosticadas como *H. pylori* positivas

pelo PCR (*ureA* positivas) foram amplificadas para os iniciadores que flanqueiam regiões conservadas nesse microrganismo. **Tabela 2.**

Tabela 2 – Primers *RAPD-PCR* utilizados no estudo.

Iniciador	Sequência 5' à 3'	Condições de PCR	Referência
1254	CCGCAGCCAA	40 Ciclos:	(Akopyanz <i>et al.</i> , 1992)
1281	AACGCGCAAC	94°C/1min;	
1283	GCGATCCCCA	36°C/1,3min;	
1290	GTGGATGCGA	72°C/1 min	

3.9 ANÁLISE DO *RAPD-PCR*

A comparação de padrões de bandas *RAPD-PCR* foi realizada utilizando o software GelJ v.2.0. (Heras *et al.*, 2015), para determinação da similaridade das cepas, com determinação da similaridade individual e familiar para os 4 marcadores. Para a análise de *RAPD-PCR*, foram incluídas apenas as bandas reprodutíveis detectadas software. A análise de similaridade de resultados foi calculada usando o coeficiente *Dice* e o método com média aritmética (*UPGMA*), essa metodologia utiliza médias aritméticas simples entre os elementos mais similares entre si e partem para os menos similares, construindo dessa forma uma árvore filogenética de similaridade entre grupos.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o SPSS para Windows, versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, Illinois. Utilizando o teste não paramétrico *Mann-Whitney* para comparação das similaridades individuais entre as famílias e a população geral. Considerando estatisticamente diferentes os dados com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Foram recrutadas 14 famílias, no entanto de acordo com os critérios de exclusão o estudo ficou restrito a 8 famílias. Nessa condição, foram estudados 8 indivíduos com câncer (7 homens e 1 mulher com média de idade de $58,88 \pm 14,52$ anos), a partir dos quais se recrutaram os respectivos familiares, totalizando 33 familiares (18 homens e 15 mulheres com média de idade de $41,12 \pm 9,28$ anos), sendo incluídos irmãos e filhos no estudo. O detalhamento das famílias encontra-se disposto na figura 2.

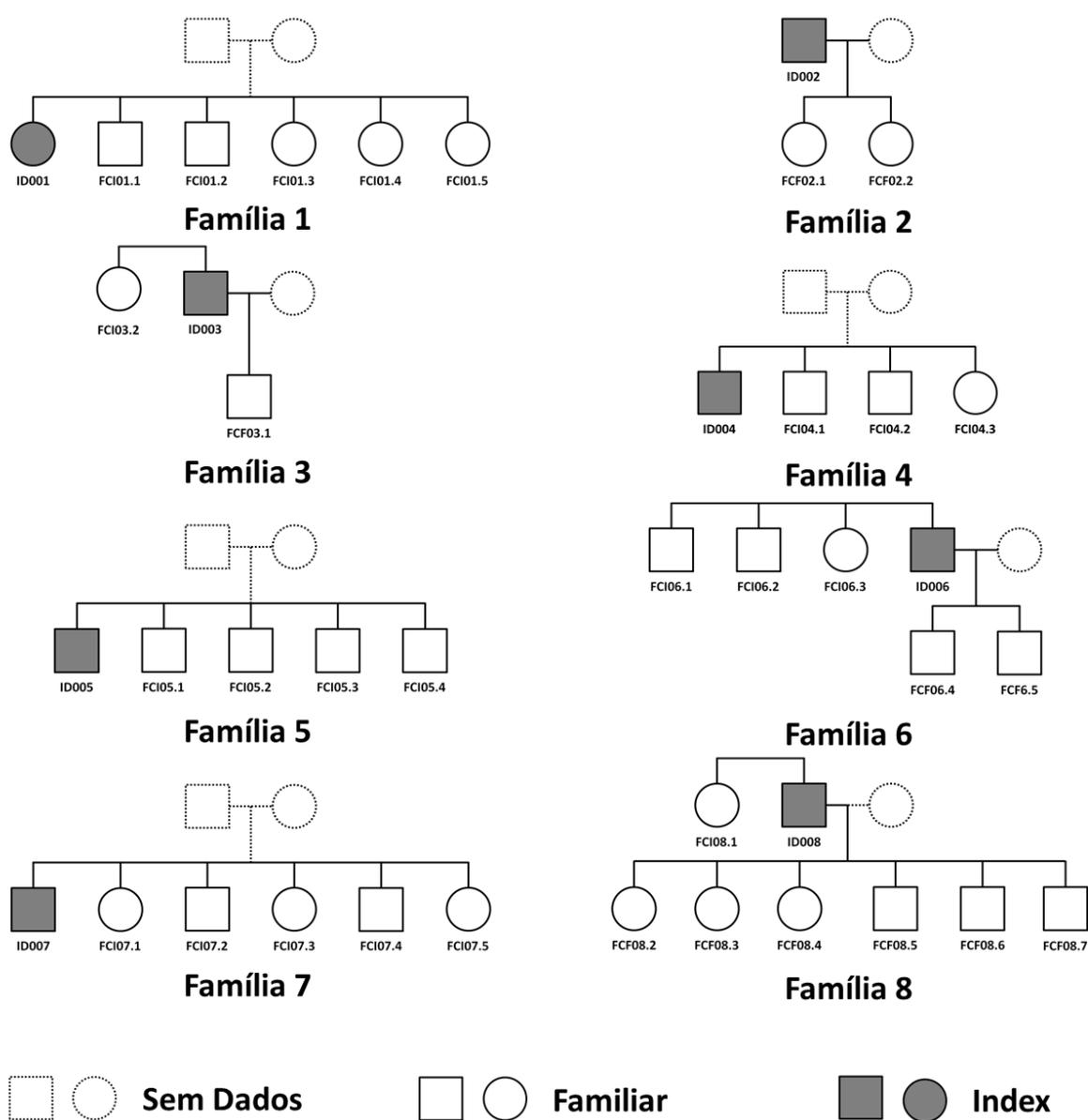


Figura 2 – Famílias analisadas no estudo.

A partir das cepas de *H. pylori* obtidas na endoscopia realizou-se os *fingerprints* de DNA, obtendo as similaridade das cepas de *H. pylori* dentro das famílias, foram consideradas as relações de parentesco entre irmãos de indivíduos com câncer e filhos de indivíduos com câncer, expostas a seguir.

Além disso, analisou-se 72 indivíduos sem parentesco entre si (27 homens e 41 mulheres com média de idade de $46 \pm 14,96$ anos) para análise da relação de similaridade em uma população, sendo esses considerados indivíduos controles.

4.1 RESULTADOS PARA AS FAMILIAS

4.1.1 Família 1

Da análise de similaridade entre amostras de *H. pylori* obtidas dos indivíduos da família 1 para os marcadores 1251, 1281, 1283, 1290, verificou-se uma similaridade moderada entre irmãos superior a 30%, de maneira tal que a cepa de *H. pylori* obtida do indivíduo com câncer (ID001) teve similaridade moderada de 39,17% com seu irmão (FCI01.1), e outro par de irmãos (FCI01.4 e FCI01.5) também apresentou a mesma similaridade de 39,17%, de modo semelhante um terceiro par de irmãos (FCI01.1 e FCI01.2) apresentou-se levemente menor de 32,73%. (Tabela 3)

Tabela 3 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de *H. pylori* (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 1.

	ID001	FCI01.1	FCI01.2	FCI01.3	FCI01.4	FCI01.5
ID001	-	39,17%	11,11%	11,11%	10,00%	12,50%
FCI01.1	-	-	4,55%	32,73%	16,67%	15,00%
FCI01.2	-	-	-	5,00%	14,55%	15,56%
FCI01.3	-	-	-	-	20,78%	16,67%
FCI01.4	-	-	-	-	-	39,17%
FCI01.5	-	-	-	-	-	-

A partir dos dados de similaridade para os quatro marcadores (1254, 1281, 1283, 1290) foi construído o dendrograma de proximidade entre as cepas de *H.*

pylori analisadas na família 1, destacando a moderada similaridade entre as cepas dessa família. (Figura 3).

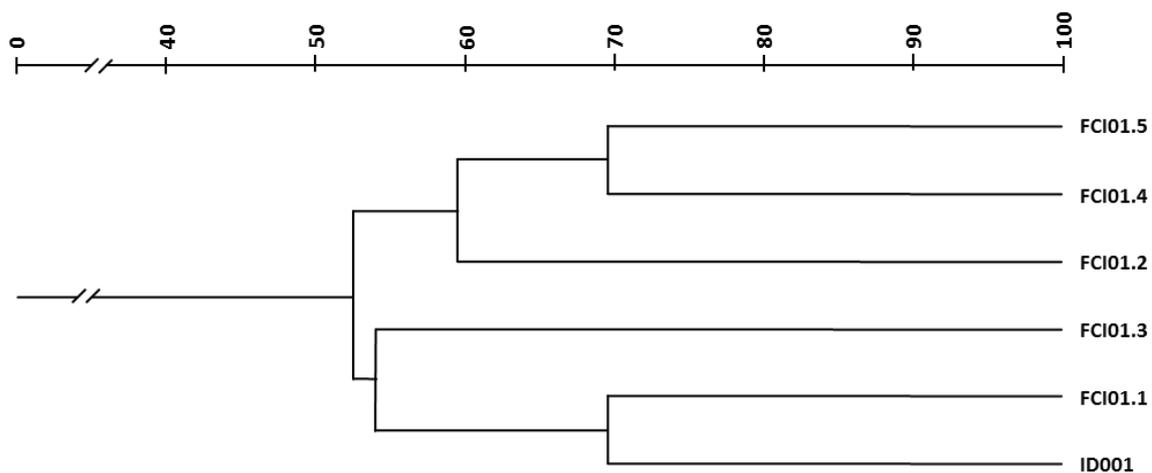


Figura 3 – Dendrograma para *H. pylori* obtido a partir de 4 marcadores de *fingerprint* (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 1.

Os dados para a obtenção da similaridade da família 1 foram obtidos a partir da análise dos *fingerprints* de DNA de *H. pylori* para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290, conforme abaixo na figura 4.

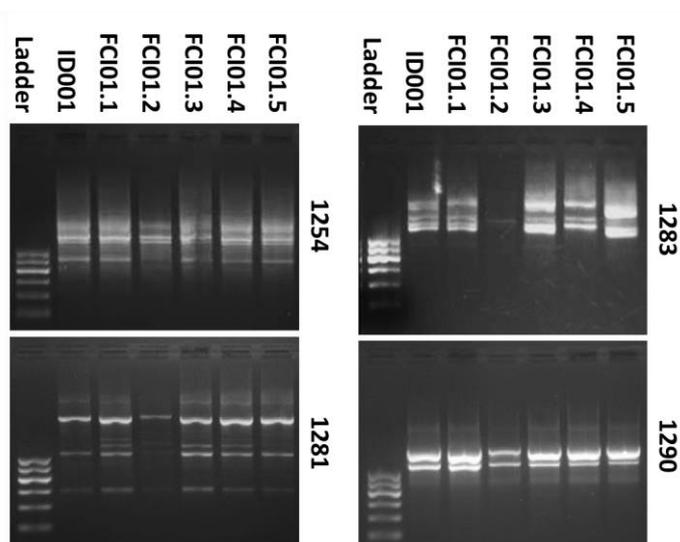


Figura 4 – *Fingerprints* de DNA de *H. pylori* para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 1.

4.1.2 Família 2

Da análise de similaridade entre as cepas dos indivíduos da família 2 verificou-se uma similaridade moderada entre irmãos e entre filhos-pai superior a 41%, de maneira tal que a cepa de *H. pylori* obtida do indivíduo com câncer (ID002) teve similaridade de 41,67% com uma das filhas (FCF02.1) e de 45,83% com a outra filha (FCF02.2). Entre as irmãs a similaridade também se apresentou moderada na ordem de 45,8%. (Tabela 4)

Tabela 4 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de *H. pylori* (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 2.

	ID002	FCF02.1	FCF02.2
ID002	-	41,67%	45,83%
FCF02.1	-	-	45,83%
FCF02.2	-	-	-

A partir dos dados de similaridade foi construído o dendrograma de proximidade entre as cepas de *H. pylori* analisadas na família 2, destacando a moderada similaridade entre as cepas dessa família. (Figura 5). Destaca-se a moderada similaridade entre as cepas do index ID002 e seus filhos FCF02.1 e FCF01.1.

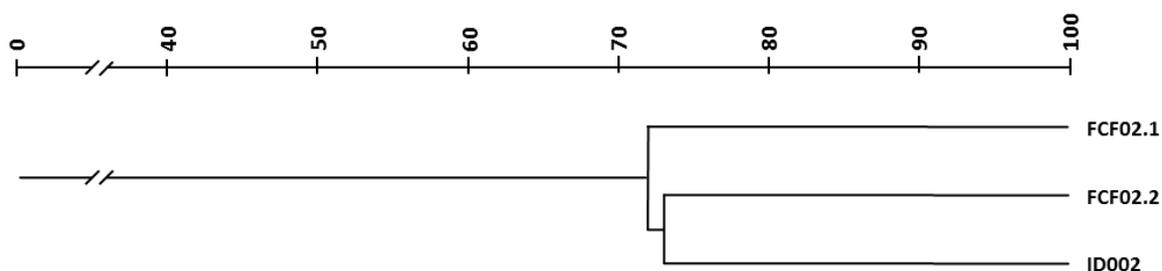


Figura 5 – Dendrograma para *H. pylori* obtido a partir de 4 marcadores de fingerprint (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 2.

Os dados para a obtenção da similaridade da família 2 foram obtidos a partir da análise dos *fingerprints* de DNA de *H. pylori* para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290, conforme abaixo na figura 6.

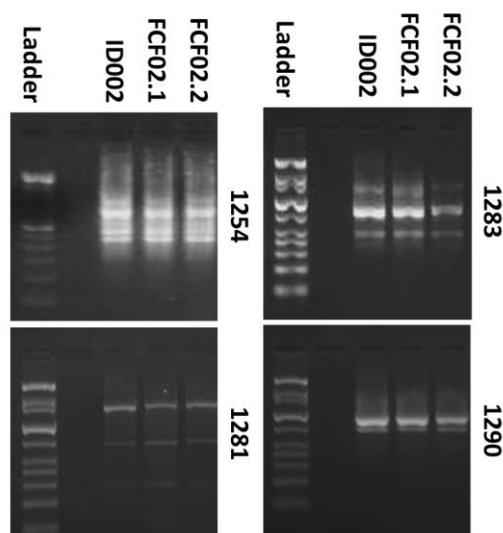


Figura 6 – *Fingerprints* de DNA de *H. pylori* para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 2.

4.1.3 Família 3

Da análise de similaridade entre as cepas de *H. pylori* dos indivíduos da família 3 verificou-se uma similaridade fraca entre irmãos e entre o filho e o pai inferior a 15%, de maneira tal que a cepa de *H. pylori* obtida do indivíduo com câncer (ID003) teve similaridade de 12,50% com a irmã (FCI03.1) e de 10,00% com o filho (FCF03.2). Entre a tia (FCI03.1) e o sobrinho (FCF03.2) a similaridade foi fraca na ordem de 12,50%. (Tabela 5)

Tabela 5 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de *H. pylori* (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 3.

	ID003	FCI03.1	FCF03.2
ID003	-	12,50%	10,00%
FCI03.1	-	-	12,50%
FCF03.2	-	-	-

A partir dos dados de similaridade foi construído o dendrograma de proximidade entre as cepas de *H. pylori* analisadas na família 3, destacando a fraca similaridade entre as cepas dessa família. (Figura 7).

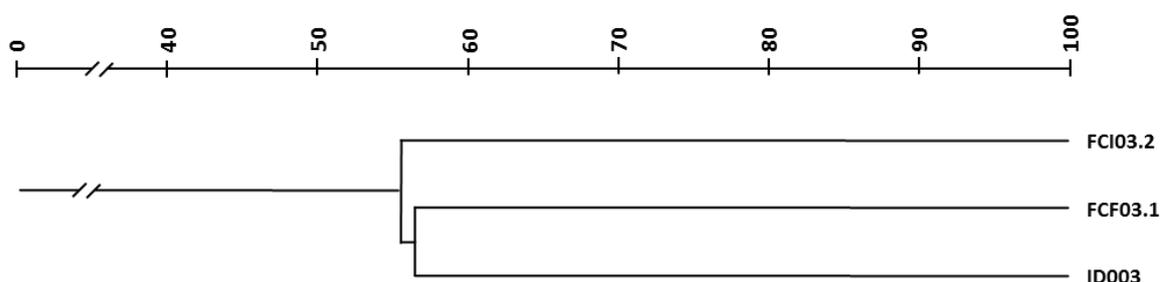


Figura 7 – Dendrograma para *H. pylori* obtido a partir de 4 marcadores de fingerprint (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 3.

Os dados para a obtenção da similaridade da família 3 foram obtidos a partir da análise dos *fingerprints* de DNA para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290, conforme abaixo na figura 8.

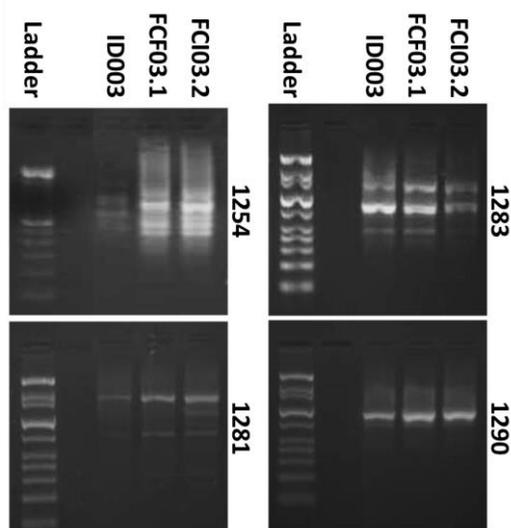


Figura 8 – *Fingerprints* de DNA de *H. pylori* para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 3.

4.1.4 Família 4

Da análise de similaridade entre as cepas de *H. pylori* dos indivíduos da família 4 verificou-se uma similaridade fraca entre irmãos inferior a 25%, de maneira tal que a cepa de *H. pylori* obtida do indivíduo com câncer (ID004) teve similaridade de 20,83% com o irmão (FCI04.1), de 15,56% com o irmão (FCI03.2) e de 5,56% com a irmã (FCI04.3). Entretanto, verificou-se uma elevação na similaridade ao analisar os irmãos FCI04.1 e FCI04.3 que apresentaram similaridade de 30,56%. (Tabela 5).

Tabela 6 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de *H. pylori* (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 4.

	ID004	FCI04.1	FCI04.2	FCI04.3
ID004	-	20,83%	15,56%	5,56%
FCI04.1	-	-	15,56%	30,56%
FCI04.2	-	-	-	17,50%
FCI04.3	-	-	-	-

A partir dos dados de similaridade foi construído o dendrograma de proximidade entre as cepas de *H. pylori* analisadas na família 4, destacando a maior similaridade entre os irmãos FCI04.1 e FCI04.3. (Figura 9).

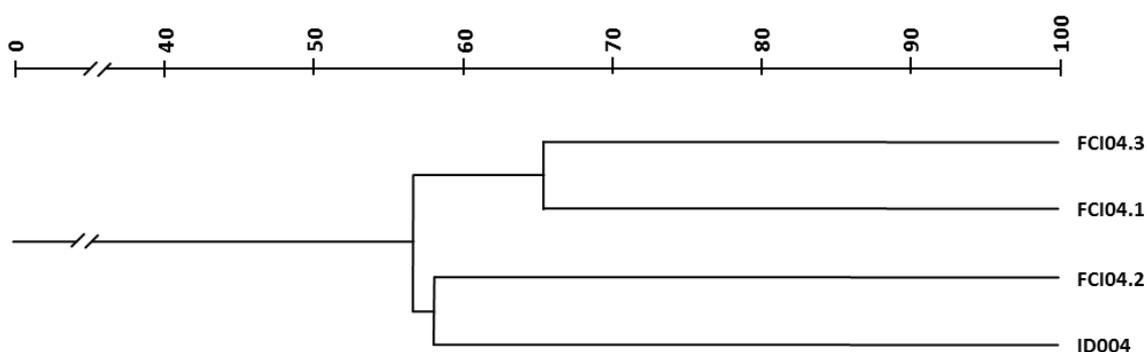


Figura 9 – Dendrograma para *H. pylori* obtido a partir de 4 marcadores de fingerprint (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 4.

Os dados para a obtenção da similaridade da família 4 foram obtidos a partir da análise dos *fingerprints* de DNA para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290, conforme abaixo na figura 10.

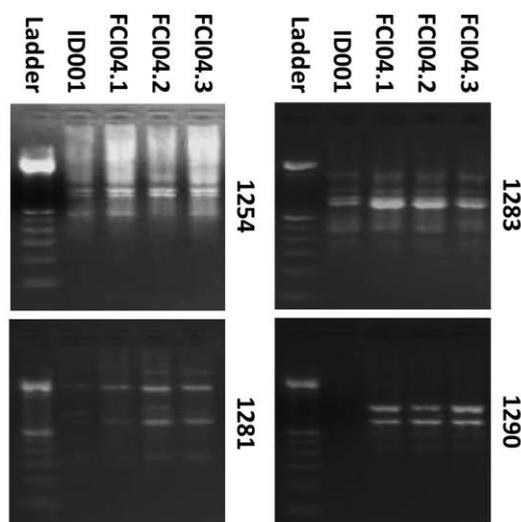


Figura 10 – *Fingerprints* de DNA de *H. pylori* para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 4.

4.1.5 Família 5

Da análise de similaridade entre as cepas de *H. pylori* dos indivíduos da família 5 verificou-se uma similaridade fraca entre irmãos inferior a 25%, de maneira tal que a cepa de *H. pylori* obtida do indivíduo com câncer (ID005) teve similaridade de 25,00% com o irmão (FCI05.1) e o irmão (FCI05.2), de 12,00% com o irmão (FCI05.3) e não apresentou similaridade com último irmão (FCI05.4). Entretanto, verificou-se uma elevação na similaridade ao analisar os irmão FCI05.2 e FCI05.3 que apresentaram similaridade moderada de 37,50%. (Tabela 7).

Tabela 7 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de *H. pylori* (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 5.

	ID005	FCI05.1	FCI05.2	FCI05.3	FCI05.4
ID005	-	25,00%	25,00%	12,50%	0,00%
FCI05.1	-	-	25,00%	0,00%	8,33%
FCI05.2	-	-	-	37,50%	0,00%
FCI05.3	-	-	-	-	3,57%
FCI05.4	-	-	-	-	-

A partir dos dados de similaridade foi construído o dendrograma de proximidade entre as cepas de *H. pylori* analisadas na família 5, destacando a similaridade moderada entre os irmãos FCI05.2 e FCI05.3. (Figura 11).

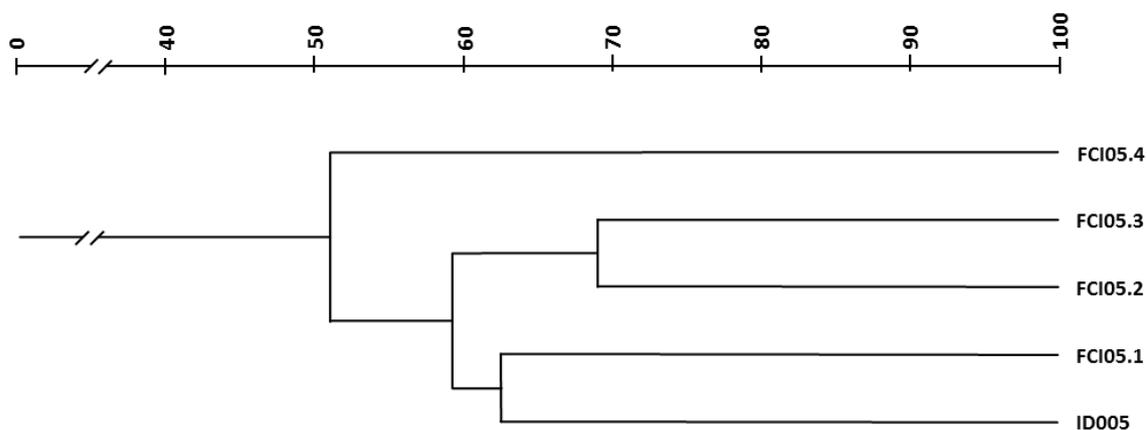


Figura 11 – Dendrograma para *H. pylori* obtido a partir de 4 marcadores de fingerprint (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 5.

Os dados para a obtenção da similaridade da família 5 foram obtidos a partir da análise dos *fingerprints* de DNA para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290, conforme abaixo na figura 12.

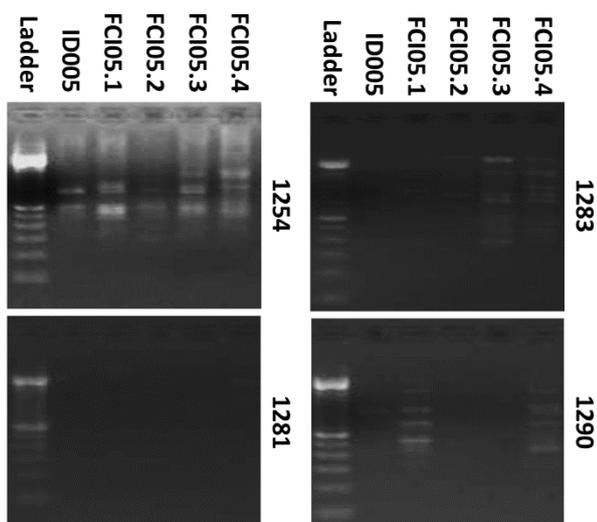


Figura 12 – *Fingerprints* de DNA de *H. pylori* para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 5.

4.1.6 Família 6

Da análise de similaridade entre as cepas *H. pylori* dos indivíduos da família 6 verificou-se uma similaridade fraca entre irmãos inferior a 25%, de maneira tal que a cepa de *H. pylori* obtida do indivíduo com câncer (ID006) teve similaridade de 12,50% com os filhos (FCF06.4 e FCF06.5), de 14,58% com o irmão (FCI06.2), e de 37,50% com a irmã (FCI06.3). Não houve similaridade da cepa de um dos irmãos (FCI06.1) nem com o index (ID006) e a irmã (FCI06.3). Ao analisar a similaridade entre os os irmãos FCF06.4 e FCF 06.5 verificou-se uma similaridade de 18,75%. (Tabela 8).

Tabela 8 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de *H. pylori* (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 6.

	ID006	FCF06.4	FCF06.5	FCI06.1	FCI06.2	FCI06.3
ID006	-	12,50%	12,50%	0,00%	14,58%	37,50%
FCF06.4	-	-	18,75%	6,25%	6,25%	0,00%
FCF06.5	-	-	-	6,25%	6,25%	6,25%
FCI06.1	-	-	-	-	20,00%	0,00%
FCI06.2	-	-	-	-	-	14,58%
FCI06.3	-	-	-	-	-	-

A partir dos dados de similaridade foi construído o dendrograma de proximidade entre as cepas de *H. pylori* analisadas na família 6, destacando a similaridade moderada entre os irmãos ID006 e FCI06.3. (Figura 13).

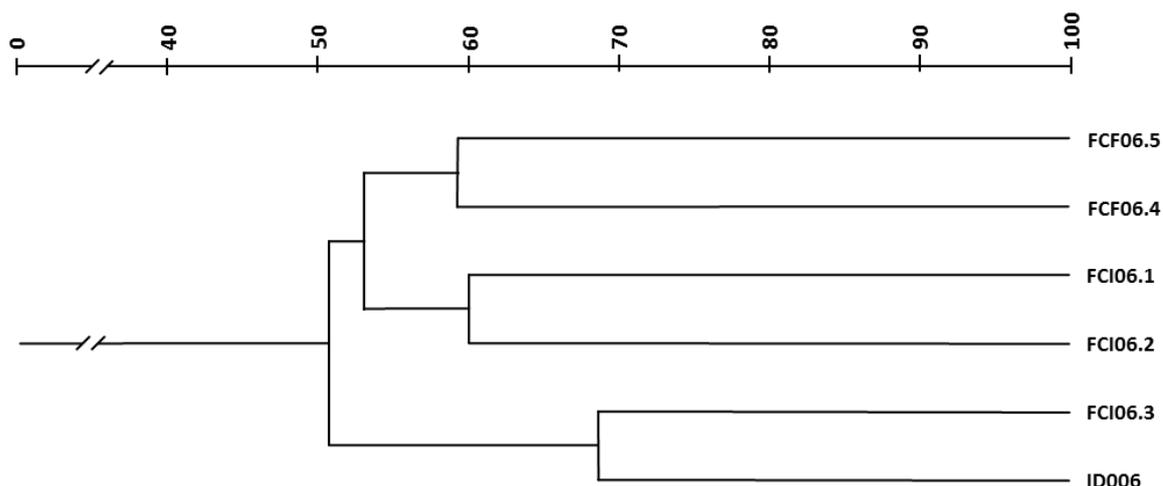


Figura 13 – Dendrograma para *H. pylori* obtido a partir de 4 marcadores de fingerprint (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 6.

Os dados para a obtenção da similaridade da família 6 foram obtidos a partir da análise dos *fingerprints* de DNA para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290, conforme abaixo na figura 14.

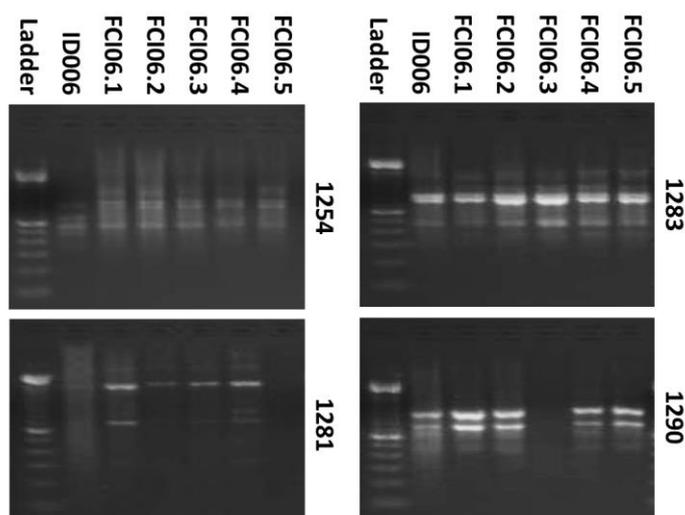


Figura 14 – *Fingerprints* de DNA de *H. pylori* para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 6.

4.1.7 Família 7

Da análise de similaridade entre as cepas dos indivíduos da família 6 verificou-se uma similaridade alta entre irmãos de 50%. Apesar disso, a cepa de *H. pylori* obtida do indivíduo com câncer (ID007) e de uma irmã (FCI07.5) não

apresentaram similaridade com nenhum dos irmãos. Entretanto, 4 irmãos (FCI07.1, FCI07.2, FCI07.3, FCI07.4) tiveram similaridade de 50,00% entre si, conforme a (Tabela 9).

Tabela 9 – Média de similaridade para quatro marcadores de polimorfismo de *H. pylori* (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 7.

	ID007	FCI07.1	FCI07.2	FCI07.3	FCI07.4	FCI07.5
ID007	-	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
FCI07.1	-	-	50,00%	50,00%	50,00%	0,00%
FCI07.2	-	-	-	50,00%	50,00%	0,00%
FCI07.3	-	-	-	-	50,00%	0,00%
FCI07.4	-	-	-	-	-	0,00%
FCI07.5	-	-	-	-	-	-

A partir dos dados de similaridade foi construído o dendrograma de proximidade entre as cepas de *H. pylori* analisadas na família 7. (Figura 15).

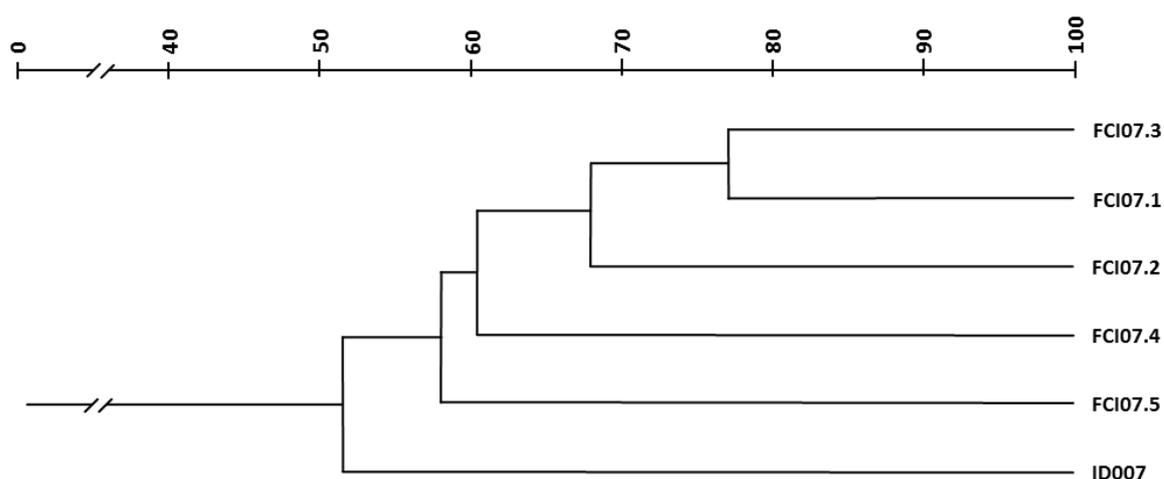


Figura 15 – Dendrograma para *H. pylori* obtido a partir de 4 marcadores de fingerprint (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 7.

Os dados para a obtenção da similaridade da família 7 foram obtidos a partir da análise dos *fingerprints* de DNA para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290, conforme abaixo na figura 16.

A partir dos dados de similaridade foi construído o dendrograma de proximidade entre as cepas de *H. pylori* analisadas na família 8. (Figura 16).

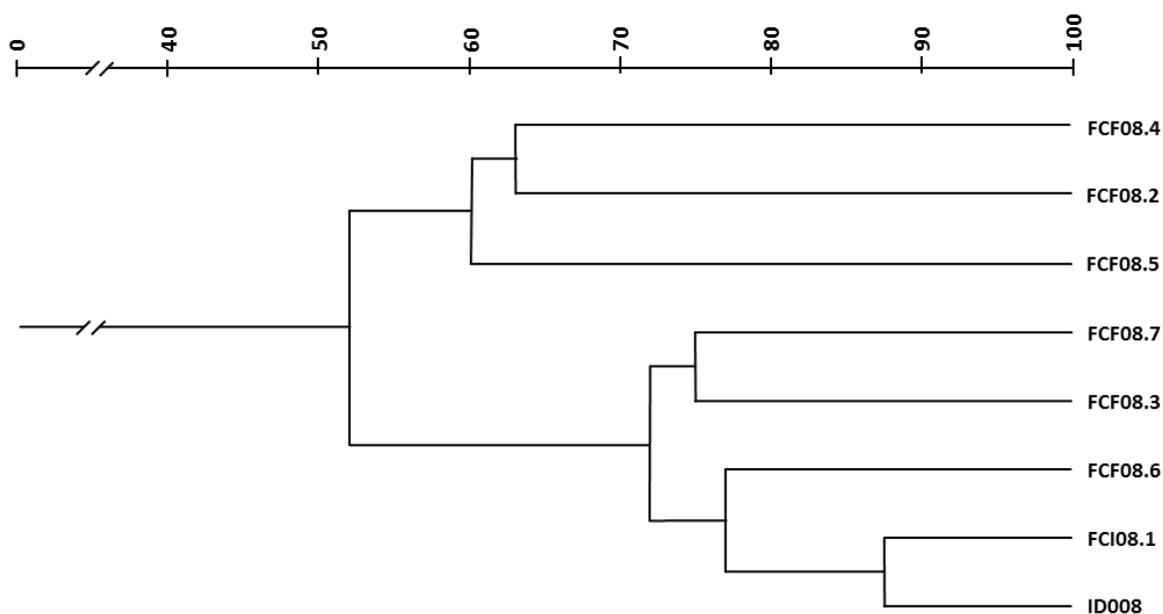


Figura 17 – Dendrograma para *H. pylori* obtido a partir de 4 marcadores de *fingerprint* (1254, 1281, 1283, 1290) na Família 8.

Os dados para a obtenção da similaridade da família 8 foram obtidos a partir da análise dos *fingerprints* de DNA para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290, conforme abaixo na figura 18.

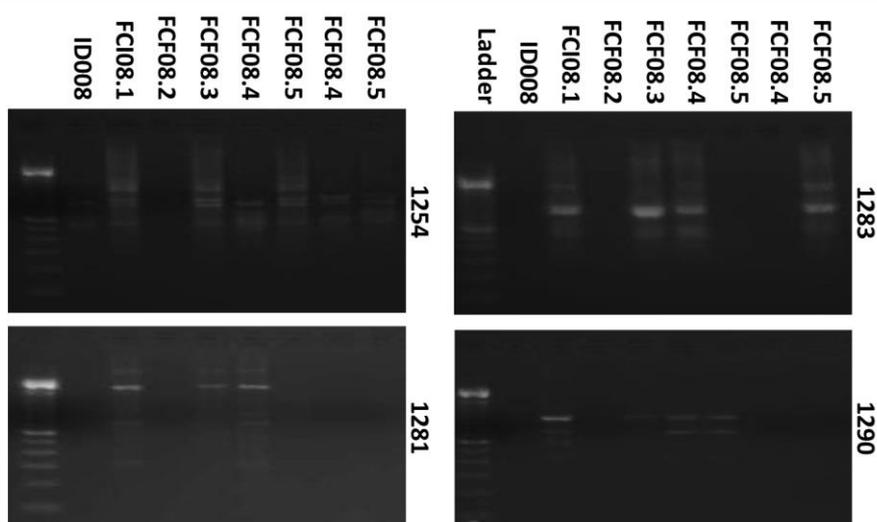


Figura 18 – *Fingerprints* de DNA de *H. pylori* para os marcadores 1254, 1281, 1283 e 1290 para a Família 8.

4.2 RESULTADOS PARA POPULAÇÃO SEM PARENTESCO

Da análise de similaridade entre os indivíduos sem parentesco verificou-se a alta prevalência de similaridade nula e alguns achados de similaridade variando entre 67 e 40%.

4.3 RESULTADOS COMPARADOS ENTRE O GRUPO FAMILIAR E O GRUPO CONTROLE

A similaridade média do conjunto das famílias foi de 18,24% contra 8,12% da população sem relação familiar, com $p < 0,001$. A similaridade média de cada família quando comparada a população sem relação familiar foi, significativamente, superior variando de 10,00 – 44,44% contra 8,12% com $p < 0,05$. (Tabela 11.)

Tabela 11 – Média de similaridade para 4 marcadores (1254, 1281, 1283, 1290) por família em comparação com o grupo de dispépticos sem relação familiar, e agrupados no grupo familiar em comparação com o grupo de dispépticos.

	1254		1281		1283		1290		Média	
	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P
Dispépticos	8,21	-	10,74	-	7,97	-	5,57	-	8,12	-
Familiar	13,38	0,018	25,19	0,000	16,31	0,002	18,10	0,015	18,24	0,000
Família 1	15,78	0,000	45,09	0,000	6,35	0,114	3,33	0,009	17,64	0,000
Família 2	33,33	0,004	33,33	0,000	44,44	0,002	66,67	0,000	44,44	0,001
Família 3	0,00	0,000	6,67	0,000	16,67	0,102	16,67	0,014	10,00	0,025
Família 4	18,89	0,002	16,67	0,000	26,48	0,001	8,34	0,028	17,59	0,000
Família 5	13,33	0,001	30,00	0	1,43	0,001	10,00	0,028	13,69	0,007
Família 6	4,45	0,001	12,00	0,000	16,67	0,000	10,00	0,000	10,78	0,007
Família 7	24,07	0,001	10,16	0,000	16,67	0,005	20,00	0,011	17,72	0,002
Família 8	5,06	0,002	36,61	0,000	16,79	0,021	26,07	0,000	21,13	0,001

Analisando a similaridade dos 33 indivíduos familiares em relação ao respectivo caso index obteve-se que 6 indivíduos não apresentaram nenhuma similaridade com o Index, 16 apresentaram similaridade de $\leq 25\%$, 6 apresentaram

similaridade de 25-50%, 3 apresentaram similaridade de 50-75%, e 1 apresentou similaridade de até 75-100%. (Tabela 12)

Tabela 12 – Média de similaridade das cepas de *H. pylori* entre os familiares com o respectivo index na mesma família em 4 níveis de proximidade.

	Similaridade									
	0%		< 25%		25-50%		50-75%		75-100%	
Familiares	6	18,2%	16	48,5%	6	18,2%	3	9,1%	1	3,0%

5 DISCUSSÃO

Como muitos outros agentes patogênicos, a epidemiologia da infecção do *H. pylori* e doenças associadas variam consideravelmente entre as populações humanas (Herrera *et al.*, 2008). Entender como ocorre a contaminação do *H. pylori* e a relação entre a bactéria e seus hospedeiros é fundamental para identificar populações de risco e controlar a propagação da infecção (Nahar *et al.*, 2009; Mamishi *et al.*, 2016). Este trabalho reforça a noção de que a bactéria é adquirida na infância e permanece até a vida adulta de acordo com a similaridade entre as cepas de *H. pylori*.

Nesse trabalho utilizou-se a técnica de RAPD seguida da construção de árvores filogenéticas, uma vez que trabalhos recentes demonstraram não haver diferenças significativas entre os resultados obtidos por RAPD e por sequenciamento (MLST) (Yokota *et al.*, 2015). Vale destacar que, a técnica de RAPD identifica polimorfismos gerados por mutações nos genomas (Junqueira *et al.*, 2000). Ou seja, demonstra a evolução molecular de determinado patógeno, num contexto epidemiológico (Forattini, 2005). Utilizando a filogenética é possível inferir como ocorreu a infecção em um determinado grupo (Étienne *et al.*, 2003). O RAPD tem considerável capacidade discriminatória, sendo eficaz na genotipagem do *H. pylori*. Contudo, devem-se estabelecer critérios rígidos de trabalho para manter a estabilidade e reprodutibilidade desse método (Kidd *et al.*, 2001; Godoy *et al.*, 2007).

Akopyanz *et al.* (1992) demonstraram a possibilidade de se distinguir as cepas de *H. pylori* utilizando apenas um primer RAPD, no entanto optamos por utilizar 4 primers de RAPD (1254, 1281, 1283 e 1290); uma vez que os quatro em conjunto apresentam maior poder discriminatório entre as cepas conforme trabalhos anteriores que também utilizaram 4 primers (Dubois *et al.*, 1999; Yakoob *et al.*, 2001).

A diversidade genética do *H.pylori* encontrado nos diversos trabalhos se justifica, pois o genoma se modifica durante a colonização por meio de transferência de DNA (Suerbaum *et al.*, 1998; Falush *et al.*, 2001). Este fenômeno pode explicar a baixa similaridade entre cepas de *H. pylori* fora das famílias inferior a 10% em conformidade com trabalhos anteriores (Herrera *et al.*, 2008).

Considerando a importância dos fatores de virulência, buscou-se uma relação entre os referidos fatores e os resultados de RAPD. No entanto, os *fingerprints* de

DNA observados neste estudo não apresentaram relação com os fatores de virulência (*CagA*, *VacA*, *CagE*, *UreA*) em acordo com trabalhos anteriores (Kidd *et al.*, 2001; Godoy *et al.*, 2007), embora Go *et al.* (1995), em um estudo nos EUA, tenham encontrado relação entre os perfis obtidos por *RAPD* e os fatores de virulência.

Apenas os *fingerprints* não oferecem uma resposta considerável e definitiva. É necessário para tanto a construção de árvores filogenéticas que permitem inferir acerca da história evolutiva das cepas de *H. pylori* e, portanto, da via de transmissão. Vale ressaltar que diversos métodos podem ser utilizados para construção dessas árvores. Porém, métodos objetivos de agrupamento de distâncias, como o *UPGMA* (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), utilizado nesse estudo, são diretos e reprodutíveis, construindo a árvore nó a nó, conectando as cepas mais próximas a cada etapa da construção da árvore (Caldart *et al.*, 2016).

Muito se preconiza acerca da transmissão do *H. pylori*. As principais evidências de transmissão intrafamiliar desse patógeno encontram-se baseadas em estudos epidemiológicos anteriores que consideraram apenas resultados de sorologia, teste respiratório, ou antígenos (Konno *et al.*, 2008; Burucoa e Axon, 2017).

Diversos estudos sustentam a hipótese da transmissão oral-oral, especialmente, de mãe para filho (Miyaji *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2004; Cartágenes *et al.*, 2009; Caldart *et al.*, 2016; Mamishi *et al.*, 2016). Essa colonização, geralmente, começa na infância e pode persistir durante toda a vida (Nahar *et al.*, 2009). Outras evidências sugerem que a infecção pode ser adquirida na comunidade. Ambas as rotas de infecção podem ser primárias em crianças e de reinfecção em crianças e adultos (Leung *et al.*, 1999; Lehours e Yilmaz, 2007).

Alguns estudos evidenciaram que a transmissão do *H. pylori* pode acontecer mais comumente de um irmão para o outro do que de pais para os filhos. (Wang *et al.*, 1993). Wang *et al.* (2003) observaram diferentes tipos de DNA de *H. pylori* entre os pais e as mães de uma mesma família, enquanto que o DNA de *H. pylori* entre os irmãos era sempre de um mesmo tipo, inclusive, em alguns casos, sendo diferente dos tipos encontrados em seus pais, os dados obtidos nesse trabalho corroboram a hipótese de transmissão entre irmãos e apontam para uma maior prevalência de

similaridade das cepas de *H. pylori* na mesma família em conformidade com trabalhos anteriores (Mamishi *et al.*, 2016).

Considerando que a transmissão oral-oral ocorre, sobretudo, devido aos hábitos dos indivíduos e ao nível de contato íntimo entre eles (Cartágenes *et al.*, 2009), a bactéria, no estômago, alcança a cavidade oral por refluxo e coloniza a boca, particularmente a placa dental e a língua (Cartágenes *et al.*, 2009).

Entre indivíduos que convivem no mesmo ambiente, como familiares, ou em creches, as rotas fecal-oral e oral-oral podem atuar simultaneamente, incluindo a gastro-oral, pois os vômitos são mais comuns em crianças (Vandenplas e Blecker, 1998; Leung *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 2004; Cartágenes *et al.*, 2009).

Fatores de risco comportamentais como o uso comum de colheres, partilha de chupetas e provar a comida da criança pode implicar na transmissão do *H. pylori* de mãe para filho (Schwarz *et al.*, 2008; Nahar *et al.*, 2009).

Em estudos anteriores de cepas de *H. pylori* verificou-se que os pais desempenham um papel crucial na infecção das crianças, em especial as mães (Herrera *et al.*, 2008; Nahar *et al.*, 2009; Mamishi *et al.*, 2016). Vários estudos têm identificado cepas de *H. pylori* iguais ou similares usando *fingerprints* de DNA, (Roma-Giannikou *et al.*, 2003; Konno *et al.*, 2005; Konno *et al.*, 2008; Mcmillan *et al.*, 2011; Yokota *et al.*, 2015). Os achados de um estudo realizado no Peru sugerem que, na transmissão intrafamiliar, cada membro do agregado pode servir igualmente como fonte de infecção, independente de idade (Herrera *et al.*, 2008).

De acordo com os dados encontrados nesse estudo a relação entre as cepas da mesma família é muito mais próxima do que entre cepas de indivíduos sem relação familiar (18,24% vs. 8,12%). Esses dados estão de acordo com trabalho realizado no Peru no qual as cepas de crianças eram mais similares as de outros membros da própria família (30%) em contraste com a similaridade com a Comunidade em geral (1%) (Herrera *et al.*, 2008).

Uma análise de famílias, com diferentes graus de parentesco pode fornecer novos insights em relação à transmissão intrafamiliar (Schwarz *et al.*, 2008).

Outro achado importante foi visto nas famílias 5 e 7 nas quais alguns indivíduos foram muito diferentes dos demais indivíduos da família. Achado semelhante pode ser visto no trabalho Schwarz *et al.* (2008), no qual uma criança diferiu do restante da família. Esses dados fortalecem o pressuposto de Schwarz *et al.* (2008) que ressaltam, ainda, a importância de se observar os cuidadores sem

relação de parentesco em creches e escolas, uma vez que estes podem representar uma importante fonte de contaminação.

O foco nos familiares é importante, pois fatores genéticos do hospedeiro parecem ter significativo papel na progressão da infecção do *H. pylori* e podem explicar o desenvolvimento do câncer gástrico, gastrite e úlcera (El-Omar *et al.*, 2000). Outro elemento, a predisposição familiar ao câncer gástrico é um fator de risco importante, sendo maior em indivíduos com história familiar positiva, em especial quando mais de um familiar é acometido (Zanghieri *et al.*, 1990; La Vecchia *et al.*, 1992).

A infecção pelo *H. pylori* é mais prevalente nos familiares de pacientes com câncer gástrico (Siman *et al.*, 1998; Fox *et al.*, 1999). Quando existe um caso relatado de câncer gástrico na família, em familiares de primeiro grau, os demais podem ser infectados pela mesma cepa, e estes apresentam um maior risco de desenvolver o carcinoma gástrico (Niv, 2003). Em nosso estudo, verificando também uma maior similaridade entre as cepas de irmãos, apontando para importância desse tipo de transmissão conforme identificado em trabalhos anteriores (Osaki *et al.*, 2015). Portanto, compreender a transmissão do *H. pylori* nos grupos familiares é primordial para entender a dinâmica da infecção na sociedade (Fialho, 2012).

6 CONCLUSÃO

Apesar do poder discriminatório da técnica é importante reconhecer algumas limitações desse estudo . Em primeiro lugar, não podemos extrapolar os dados para todo o país, devido à limitação geográfica do estudo e o tamanho da amostra. Em segundo lugar, as arvores filogenéticas obtidas pelo RAPD não fornece uma rota de transmissão definitiva, conforme relatado em outros estudos (NAHAR et al., 2009).

Desse modo os resultados desse estudo apontam para a necessidade de acompanhamento próximo dos familiares de indivíduos portadores de câncer gástrico, especialmente os irmãos, devido à moderada similaridade das cepas entre irmãos.

REFERENCIAS

- AKOPYANZ, N. et al. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 19, p. 5137-5142, 1992. ISSN 1362-4962.
- ATHERTON, J. et al. Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2979-2982, 1999. ISSN 0095-1137.
- ATHERTON, J. C. et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori* association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 30, p. 17771-17777, 1995. ISSN 0021-9258.
- BJÖRKHOLM, B.; SALAMA, N. R. Genomics of helicobacter 2003. **Helicobacter**, v. 8, n. s1, p. 1-7, 2003. ISSN 1523-5378.
- BJÖRKHOLM, B. et al. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 25, p. 14607-14612, 2001. ISSN 0027-8424.
- BLASER, M. J.; BERG, D. E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 7, p. 767, 2001.
- BRAGA, L. et al. *Helicobacter pylori*: gastritis, peptic ulcer and gastric cancer in developing countries. **At the edge of development: health crises in a transitional society**. Carolina Academic Press, Durham, NC, p. 127-147, 1995.
- BRAGA, L. L. B. C. et al. CagA phosphorylation EPIYA-C motifs and the vacA i genotype in *Helicobacter pylori* strains of asymptomatic children from a high-risk gastric cancer area in northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 8, p. 1045-1049, 2014. ISSN 0074-0276.
- BRENNER, H. et al. Individual and joint contribution of family history and *Helicobacter pylori* infection to the risk of gastric carcinoma. **Cancer**, v. 88, n. 2, p. 274-279, 2000. ISSN 1097-0142.
- BRENNER, H.; BODE, G.; BOEING, H. *Helicobacter pylori* infection among offspring of patients with stomach cancer. **Gastroenterology**, v. 118, n. 1, p. 31-35, 2000. ISSN 0016-5085.
- BURUCOA, C.; AXON, A. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 22, n. S1, 2017. ISSN 1523-5378.
- BURUCOA, C.; LHOMME, V.; FAUCHERE, J. L. Performance criteria of DNA fingerprinting methods for typing of *Helicobacter pylori* isolates: experimental results and meta-analysis. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 12, p. 4071-4080, 1999. ISSN 0095-1137.
- CALDART, E. T. et al. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 01-20, 2016. ISSN 1679-9216.
- CARTÁGENES, V. et al. *Helicobacter pylori* em crianças e associação de cepas CagA na transmissão mãe-filho na Amazônia brasileira. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 3, p. 298-302, 2009. ISSN 0037-8682.

CAVALCANTE, M. Q. D. F. et al. Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 561-563, 2012. ISSN 0074-0276.

CLAYTON, C. et al. Sensitive detection of Helicobacter pylori by using polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 192-200, 1992. ISSN 0095-1137.

COVACCI, A.; RAPPUOLI, R. PCR amplification of gene sequences from Helicobacter pylori strains. **Helicobacter pylori**, p. 94-111, 1996.

DUBOIS, A. et al. Host specificity of Helicobacter pylori strains and host responses in experimentally challenged nonhuman primates. **Gastroenterology**, v. 116, n. 1, p. 90-96, 1999. ISSN 0016-5085.

EL-OMAR, E. M. et al. Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of H. pylori. **Gastroenterology**, v. 118, n. 1, p. 22-30, 2000. ISSN 0016-5085.

ÉTIENNE, J.; MILLOT, F.; CERQUEIRA, A. J. **Bioquímica genética e biologia molecular**. 6. 2003. 504.

FALUSH, D. et al. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by Helicobacter pylori: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 15056-15061, 2001. ISSN 0027-8424.

FIALHO, A. M. N. **Estudo da transmissão intrafamiliar do Helicobacter pylori em uma comunidade de baixa renda em Fortaleza, Ceará**. 2012.

FORATTINI, O. P. **Conceitos Básicos de Epidemiologia Molecular Vol. 64**. EdUSP, 2005. ISBN 8531409160.

FOX, J. G. et al. High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances Helicobacter pylori colonization in C57BL/6 mice. **Cancer research**, v. 59, n. 19, p. 4823-4828, 1999. ISSN 0008-5472.

GARZIERA, M. et al. A novel CDH1 germline missense mutation in a sporadic gastric cancer patient in north-east of Italy. **Clinical and experimental medicine**, v. 13, n. 2, p. 149-157, 2013. ISSN 1591-8890.

GO, M. et al. Cluster analysis of Helicobacter pylori genomic DNA fingerprints suggests gastroduodenal disease-specific associations. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 30, n. 7, p. 640-646, 1995. ISSN 0036-5521.

GODOY, A. P. et al. Análise das impressões digitais de DNA e de fatores de virulência de linhagens de Helicobacter pylori. **Arq Gastroenterol**, v. 44, n. 2, p. 107-112, 2007. ISSN 0004-2803.

GOODMAN, K. J.; CORREA, P. Transmission of Helicobacter pylori among siblings. **The Lancet**, v. 355, n. 9201, p. 358-362, 2000. ISSN 0140-6736.

GRAHAM, D. Y. et al. Seroepidemiology of Helicobacter pylori infection in India. **Digestive diseases and sciences**, v. 36, n. 8, p. 1084-1088, 1991. ISSN 0163-2116.

GUILLEMIN, K. et al. Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to Helicobacter pylori infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 23, p. 15136-15141, 2002. ISSN 0027-8424.

HANSEN, S. et al. Helicobacter pylori infection and risk of cardia cancer and non-cardia gastric cancer: a nested case-control study. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 34, n. 4, p. 353-360, 1999. ISSN 0036-5521.

HERAS, J. et al. GelJ—a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. **BMC bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 270, 2015. ISSN 1471-2105.

HERRERA, P. M. et al. DNA-level diversity and relatedness of Helicobacter pylori strains in shantytown families in Peru and transmission in a developing-country setting. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3912-3918, 2008. ISSN 0095-1137.

HOPKINS, R. J. et al. Seroprevalence of Helicobacter pylori in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 1, p. 222-226, 1993. ISSN 1537-6613.

HUNT, R. et al. Helicobacter pylori in developing countries. World gastroenterology organisation global guideline. **J Gastrointestin Liver Dis**, v. 20, n. 3, p. 299-304, 2011.

ISRAEL, D.; PEEK, R. pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastric inflammation. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 15, n. 9, p. 1271-1290, 2001. ISSN 1365-2036.

JUNQUEIRA, L. C. U. et al. **Biologia celular e molecular**. Guanabara-Koogan, 2000. ISBN 8527705885.

KAUSER, F. et al. The cag pathogenicity island of Helicobacter pylori is disrupted in the majority of patient isolates from different human populations. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5302-5308, 2004. ISSN 0095-1137.

KIDD, M. et al. Clustering of South African Helicobacter pylori isolates from peptic ulcer disease patients is demonstrated by repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1833-1839, 2001. ISSN 0095-1137.

KIVI, M. et al. Concordance of Helicobacter pylori strains within families. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5604-5608, 2003. ISSN 0095-1137.

KONNO, M. et al. Five-year follow-up study of mother-to-child transmission of Helicobacter pylori infection detected by a random amplified polymorphic DNA fingerprinting method. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2246-2250, 2005. ISSN 0095-1137.

KONNO, M. et al. Predominance of mother-to-child transmission of Helicobacter pylori infection detected by random amplified polymorphic DNA fingerprinting analysis in Japanese families. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 27, n. 11, p. 999-1003, 2008. ISSN 0891-3668.

LA VECCHIA, C. et al. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. **Cancer**, v. 70, n. 1, p. 50-55, 1992. ISSN 1097-0142.

LEHOURS, P.; YILMAZ, O. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter**, v. 12, n. s1, p. 1-3, 2007. ISSN 1523-5378.

LEUNG, W.-K. et al. Isolation of Helicobacter pylori from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. **The American journal of gastroenterology**, v. 94, n. 10, p. 2881-2884, 1999. ISSN 0002-9270.

LISSOWSKA, J. et al. Family history and risk of stomach cancer in Warsaw, Poland. **European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)**, v. 8, n. 3, p. 223-227, 1999. ISSN 0959-8278.

MALATY, H. et al. A cotwin study of the effect of environment and dietary elements on Helicobacter pylori acquisition. **Am. J. Clin. Pathol.**, 1998.

MALATY, H. M. et al. Age at acquisition of Helicobacter pylori infection: a follow-up study from infancy to adulthood. **The Lancet**, v. 359, n. 9310, p. 931-935, 2002. ISSN 0140-6736.

MALATY, H. M. et al. Helicobacter pylori and socioeconomic factors in Russia. **Helicobacter**, v. 1, n. 2, p. 82-87, 1996. ISSN 1523-5378.

MAMISHI, S. et al. Intrafamilial transmission of Helicobacter pylori: genotyping of faecal samples. **British journal of biomedical science**, v. 73, n. 1, p. 38-43, 2016. ISSN 0967-4845.

MCMILLAN, M. et al. Intrafamilial genotyping of Helicobacter pylori from faecal DNA. **Gastroenterology research and practice**, v. 2011, 2011. ISSN 1687-6121.

MÉGRAUD, F. Resistance of Helicobacter pylori to antibiotics and its impact on treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 4, n. 3, p. 178-186, 2001. ISSN 1368-7646.

MITCHELL, H. et al. Epidemiology of Helicobacter pylori in southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition. **Journal of infectious Diseases**, v. 166, n. 1, p. 149-153, 1992. ISSN 1537-6613.

MIYAJI, H. et al. Helicobacter pylori infection occurs via close contact with infected individuals in early childhood. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 15, n. 3, p. 257-262, 2000. ISSN 1440-1746.

MOTTA, C. R. A. et al. Gastric precancerous lesions and Helicobacter pylori infection in relatives of gastric cancer patients from Northeastern Brazil. **Digestion**, v. 78, n. 1, p. 3-8, 2008. ISSN 0012-2823.

NAHAR, S. et al. Evidence of intra-familial transmission of Helicobacter pylori by PCR-based RAPD fingerprinting in Bangladesh. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 28, n. 7, p. 767-773, 2009. ISSN 0934-9723.

NIV, Y. Family history of gastric cancer: should we test and treat for Helicobacter pylori? **Journal of clinical gastroenterology**, v. 36, n. 3, p. 204-208, 2003. ISSN 0192-0790.

NOGUEIRA, C. et al. salgado C, Belo L, Peixoto A, Bravo JC, Bravo LE, Realpe JL, Plaisier AP, Quint WG, Ruiz B, Correa P, van Doorn LJ. **Helicobacter pylori**, p. 647-54, 2001.

OLIVEIRA, A. M. et al. Seroprevalence of Helicobacter pylori infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. **American Journal of gastroenterology**, v. 89, n. 12, 1994. ISSN 0002-9270.

OSAKI, T. et al. Analysis of intra-familial transmission of Helicobacter pylori in Japanese families. **Journal of medical microbiology**, v. 64, n. 1, p. 67-73, 2015. ISSN 1473-5644.

PARSONNET, J. Helicobacter pylori: the size of the problem. **Gut**, v. 43, n. Suppl 1, p. S6, 1998.

PARSONNET, J. **When heredity is infectious**: Elsevier 2000.

- PEEK, R. M. Helicobacter pylori strain-specific modulation of gastric mucosal cellular turnover: implications for carcinogenesis. **Journal of gastroenterology**, v. 37, n. 13, p. 10-16, 2002. ISSN 0944-1174.
- RIBEIRO, M. L. et al. Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of Helicobacter pylori using PCR-RFLP. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 57-61, 2004. ISSN 1574-695X.
- RODRIGUES, M. N. et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection in children from an urban community in north-east Brazil and risk factors for infection. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 2, p. 201-205, 2004. ISSN 0954-691X.
- ROMA-GIANNIKOU, E. et al. Intrafamilial spread of Helicobacter pylori: a genetic analysis. **Helicobacter**, v. 8, n. 1, p. 15-20, 2003. ISSN 1523-5378.
- SARKER, S. et al. Helicobacter pylori: prevalence, transmission, and serum pepsinogen II concentrations in children of a poor periurban community in Bangladesh. **Clinical infectious diseases**, v. 25, n. 5, p. 990-995, 1997. ISSN 1537-6591.
- SCHWARZ, S. et al. Horizontal versus familial transmission of Helicobacter pylori. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 10, p. e1000180, 2008. ISSN 1553-7374.
- SIMAN, J. et al. Tobacco smoking and Helicobacter pylori infection are risk factors of gastric adenocarcinoma. **Gut**, v. 43, n. 2S, p. 63A, 1998. ISSN 0017-5749.
- SINHA, S. K. et al. The Incidence of Helicobacter pylori Acquisition in Children of a Canadian First Nations Community and the Potential for Parent-to-Child Transmission. **Helicobacter**, v. 9, n. 1, p. 59-68, 2004. ISSN 1523-5378.
- SJOMINA, O. et al. Helicobacter pylori infection and nonmalignant diseases. **Helicobacter**, v. 22, n. S1, 2017. ISSN 1523-5378.
- SOTO, G. et al. Helicobacter pylori reinfection is common in Peruvian adults after antibiotic eradication therapy. **The Journal of infectious diseases**, v. 188, n. 9, p. 1263-1275, 2003. ISSN 1537-6613.
- SOUTO, F. J. D. et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection in a rural area of the state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 171-174, 1998. ISSN 0074-0276.
- SOZZI, M. et al. Heterogeneity of cag genotypes and clinical outcome of Helicobacter pylori infection. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 146, n. 5, p. 262-270, 2005. ISSN 0022-2143.
- SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. Helicobacter pylori infection. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 15, p. 1175-1186, 2002. ISSN 0028-4793.
- SUERBAUM, S. et al. Free recombination within Helicobacter pylori. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 21, p. 12619-12624, 1998. ISSN 0027-8424.
- THORELL, K.; LEHOURS, P.; VALE, F. F. Genomics of Helicobacter pylori. **Helicobacter**, v. 22, n. S1, 2017. ISSN 1523-5378.

TINDBERG, Y. et al. Helicobacter pylori infection in Swedish school children: lack of evidence of child-to-child transmission outside the family. **Gastroenterology**, v. 121, n. 2, p. 310-316, 2001. ISSN 0016-5085.

VANDENPLAS, Y.; BLECKER, U. Helicobacter pylori infection in children. **Acta Paediatrica**, v. 87, n. 11, p. 1105-1112, 1998. ISSN 1651-2227.

VENERITO, M. et al. Helicobacter pylori, gastric cancer and other gastrointestinal malignancies. **Helicobacter**, v. 22, n. S1, 2017. ISSN 1523-5378.

WANG, J.-T. et al. Direct DNA amplification and restriction pattern analysis of Helicobacter pylori in patients with duodenal ulcer and their families. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 6, p. 1544-1548, 1993. ISSN 1537-6613.

WANG, J. et al. Regional variation among vacA alleles of Helicobacter pylori in China. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1942-1945, 2003. ISSN 0095-1137.

WEYERMANN, M.; ROTHENBACHER, D.; BRENNER, H. Acquisition of Helicobacter pylori infection in early childhood: independent contributions of infected mothers, fathers, and siblings. **The American journal of gastroenterology**, v. 104, n. 1, p. 182-189, 2009. ISSN 0002-9270.

YAKOUB, J. et al. Helicobacter pylori detection in Chinese subjects: A comparison of two common DNA fingerprinting methods. **British journal of biomedical science**, v. 58, n. 4, p. 239, 2001. ISSN 0967-4845.

YOKOTA, S. I. et al. Intrafamilial, Preferentially Mother-to-Child and Intrapousal, Helicobacter pylori Infection in Japan Determined by Multilocus Sequence Typing and Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting. **Helicobacter**, v. 20, n. 5, p. 334-342, 2015. ISSN 1523-5378.

ZANGHIERI, G. et al. Familial occurrence of gastric cancer in the 2-year experience of a population-based registry. **Cancer**, v. 66, n. 9, p. 2047-2051, 1990. ISSN 1097-0142.