



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

ADENIELSON VILAR E SILVA

Belém – Pará

2012

ADENIELSON VILAR E SILVA

Associação das Variantes da Região Carboxiterminal do Gene *cagA* de *Helicobacter pylori* com o Desenvolvimento de Distúrbios Gastroduodenais em Belém-Pará.

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Dra. Luísa Carício Martins

Belém – Pará

2012

**Dados Internacionais de Catalogação -na- Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA**

Silva, Adenilson Vilar e.

Associação das variantes da região carboxiterminal do Gene cagA de *Helicobacter pylori* com o desenvolvimento de distúrbios gastroduodenais em Belém-Pará / Adenilson Vilar e Silva; orientadora, Luísa Carício Martins. – 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. *Helicobacter pylori* – Belém(PA) . 2. Gastrite – Belém(PA). 3. Estômago – Câncer – Belém(PA). I. Martins, Luísa Carício, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 616.33

Ficha catalográfica elaborada por Valdenira Moreira, NMT/UFPA

ADENIELSON VILAR E SILVA

**ASSOCIAÇÃO DAS VARIANTES DA REGIÃO CARBOXITERMINAL DO GENE
CAGA DE *HELICOBACTER PYLORI* COM O DESENVOLVIMENTO DE
DISTÚRBIOS GASTRODUODENAIS EM BELÉM-PARÁ.**

Dissertação apresentada à aprovação como requisito para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, pela Comissão formada pelos professores:

Banca examinadora:

Profª Drª Luisa Carício Martins – Orientadora

Drª Tereza Creistina de Oliveira Corvelo – Núcleo de Medicina Tropical – Avaliador

Drª Hellen Thais Fuzzi – Núcleo de Medicina Tropical – Avaliador

Drª Katarine Antônia dos Santos Barile – Faculdade Metropolitana da Amazônia – Avaliador

Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma – Núcleo de Medicina Tropical – Suplente

Belém – Pará

2012

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Maria de Fátima e Arinaldo Silva,
que não mediram esforços para me proporcionar uma boa
educação e profissional e ao sempre incondicional apoio.*

*Aos meus irmãos Adnelson e Adnielson, pelo
apoio e compreensão.*

*A minha tia Dr^a Osmarina Paixão pela dedicação
a minha formação profissional*

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^o. Luisa Caricio Martins, um exemplo para meu aprimoramento profissional, por seu apoio e orientação na realização deste trabalho. Com sua cobrança, paciência, compreensão e generosidade, sempre compartilhou seus conhecimentos, como também não poupou qualquer esforço para me guiar nos caminhos da pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Clínica das Doenças tropicais, Ruth, Mário, Amanda, Fátima, Socorro, Kemper, Marcela, Andrei, Renata, Andrea, Silvia, pela amizade e pela indispensável colaboração direta e indireta na realização deste trabalho.

Aos professores e colegas do Curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais, em especial a Danilo Almeida, pelas valiosas sugestões recebidas nos seminários de pesquisa.

E a todos aqueles que, mesmo não tendo sido citados, contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

*“Ter fé é assinar uma folha em
branco e deixar que Deus
escreva o que ele quer.”
(Santo Agostinho)*

RESUMO

A citotoxina CagA do *Helicobacter pylori*, codificada pelo gene *cagA*, é associada ao aumento da resposta inflamatória do tecido gástrico e a alteração do controle do crescimento e proliferação celular. A ativação desta citotoxina ocorre pela fosforilação em resíduos específicos de tirosina dentro de uma sequência de aminoácidos denominada *motif* EPIYA, sendo quatro os tipos de *motifs* descritos na literatura (EPIYA-A,-B,-C e-D). Contudo, o sítio EPIYA-C constitui o local mais comum de fosforilação de proteínas CagA das cepas bacterianas isoladas nos países ocidentais, podendo ainda ser encontrado em repetições. Assim, este estudo teve como objetivo determinar os tipos de *motifs* EPIYA de CagA presentes em pacientes com gastrite e adenocarcinoma gástrico e sua associação com estas doenças. Foram coletadas amostras de biópsias gástricas de 384 pacientes infectados por *H. pylori*, dos quais 194 apresentavam gastrite crônica e 190 adenocarcinoma gástrico. As biópsias gástricas foram utilizadas para análise histológica, extração de DNA bacteriano e análise do gene *cagA* por PCR. Houve predomínio de adenocarcinoma gástrico no sexo masculino, com média de idade de 58 anos. O gene *cagA* foi mais prevalente nos pacientes com câncer gástrico, apresentando associação com maior grau de inflamação, atividade neutrofílica e desenvolvimento de metaplasia intestinal (OR = 4,31, IC 95% = 2,71-6,87, $p < 10^{-3}$; OR = 3,57, IC 95% = 2,18 – 5,84, $p < 10^{-3}$; OR = 11,11, IC 95% = 5,48 – 22,30, $p < 10^{-3}$; OR = 3,65, IC 95% = 1,50-8,88, $p=0,004$, respectivamente). O número de repetições do sítio EPIYA C foi significativamente associada com o aumento do risco de carcinoma gástrico (OR = 2,99, IC 95% = 1,53-5,82, $p < 10^{-3}$) e o maior número de *motifs* EPIYA C também foi associado com metaplasia intestinal ($p = 0,02$). Neste estudo a infecção por cepas de *H. pylori* portadoras do gene *cagA* com mais de um *motif* EPIYA-C demonstrou associação com o desenvolvimento de metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico, entretanto, não apresentou associação com a atividade neutrofílica e grau de inflamação.

Palavras chaves: *H. pylori*, gastrite crônica, câncer gástrico, *motif cagA* EPIYA-C, Brasil.

ABSTRAC

Helicobacter pylori CagA cytotoxin, encoded by the *cagA* gene, has been associated with increased inflammatory response in gastric tissue and the change in control of cell growth and proliferation. Activation of this cytotoxin occurs by phosphorylation in specific tyrosine residues within an amino acid sequence termed *motif* EPIYA, four types of *motifs* are described in the literature (EPIYA-A,-B-C and D). However, the site EPIYA-C is the most common site of phosphorylation of CagA protein of the bacterial strains isolated in Western countries, may still be found in repetitions. This study aimed to determine the types of *motifs* EPIYA of CagA present in patients with gastritis and gastric cancer and its association with these diseases. Were collected samples from gastric biopsies of 384 patients infected with *H. pylori*, of this 194 presented chronic gastritis and 190 had gastric cancer. The gastric biopsy was used for bacterial DNA extraction and analysis of the *cagA* gene by PCR. The prevalence of gastric cancer occurs in males, mean age 58 years. The *cagA* gene was more prevalent in patients with gastric cancer, showing association with a higher degree of inflammation, neutrophil activity and development of intestinal metaplasia (OR = 4,31, IC 95% = 2,71-6,87, $p < 10^{-3}$; OR = 3,57, IC 95% = 2,18 – 5,84, $p < 10^{-3}$; OR = 11,11, IC 95% = 5,48 – 22,30, $p < 10^{-3}$; OR = 3,65, IC 95% = 1,50-8,88, $p=0,004$, respectively). The number of repetitions EPIYA-C site was significantly associated with increased risk of gastric cancer (OR = 2,99, IC 95% = 1,53-5,82, $p < 10^{-3}$). The higher number of *motifs* EPIYA-C was also associated with intestinal metaplasia ($p = 0,02$). In this study the infection by strains of *H. pylori* carriers *cagA* gene with more than one *motif* EPIYA-C shown to be associated with the development of intestinal metaplasia and gastric cancer, but without an association to neutrophil activity and degree of inflammation.

Keywords: *H. pylori*, chronic gastritis, gastric cancer, *motif cagA* EPIYA-C

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ultra-estrutura de espiral e dos tipos A e B formas de cocos de <i>H. pylori</i> .	16
Figura 2 – Comparação da prevalência de infecção por <i>H. pylori</i> em países desenvolvidos e países em desenvolvimento.	18
Figura 3 – História natural da infecção pelo <i>Helicobacter pylori</i>	21
Figura 4 – Fatores de virulência associados ao <i>H. pylori</i>	22
Figura 5 – Organização genética da ilha de patogenicidade cag (cag PAI)	23
Figura 6 – A interação entre <i>H. Pylori</i> cagA-positivas e células epiteliais gástricas..	25
Figura 7 – Desregulação da SHP2 por CagA	26
Figura 8 – Diversidade nos locais de fosforilação de tirosina de CagA	27
Figura 9 – Diferentes propriedades da proteína CagA Ocidental e do Leste Asiático.	28
Figura 10 – Distribuição da faixa etária por doença diagnosticada	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grau de escolaridade dos pacientes do estudo	36
Tabela 2 - Distribuição do gene <i>cagA</i> nos participantes do estudo	36
Tabela 3 - Padrão e distribuição da região EPIYA do gene <i>cagA</i> associado ao tipo de doenças.....	38
Tabela 4 - Padrão e distribuição da região EPIYA do gene <i>cagA</i> associado ao tipo de doenças.....	39
Tabela 5 - Associação da presença do gene <i>cagA</i> e o grau de inflamação.....	39
Tabela 6 - Associação da presença do gene <i>cagA</i> e atividade neutrofílica	40
Tabela 7 - Associação entre o polimorfismo EPIYA do gene <i>cagA</i> de pacientes mono infectados e o grau de inflamação.....	40
Tabela 8 - Associação entre o polimorfismo EPIYA do gene <i>cagA</i> de pacientes mono infectados e a atividade neutrofílica.	41
Tabela 9 - Associação do gene <i>cagA</i> a presença de metaplasia.....	41
Tabela 10 - Associação do polimorfismo da região EPIYA dos participantes do estudo mono infectados e a presença de metaplasia.	42

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

Ala: Alanina

CagA: *citotoxin antigen associated*

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

C-terminal: Carboxi terminal

CO₂: Dióxido de Carbono

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ERK: Quinase Regulada por Sinais Extracelulares (*Extracellular signal-Regulated Kinase*)

H. pylori: *Helicobacter pylori*

Glu: Ácido glutâmico

IgG: Imunoglobulina do tipo G

Ile: Isoleucina

IL-8: Interleucina-6

IL-10: Interleucina-10

IFN-γ: Interferon-gama

LPS: Lipopolissacarídeo

mL: Mililitro

mM: Milimolar

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MEV: Microscopia eletrônica de transmissão

MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

N-terminal: Amino terminal

PAI: Ilha de patogenicidade cag

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial hidrogênio

Pro: Prolina

Th1: Linfócitos T CD4+ helper 1

Th2 - Linfócitos T CD4+ helper 2

Tyr: Tirosina

UV: Ultra violeta

VacA: *vacuolating citotoxin gene*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 HISTÓRICO E TAXONOMIA DO <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	15
3.2 MORFOLOGIA DO <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	16
3.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS NA INFECÇÃO PELO <i>H. PYLORI</i>	17
3.4 VIA DE TRANSMISSÃO	19
3.5 ASSOCIAÇÃO DA INFECÇÃO PELO <i>H. PYLORI</i> COM O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS GASTRODUODENAIIS	19
3.6 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	21
3.7 GENE CAGA	23
3.8 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA CITOTOXINA CAGA.....	24
3.9 POLIMORFISMO E EPIDEMIOLOGIA DA CITOTOXINA CAGA.....	26
3.10 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO	29
4 OBJETIVOS	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1. CASUÍSTICA.....	32
5.1.1. Caracterização da Amostra	32
5.1.2 Critérios de Inclusão	32
5.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	32
5.3. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	33
5.4. PREPARAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE <i>H. PYLORI</i>	33
5.5. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CONSTANTE DO GENE CAGA	33
5.6. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3' DO GENE CAGA E DETERMINAÇÃO DO PADRÃO EPIYA DO GENE CAGA.....	34

5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
6. RESULTADOS	36
6.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	35
6.2 GENOTIPAGEM DO GENE <i>cagA</i>	37
6.3 DETERMINAÇÃO DO <i>MOTIF</i> EPIYA DO GENE <i>cagA</i>	38
6.4. ASSOCIAÇÕES ENTRE OS DADOS MOLECULARES E OS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS.....	39
7 DISCUSSÃO	43
8 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO -TCLE	57
ANEXO II – PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS	58

1. INTRODUÇÃO

Desde sua descoberta na década de 80, o *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), tem sido associada à etiopatogenia de diversas doenças do aparelho digestivo (MARSHALL; WARREN, 1984). Atualmente, o microrganismo é considerado o mais importante agente etiológico de gastrite em seres humanos, (NIHCC, 1994) e um fator de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico em seres humanos (FORMAN et al., 1991), sendo portanto considerado, pela Organização Mundial de Saúde, carcinógeno do tipo 1 (WHO, 1994). No entanto, a maioria das pessoas infectadas são assintomáticas e apenas um pequeno grupo de indivíduos infectados pela bactéria desenvolve úlcera péptica ou câncer gástrico.

A grande variabilidade nas manifestações clínicas da infecção pelo *H. pylori* está associada a vários fatores, entre eles: fatores de virulência bacteriana, fatores ambientais e fatores genéticos dos hospedeiros, ou a combinação de ambos (TAYLOR; BLASER, 1991; ATHERTON et al., 1997).

O *H. pylori* apresenta grande diversidade genética em seus fatores de virulência, como nos genes que codificam as citotoxinas CagA e VacA, que podem ser usado como marcadores para prever o risco de desenvolver várias doenças gastroduodenais (YAMAOKA et al., 1999).

Um importante fator de virulência que tem sido atribuído ao *H. pylori* é citotoxina CagA, sendo mostrado em diversos estudos estar intimamente associada com o desenvolvimento de úlcera péptica e câncer gástrico (PEEK & BLASER, 2002; PALLI et. al, 2007).

No entanto, alguns estudos não conseguiram relacionar doenças mais graves com cepas cagA positivas (KIM et. al, 2000). Este enigma poderia ser explicado pelo menos em parte pelo polimorfismo da região 3' do gene *cagA*, determinando o polimorfismo estrutural da proteína CagA entre cepas de *H. pylori* circulantes em diferentes áreas geográficas. A proteína CagA apresenta variação em uma sequência de cinco aminoácidos (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) na sua extremidade carboxi-terminal denominada de *motif* EPIYA (HIGASHI et. al, 2002a). Quatro

diferentes *motifs* EPIYA foram definidos segundo sequência de aminoácidos que circunda a sequência EPIYA (EPIYA-A,-B,-C e-D).

Alguns estudos tem mostrado associação significativa entre câncer gástrico e o de *motifs* EPIYA C quando comparados com gastrite na população ocidental (BASSO et al., 2008; YAMAOKA et al., 1999). Já na população oriental o desenvolvimento de gastrite atrófica e câncer gástrico foram associados a cepas portadoras do *motif* EPIYA D (AZUMA et. al, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

O Estado do Pará e, em especial, a capital, Belém, vêm apresentando uma das maiores incidências de câncer gástrico não só no país como no mundo. Em Belém, o hospital de referência em atendimento oncológico é o Ofir Loyola que atende pacientes da capital e do interior do Estado, gerido pelo Governo Estadual. Contudo, devido a demanda espontânea e extremamente elevada, o hospital da Universidade Federal do Pará, João de Barros Barreto, que está concluindo a sua Unidade de Alta Complexidade em Oncologia, já apresenta grande quantidade de pacientes em tratamento, aguardando cirurgia ou em pós-operatório (SOUZA et al., 2010).

Estudos realizados em Belém-PA têm demonstrado alta prevalência da infecção por *H. pylori* com cepas portadoras de fatores de virulência como *gene cagA*, em pacientes com distúrbios gastroduodenais e principalmente relacionado com adenocarcinoma gástrico (BARILE et al., 2009; CARTÁGENES et al., 2009; MARTINS et al., 2005)

Os mecanismos que associam o *H. pylori* na etiopatogenia do adenocarcinoma gástrico ainda não estão devidamente esclarecidos e são discutidos por vários autores. Contudo, estudos sobre os fatores de virulência e o mecanismo de ação contribuem para elucidação das diferentes evoluções clínicas, tratamento e a melhora do prognóstico dos pacientes.

Neste sentido, é importante o estudo do polimorfismo da região de repetição *cagA* podendo ser um importante preditor de prognóstico, pela possível associação dos subtipos com condições pré-malignas em pacientes com distúrbios gastroduodenais.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. HISTÓRICO E TAXONOMIA DO *HELICOBACTER PYLORI*

Em 1979, Warren observou pela primeira vez, através de estudos histológicos em biópsias gástricas, a existência de uma bactéria em pacientes com gastrite crônica ativa e úlcera péptica. Para descartar a possibilidade de que as bactérias observadas fossem comensais e não patógenos, o pesquisador examinou 20 casos de pacientes com histologia gástrica normal, onde não foram vistas células inflamatórias e bactérias (PAJARES e GISBERT, 2006).

Em 1981, Marshall iniciou sua colaboração ao estudo de Warren realizando técnicas de cultivos que permitissem o isolamento da bactéria. A bactéria encontrada era bastante parecida com o gênero *Campylobacter*. Contudo, sempre se considerou que a bactéria não se adaptava claramente ao gênero *Campylobacter* e que poderia corresponder ao gênero *Spirillum*. Marshall ainda preconizou que o microrganismo deveria desempenhar um importante papel na patogenia das doenças gastroduodenais (MARSHALL, 1983, PAJARES e GISBERT, 2006).

Em 1983, Skirrow sugeriu que esta bactéria deveria receber a denominação de *Campylobacter pyloridis* por sua colonização preferencial próxima ao piloro. Esta nomenclatura foi depois revisada para se adaptar as regras gramaticais sendo substituída pela palavra pylori (PAJARES e GISBERT, 2006).

A partir do sequenciamento do RNA de *Campylobacter pylori* realizado em 1989 (GOODWIN et. al, 1989), associado às técnicas de biologia molecular, à caracterização de proteínas e lipídios da parede celular, à caracterização sorológica e análise das propriedades bioquímicas (MURRAY et. al, 2006), foi possível demonstrar que esta espécie não pertencia ao gênero *Campylobacter*, sendo necessário reclassificá-la para um novo gênero, o *Helicobacter*, adequando a classificação taxonômica do microrganismo para *Helicobacter pylori* (PAJARES e GISBERT, 2006).

Em 2005, Warren e Marshall foram merecidamente reconhecidos e agraciados com o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia pela descoberta da bactéria e sua associação com doenças gastroduodenais (AHMED, 2005).

3.2. MORFOLOGIA DO *HELICOBACTER PYLORI*

Através da coloração de Gram, o *H. pylori* é classificado como uma bactéria gram-negativa, apresentando comprimento de 2,5 a 5,0 μm e largura de 0,5 a 1,0 μm (Figura 1) (MARSHALL, 2002).

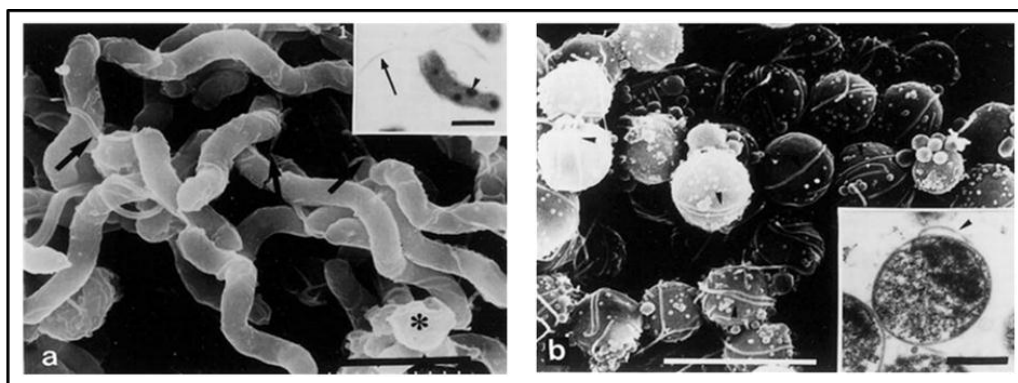


Figura 1. Ultra-estrutura de espiral e dois tipos A e B formas de cocos de *H. Pylori*. (a) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de formas espirais no dia 1 de cultura. Flagelos são vistos em um dos lados da célula (setas). Um organismo esférico é visível (asterístico). Detalhe: microscopia eletrônica de transmissão (MET) de uma forma espiral. O flagelo (seta) e um grânulo intracitoplasmático (seta) são visíveis. (b) MET das formas do tipo B cocóide no Dia 3. A superfície lisa é totalmente cercada por flagelos (setas). Detalhe: MET forma cocóide. A estrutura da membrana é bem preservada e um flagelo é bem visível (seta)

Fonte: Sato et al., 2003.

A conversão morfológica da forma espiral para cocóide pode se dar em uma diversidade de condições ambientais, como incubação prolongada, temperatura elevada, pH alcalino, aerobiose, entre outros fatores adversos

(CATRENICH e MAKIN, 1991). Culturas com formas cocóides são metabolicamente ativas, porém não podem ser repicadas, pois o microrganismo já não seria capaz de produzir colônias no novo meio (DUNN et al, 1997).

3.3. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO *H. PYLORI*

O *H. pylori* tem distribuição cosmopolita, e estima-se que aproximadamente 50% da população mundial esteja infectada, sendo que um mesmo indivíduo pode se infectar por diferentes cepas (LEE et al., 2005). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência da infecção pelo *H. pylori* aumenta com a idade, apresenta altos índices nos países em desenvolvimento e em pessoas de baixo nível socioeconômico (Figura 2) (MÉGRAUD et al., 1989).

Em países em desenvolvimento a prevalência do *H. pylori* é bem maior tanto em adultos quanto em crianças, provavelmente devido ao baixo nível socioeconômico comparado com países desenvolvidos (FIEDOREK et al., 1991; GRAHAM et al., 1991; MENDALL et al., 1992), onde a transmissão do microrganismo pode ser facilitada por precárias condições de higiene, aglomerados humanos e por contato mais íntimo entre as crianças e os adultos com alta prevalência da infecção (FIEDOREK et al., 1991; GALPIN et al., 1992; MÉGRAUD et al., 1989; MITCHELL et al., 1992). Países como Índia, Arábia Saudita e Vietnam, são caracterizados por uma rápida taxa de aquisição da infecção, na qual aproximadamente 70% da população adquire a infecção antes dos 20 anos de idade (Figura 2) (AL-MOAGEL et al.; 1990; GRAHAM et al., 1991; MÉGRAUD et al., 1989).

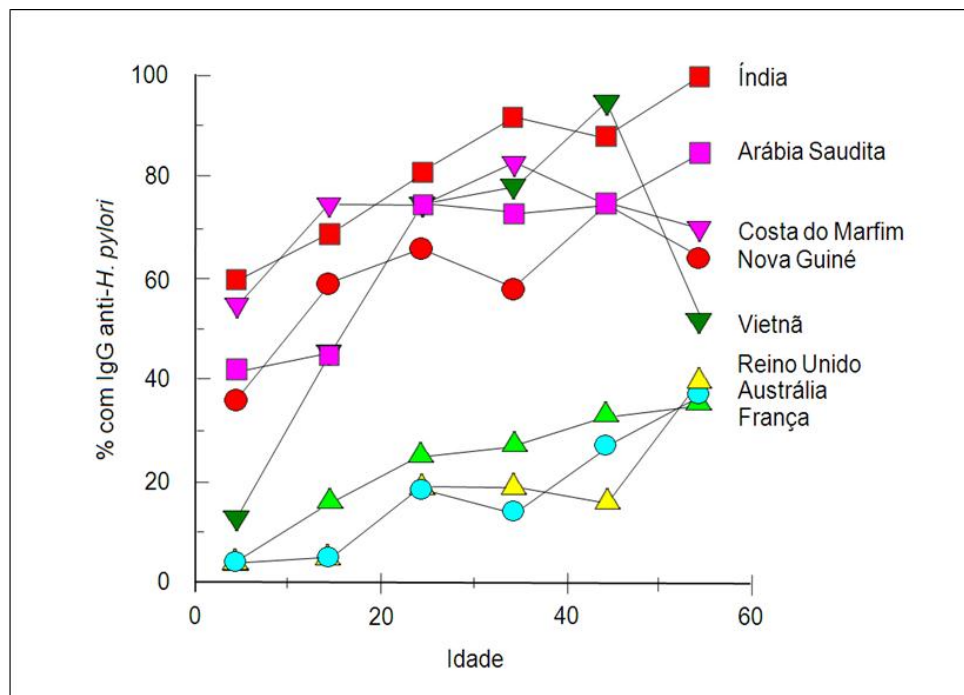


Figura 2. Comparação da prevalência de infecção por *H. pylori* em países desenvolvidos e países em desenvolvimento, através da presença de anticorpos séricos IgG aos antígenos *H. pylori* como um indicador da infecção.

Fonte: Malaty et al., 2007, p.206

No Brasil, em um estudo transversal realizado em Belo Horizonte, capital de Minas Gerais, verificou-se uma soroprevalência de 34,1% em crianças (OLIVEIRA et al., 1994). Outro estudo no Mato Grosso do Sul, encontrou uma soroprevalência de 77,5% em crianças e jovens, e de 84,7% entre adultos, quando se avaliou uma área rural carente desse estado (SOUTO et al., 1998).

Em Belém, Pará, Cartágenes et. al, identificaram uma soroprevalência de 50% em crianças provenientes de mães infectadas (CARTÁGENES et. al, 2009). Além disso, tem sido descrita uma alta taxa de prevalência da infecção pela bactéria em pacientes adultos com distúrbios gástricos, sendo relatada entre 64% e 74% em pacientes com gastrite (AGUIAR et al., 2002; MARTINS et al., 2005) e 93% em indivíduos com úlcera gástrica em estudos realizados neste estado (MARTINS et al., 2002).

3.4. VIA DE TRANSMISSÃO

Na maioria dos casos, a infecção é adquirida na infância ocorrendo um rápido aumento da taxa de prevalência, particularmente nos cinco primeiros anos de vida (BRUCE e MAAROOS, 2008). É universalmente aceito que a bactéria apenas consiga alcançar a mucosa gástrica através da boca, pois se trata de um microrganismo não invasivo, que parece ser transmitido de pessoa a pessoa de forma direta ou indireta (DELTENRE e KOSTER, 2000). As principais rotas de transmissão são oral-oral, fecal-oral e gastro-oral, pois antígenos da bactéria têm sido detectados na cavidade oral (SIAVOSHI et. al, 2005) e eliminados através das fezes (PARSONNET et. al, 2000), como também em conteúdos de vômitos (LEUNG et. al, 2004). A concordância de tipos moleculares desta bactéria, entre indivíduos da mesma família, indica que a transmissão ocorre entre seus membros. A presença de infecção nos pais, especialmente nas mães, é um importante fator de risco para os filhos devido aos contatos provenientes de seus cuidados (HAN et. al, 2000; SIAVOSHI et. al, 2005).

3.5. ASSOCIAÇÃO DA INFECÇÃO PELO *H. PYLORI* COM O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS GASTRODUODENAIAS.

A infecção pelo *H. pylori* causa gastrite crônica, doença ulcerosa péptica, linfoma gástrico de células B e adenocarcinoma gástrico (SUERBAUM e MICHETTI, 2002; KUSTERS et al., 2006; MALATY, 2007). Entretanto, somente uma pequena parcela de infectados desenvolve doença clinicamente significativa (SUERBAUM e MICHETTI, 2002).

O *H. pylori* é geralmente adquirido na infância, sendo que inicialmente a infecção pelo *H. pylori* causa hipocloridria transitória e raramente é diagnosticada. Contudo, o quadro inflamatório persiste por vários anos e causa sérios danos à

mucosa gástrica, podendo evoluir para doenças gastroduodenais mais graves (SUERBAUM e MICHETTI, 2002; ÁLVARES et. al, 2006).

A gastrite crônica irá se desenvolver em virtualmente todas as pessoas persistentemente colonizadas, mas 80 a 90% nunca terão sintomas (SUERBAUM e MICHETTI, 2002). Aproximadamente um em cinco indivíduos irá desenvolver doença ulcerosa péptica e menos de 1% irão desenvolver câncer gástrico (GOBERT et al., 2002). Contudo, os portadores de úlcera péptica, câncer gástrico e linfoma apresentam, independentemente da sua situação social, taxas de infecção pelo *H. pylori* próximas a 100% (EISIG e SILVA, 2002).

O curso clínico da infecção pelo *H. pylori* é altamente variável e influenciado por fatores tanto bacterianos quanto do hospedeiro (SUERBAUM e MICHETTI, 2002) (Figura 3). O padrão e a distribuição da gastrite estão fortemente relacionados com o risco de sequelas clínicas, como úlceras gástricas ou duodenais, atrofia da mucosa, carcinoma gástrico, ou linfoma gástrico (DIXON, 2001). Pacientes com alta produção de ácido são sujeitos a ter gastrite predominantemente antral, que os predispõem à úlcera duodenal. Pacientes com baixa produção de ácido são mais sujeitos a ter gastrite no corpo do estômago, que os predispõem a ter úlcera gástrica e pode iniciar a sequência de eventos que, em alguns casos, leva ao carcinoma gástrico. Além disso, a infecção por *H. pylori* induz a formação de tecido linfóide associado à mucosa gástrica (MALT). Portanto, o linfoma maligno originado de tal tecido linfóide associado à mucosa é outra rara complicação da infecção por *H. pylori* (SUERBAUM e MICHETTI, 2002).

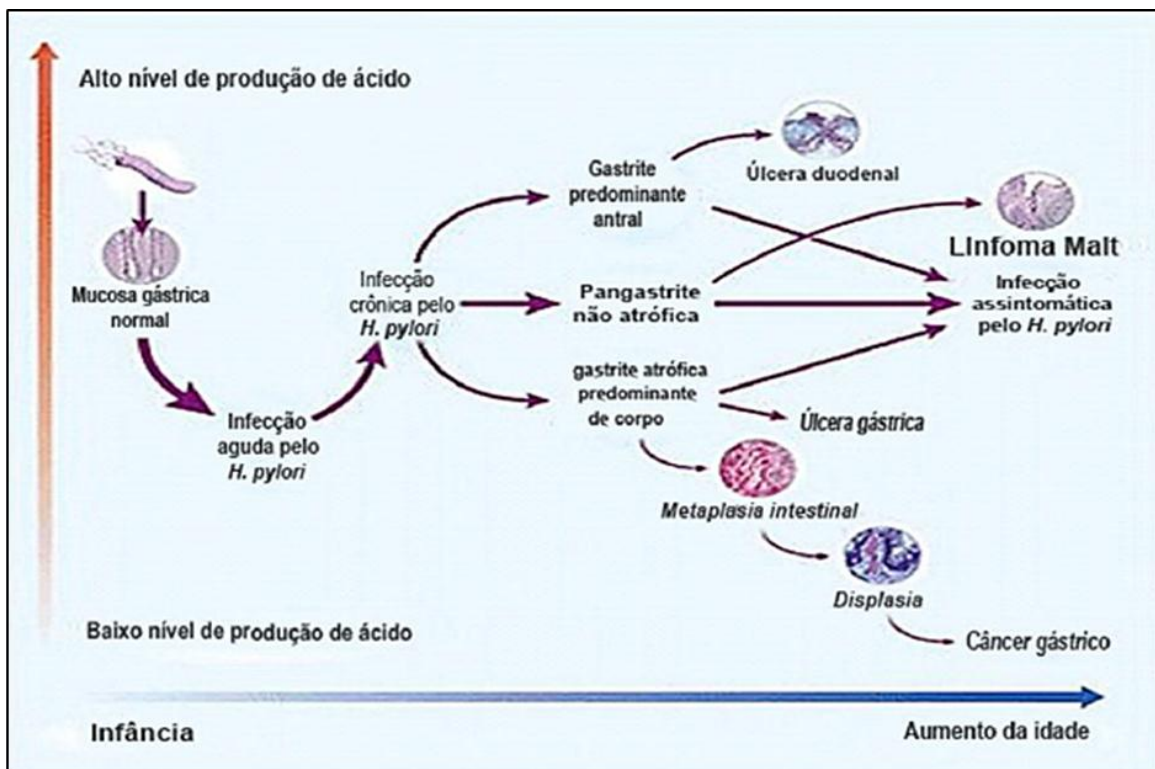


Figura 3. História natural da infecção pelo *Helicobacter pylori*.

Fonte: Suerbaum e Michetti, 2002, p. 1180.

3.6. FATORES DE VIRULÊNCIA

Os fatores virulência compõem os mecanismos patogênicos ao tecido epitelial gástrico e contribuem com três principais efeitos do *H. pylori*: a inflamação gástrica, o rompimento da barreira da mucosa gástrica e a alteração da fisiologia gástrica (DUNN et al, 1997).

Seus flagelos propiciam a locomoção da bactéria através da mucosa gástrica até alcançar o pH mais alcalino abaixo do muco. Essa propriedade também serve como defesa da bactéria contra o peristaltismo gástrico (AGUILAR et al, 2001, TRABULSI, 2002).

A bactéria possui capacidade excepcional de aderência, possibilitando a colonização da mucosa gástrica e áreas de metaplasia gástrica, considerado um fator agravante para seu papel na patogênese da úlcera péptica duodenal (THOMSEN et al, 1990; QUEIROZ e MENDES, 1993). Além disso, possibilita que

substâncias tóxicas produzidas pela bactéria atinjam as proximidades das células epiteliais atuando como estimulante na produção de interleucinas pela própria célula epitelial (MAHDAVI et al., 2002).

A potente atividade de secreção ureásica desempenha papel fundamental na sobrevivência da *H. pylori* em meio ácido. A urease que é liberada hidrolisa a uréia presente no estômago produzindo íons amônia e CO₂ (VOLAND et al., 2003). Os íons de amônia alcalinizam o ácido do estômago nas proximidades da bactéria, fato que possibilita sua persistência e multiplicação (HARVEY et al., 2008).

Todas as cepas da bactéria são portadoras do gene *vacA* (*vacuolating cytotoxin gen A*) que codifica a citotoxina vacuolizante VacA responsável por efeitos citopáticos no epitélio. Como atividade funcional a citotoxina VacA induz a formação de canais seletivos de ânions nas células epiteliais, levando à exsudação de uréia para a luz da mucosa gástrica (DEBELLIS, 2001; SALAMA et al., 2001, TOMBOLA et al., 2001). Cepas portadoras do gene *vacA* são mais comumente isoladas de pacientes com ulcera péptica, atrofia gástrica e câncer gástrico (ARTHERTON et al., 1997).

Além desses, outros múltiplos fatores de virulência estão envolvidos nas patologias associadas ao *H. pylori*, conforme descrito abaixo (Figura 4).

Fatores de Virulência	Função
Proteína de choque térmico (HspB)	Amplifica a produção de urease
Proteína inibidora de ácidos	Induz hipocloridria durante a infecção aguda por bloquear a secreção ácida das células parietais
Mucinase e Fosfolipases	Degrada o muco gástrico
Superóxido dismutase	Impede a destruição fagocítica por neutralizar metabólitos do oxigênio
Catalase	Impede a destruição fagocítica pode neutralizar peróxidos

Figura 4: Fatores de virulência associados ao *H. pylori*

Fonte: MURRAY et. al, 2006.

3.7. GENE CAGA

Muitos dos fatores que contribuem para a patogenicidade do *H. pylori*, incluindo o flagelo, a enzima urease neutralizando o ácido do estômago e a citotoxina vacuolizante VacA, são encontradas em todas as estirpes (MONACK et al., 2004), e a ilha de patogenicidade cag (PAI), tem sido encontrada em cepas isoladas de pacientes com doenças gástricas graves. O segmento de DNA da ilha de patogenicidade cag (PAI), contém 31 genes com quadro de leitura aberta, associados a virulência bacteriana, dentre os quais estão os que codificam componentes do sistema de secreção tipo IV ("seringa" molécula através da qual macromoléculas são injetadas no interior das células gástricas) e o gene *cagA*, um dos mais importantes genes associados a virulência bacteriana (AKOPYANTS et al., 1998).

O gene *cagA*, que codifica a proteína CagA, é considerado um marcador da ilha de patogenicidade cag e está localizado em uma extremidade da ilha de patogenicidade cag (COVACCI et al, 1993) (Figura 5).

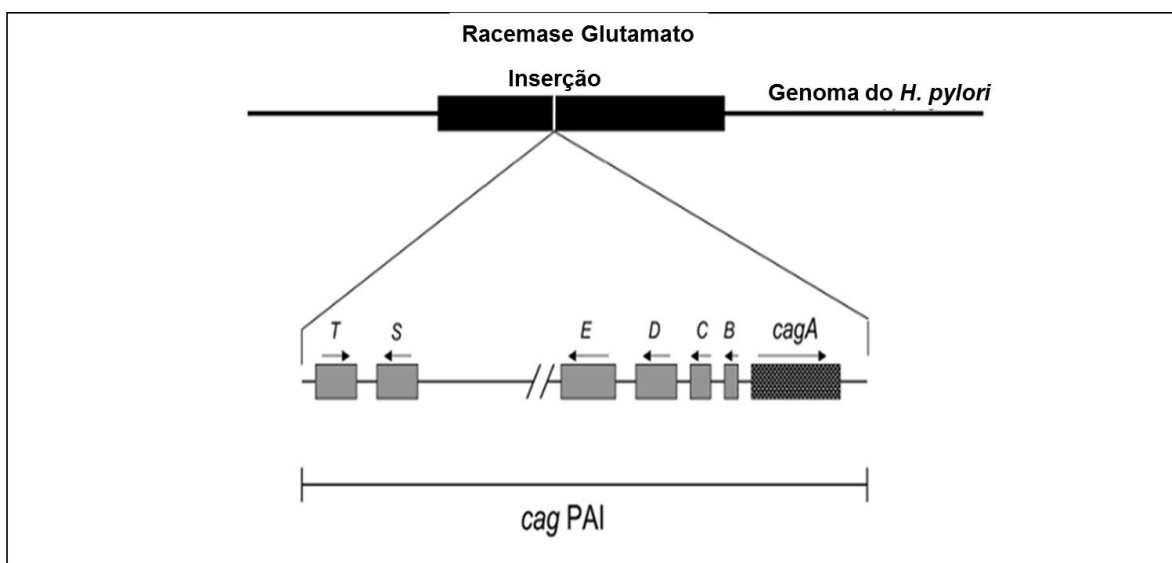


Figura 5. Organização genética da ilha de patogenicidade cag (cag PAI).

Fonte: Hatakeyama, 2004.

Em células de cultura de tecidos, cepas bacterianas que possuem a ilha de patogenicidade *cag* induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-8 (IL-8), que contribui para inflamação gástrica induzida pelo *H. pylori* (BOURZAC e GUILLEMIN, 2005).

O primeiro gene a ser identificado na *H. pylori* foi o cepa-específica *cagA*, o qual está associado intensamente ao risco para o desenvolvimento do câncer gástrico (PEEK et al., 1999). Tipos de *H. pylori* que expressam a proteína CagA provocam inflamação na mucosa gástrica e infecções com esses tipos têm sido relatado mais comumente em úlcera péptica, atrofia gástrica e adenocarcinoma gástrico (MAGALHÃES, 2000). Essas cepas tendem a ser mais virulentas e induzem níveis mais altos de expressão de citocinas, tais como IL-1B e IL-8 (BLASER e BERG, 2001). Parsonnet et al. (1997) mostraram que pacientes infectados por cepas que expressam *cagA* são três vezes mais susceptíveis para o desenvolvimento do câncer gástrico do que aqueles infectados por cepas *cagA* negativos (PARSONNET et al., 1997).

3.8. ATIVIDADE BIOLÓGICA DA CITOTOXINA CagA

Após a adesão de cepas do *H. pylori* que contêm o gene *cagA* ao epitélio celular gástrico, a proteína CagA é injetada diretamente dentro da célula via sistema de secreção tipo IV (BACKERT et al, 2000). Translocados de CagA então localizados na superfície interna da membrana plasmática, sofrem fosforilação em resíduos de tirosina por vários membros da família Src quinases (SFK) (Figura 6) (SELBACH et al, 2002).

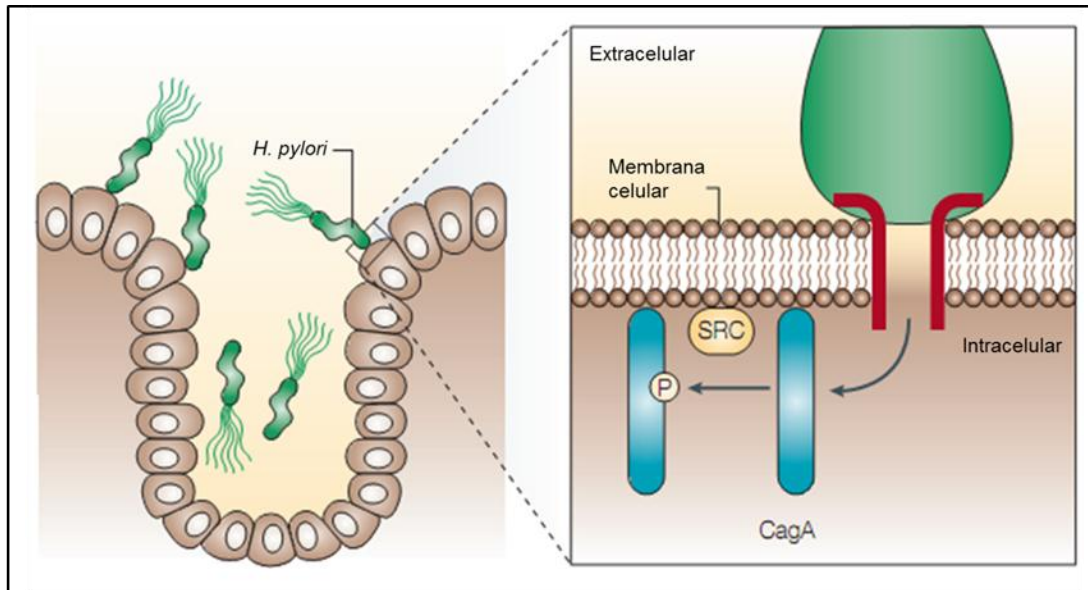


Figura 6. A interação entre *H. pylori* cagA-positivas e células epiteliais gástricas.

Fonte: Hatakeyama, 2004.

Uma vez fosforilada a proteína CagA se liga especificamente a molécula SHP-2, uma proteína tirosina fosfatase que participa na transdução de sinal regulando as atividades celulares, incluindo a morfogênese, proliferação e motilidade celular (FENG e PAWSON, 1994; VAN VACTOR et. al, 1998; YU et. al, 1998; MANES et. al, 1999).

Em geral, a proteína SHP2 medeia transdução de sinais mitogênicos através de uma via envolvendo RAS e proteína quinase ativada por mitógenos (via RAS-MAPK). Vários estudos têm mostrado que a proteína SHP2, sozinha ou em conjunto com RAS, pode ativar a quinase reguladora de sinal extracelular (ERK-MAPK) (MAROUN et. al, 2000) (Figura 7).

A ligação da citotoxina CagA com a molécula SHP-2 utiliza ambos os sítios, resultando na ativação catalítica da fosforilação contínua dessa molécula (HOF et. al, 1998).

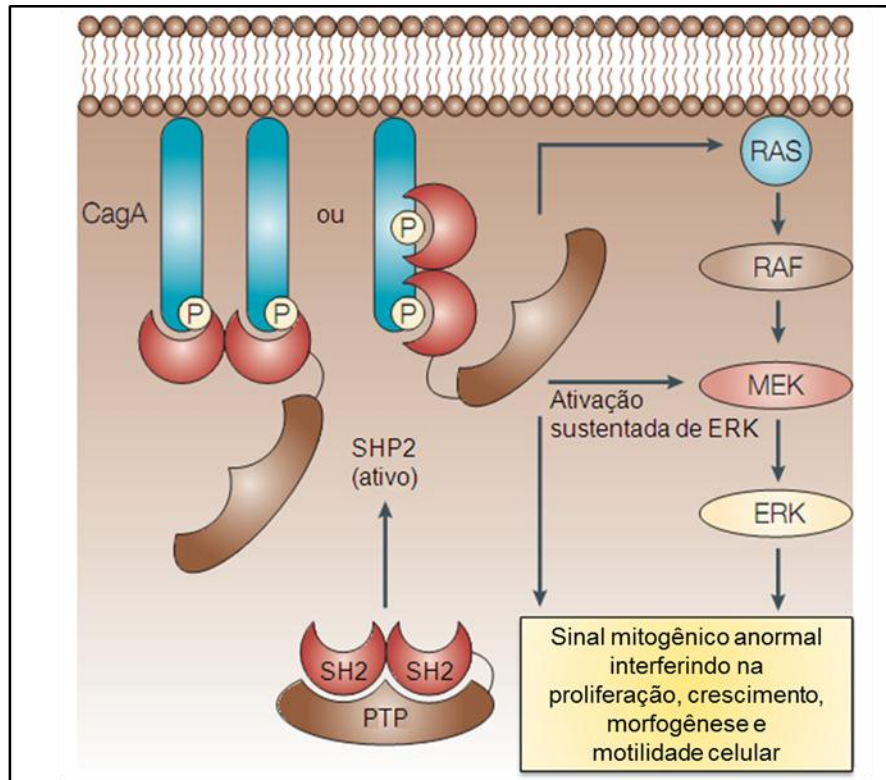


Figura 7. Desregulação da proteína SHP2 por CagA.

Fonte: Hatakeyama, 2004.

3.9. POLIMORFISMO E EPIDEMIOLOGIA DA CITOTOXINA CagA

A Fosforilação da tirosina CagA ocorre no “*motif* EPIYA”, uma seqüência de cinco aminoácidos (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala), que está presente na região carboxi-terminal variável da proteína (HIGASHI et. al, 2002a; HIGASHI et. al, 2002b). O *motif* EPIYA pode ser encontrado na proteína em quatro locais distintos, sendo diferenciados pela seqüência de aminoácidos que circunda a seqüência EPIYA e definidos como EPIYA-A, B, C e D (Figura 8).

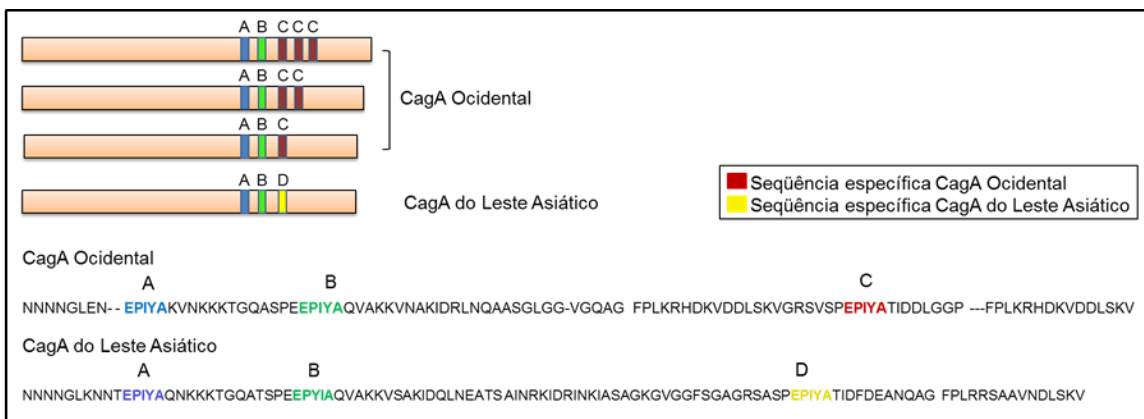


Figura 8. Diversidade nos locais de fosforilação de tirosina de CagA.

Fonte: Hatakeyama, 2004.

As proteínas CagA do *H. pylori* que normalmente circulam nos países ocidentais, como Europa, América do Norte e Austrália (CagA Ocidentais) possuem sítios EPIYA-A e EPIYA-B, seguido pelo sitio EPIYA-C. Esse trecho pode se repetir em diferentes cepas de CagA Ocidentais, então o número de sítios EPIYA-C pode variar de uma cepa CagA Ocidentais para a outra (COVACCI et. al, 1993).

O sítio EPIYA-C constitui o local mais comum de fosforilação de tirosina de proteínas CagA Ocidentais (BACKERT et. al, 2001; STEIN et. al, 2002). Sítos EPIYA-A e EPIYA-B também são fosforiladas em resíduos de tirosina, embora com muito menos freqüência do que EPIYA-C. Proteínas CagA de *H. pylori* isolado dos países do leste asiático como Japão, Coréia e China, conhecidos como “CagA do leste asiático”, possuem apenas os sítios EPIYA-A e EPIYA-B, mas não o EPIYA-C. Contudo, apresentam um outro sitio, denominado EPIYA-D, portanto, considerada como do tipo Cag ABD. O sitio EPIYA-D constitui o local mais comum de fosforilação de tirosina de CagA do leste asiático (Figura 8) (HIGASHI et. al, 2002b).

Um mistério da infecção pelo *H. pylori* é que algumas populações com alta incidência de infecção por *H. pylori*, como aqueles no Japão e Coréia, têm alta incidência de câncer gástrico, ao passo que outras populações altamente

infectadas, como as populações da África central, isso não é observado. As possíveis razões são diferenças na susceptibilidade genética entre as populações, os fatores ambientais tais como hábitos alimentares, e as diferenças cepas de *H. pylori* (HIGASHI et. al, 2002b).

Dentre as diferenças entre as cepas de *H. pylori*, o polimorfismo estrutural da proteína CagA pode estar envolvidos na determinação do tipo e gravidade da doença. As formas orientais e ocidentais de CagA possui estruturas distintas de sítios de fosforilação de tirosina e ligação ao SHP-2, EPIYA-D e EPIYA-C (HIGASHI et. al, 2002b). Souza et al. (2002) relatou recentemente uma sequencia consenso de aminoácidos que se ligariam com alta afinidade a proteína SHP2 (Figura 9) (De SOUZA et al, 2002). A sequência consenso combina perfeitamente com a seqüência encontrada no sítio EPIYA-D, mas difere da sequência de EPIYA-C por um único aminoácido, com isso, EPIYA-D mostra forte ligação à proteína SHP2 e maior atividade morfogenética do que o *motif* EPIYA-C (HIGASHI et. al, 2002b).

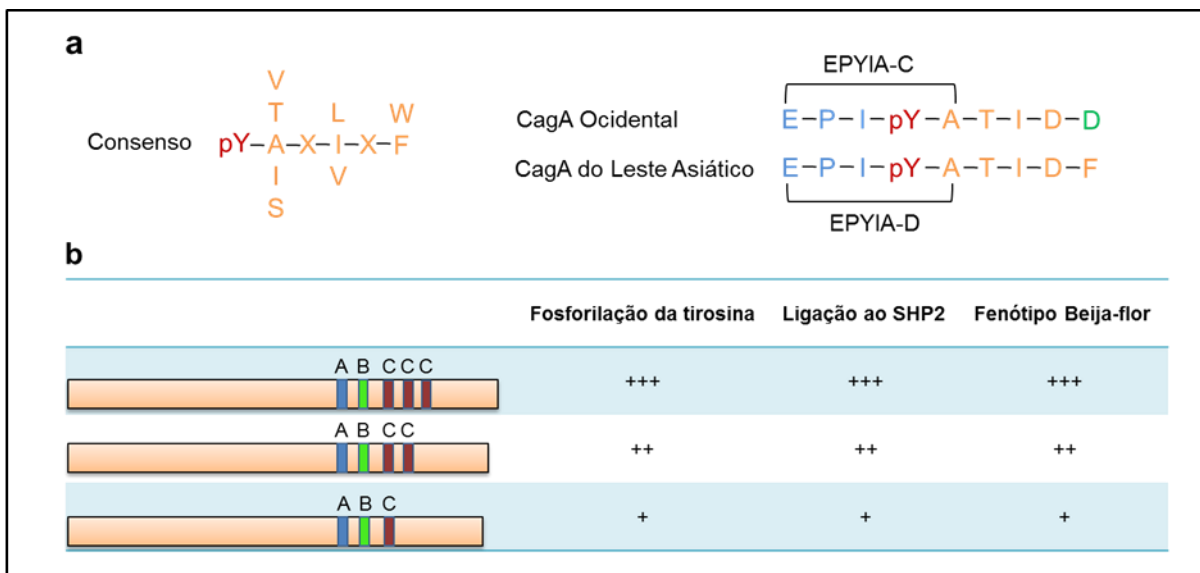


Figura 9. Diferentes propriedades da proteína CagA Ocidental e do Leste Asiático. a) Sequencias de ligação ao SHP2 da citotoxina CagA Ocidental e do Leste Asiático. b) A atividade biológica do CagA Ocidental se correlaciona com o número de sítios EPIYA-C.

Fonte: Hatakeyama, 2004

Notavelmente, os graus de inflamação, atividade da gastrite e atrofia são significativamente maiores em pacientes com gastrite que foram infectados com a cepa do leste asiático CagA positivas do que em pacientes infectados com a cepa cagA-negativos ou CagA positivas ocidentais. Além disso, a prevalência da cepa do leste asiático cagA-positivos está associado com a alta taxa de mortalidade do câncer gástrico na Ásia (AZUMA et. al, 2004).

Entre as cepas CagA ocidentais, o número de sítios EPIYA C está correlacionado diretamente com os níveis de fosforilação, ligação à proteína SHP2 e transformação morfológica (Figura 9) (HIGASHI et. al, 2002b). Além disso, estudos moleculares epidemiológicos têm mostrado que o número de sítos EPIYA C está associada com a gravidade da gastrite atrófica e carcinoma gástrico em pacientes infectados com cepas CagA positivas ocidentais (YAMAOKA et. al, 1999). Estas observações reforçam a idéia de que o potencial da toxina CagA para alterar as funções da célula hospedeira é determinada, pelo menos parcialmente, pelo seu grau ligação à proteína SHP2, que por sua vez é dependente da seqüência da região EPIYA de CagA (HATAKEYAMA, 2004).

3.10. RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO

O epitélio gástrico representa a primeira linha ativa de defesa contra a infecção por *H. pylori*. Além de atuar como uma barreira para excluir patógenos, as células epiteliais secretam mediadores inflamatórios que iniciam a resposta imunológica à invasão do patógeno (SUERBAUM & MICHETTI, 2002).

A adesão e presença de antígenos da bactéria, como a urease, o LPS e as citotoxinas estimulam as células epiteliais da mucosa gástrica a secretarem citocinas pró-inflamatórias, como a IL-8, que é um potente mediador inflamatório, recrutando e ativando neutrófilos, conduzindo a uma rápida mobilização de células fagocíticas para o sítio da infecção (LU et al., 2005; SUERBAUM & MICHETTI, 2002; SERRANO et al., 2007).

Os neutrófilos correspondem ao componente inicial da resposta inflamatória ao patógeno. Porém, quando cronicamente ativados, apresentam

propriedades que contribuem para aumentar a lesão tecidual, pois além de atuarem na fagocitose e digestão das bactérias também liberam potentes enzimas intracelulares e produtos reativos, sendo este evento um mecanismo patogênico importante (LU et al., 2005; SERRANO et al., 2007). A ação dos neutrófilos é persistente, porém ineficaz para a eliminação do *H. pylori* devido à ação de enzimas bacterianas, com a catalase e superóxido dismutase, que protegem a bactéria (RAUTEMAA et al., 2001).

Seguindo a fase de inflamação, a contínua exposição ao patógeno resulta na ativação da resposta imunológica específica. Nesta fase, observa-se a estimulação dos linfócitos T auxiliares (T CD4⁺) que direcionam a resposta imunológica tanto para o perfil Th1 quanto Th2. Contudo, a resposta celular (Th1) é predominante, sendo observado que a maioria dos clones das células CD4⁺, específicas contra o *H. pylori*, secretam Interferon γ (IFN- γ) em resposta à estimulação antigênica, indicando uma resposta com fenótipo Th1 (SUERBAUM e MICHETTI, 2002).

Além da resposta celular, predominante na infecção pelo *H. pylori*, a resposta humoral também é observada. Existem anticorpos, predominantemente do tipo IgG, contra vários antígenos da bactéria, porém estes não conferem proteção e nem evitam nova infecção (SUERBAUM e MICHETTI, 2002).

Tanto os fatores bacterianos quanto os fatores imunológicos do hospedeiro influenciam no desenvolvimento desta resposta imunológica. Estudos sugerem que a citotoxina VacA induza alterações no trânsito intracelular vesicular em células eucarióticas, podendo interferir na apresentação de antígeno ao sistema imunológico por prejudicar o processo e maturação do antígeno pela célula apresentadora de antígeno (AGUILAR et al, 2001; MÜLLER et al., 2002).

O genótipo da cepa de *H. pylori* infectante tem demonstrado associação com a intensificação da resposta imunológica, estimulando elevados graus de inflamação com severos danos às células epiteliais gástricas (LADEIRA et al., 2003; HIRATA et al., 2002).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Detectar as variantes da região carboxiterminal do gene *cagA* de *Helicobacter pylori* isolados de pacientes com gastrite e adenocarcinoma gástrico.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar a prevalência do gene *cagA* nas cepas de *H. pylori* infectantes isoladas da mucosa gástrica dos pacientes com gastrite e adenocarcinoma gástrico;
2. Detectar o polimorfismo da região (EPIYA) do gene *cagA* nas cepas bacterianas presentes nos pacientes com gastrite e adenocarcinoma gástrico;
3. Comparar a prevalência dos polimorfismos do gene *cagA* entre os pacientes com gastrite e aqueles com adenocarcinoma.
4. Associar os polimorfismos do *cagA* como os dados histopatológicos dos pacientes.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. CASUÍSTICA

5.1.1. Caracterização da Amostra

Foram coletadas amostras de biopsias gástricas 384 de pacientes atendidos no Hospital Ofir Loiola no período de maio a novembro de 2010 em Belém-Pará submetidos a endoscopia gástrica dos quais foram coletado amostras de biópsias. Segundo o laudo histológico 194 dos pacientes apresentavam gastrite crônica e 190 apresentavam adenocarcinoma gástrico, sendo 61 do tipo difuso e 129 do tipo intestinal.

Durante a endoscopia, dos pacientes com suspeita de carcinoma foram retiradas 2 biopsias da área adjacente a lesão (perilesão) para análise histológica, e duas amostras do antro para análise utilizando métodos moleculares. Nos pacientes com gastrite foram retiradas 4 biopsias da região antral, sendo 2 para análise histológica e 2 para molecular.

5.1.2 Critérios de Inclusão

Foram inclusos na pesquisa indivíduos de ambos os gêneros, com idade superior a 18 anos, que não estivessem fazendo uso de drogas antagonistas de receptores H2, inibidores de bomba de prótons ou drogas antimicrobianas, a pelo menos 60 dias anteriores à obtenção do material, que não apresentaram alterações das faculdades mentais, assim como, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1).

5.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os indivíduos que não se enquadraram nos critérios de inclusão do estudo.

5.3. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As biópsias recém-chegadas ao laboratório foram fixadas em solução de 10% de formalina em tampão fosfato, onde foram processadas, submetidas a banhos sequenciais de álcoois 70%, 80%, 90%, 100% uma hora em cada, e incluídas em parafina. Posteriormente, foram feitos cortes histológicos sequenciais de aproximadamente 4 mm de espessura, dispostos em lâminas e corado pela Hematoxilina-Eosina (HE), e analisada de acordo com os critérios da classificação histopatológica de Sidney. (DIXON et al., 1996).

5.4. PREPARAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *H. PYLORI*

O DNA genômico foi extraído das amostras de biópsias antrais utilizando o DNA genômico PureLink Mini kit (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

5.5. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CONSTANTE DO GENE *cagA*

A pesquisa da região constante do gene *cagA* foi realizada em todas as amostras. Nos pacientes positivos para essa região foram realizado a determinação do polimorfismo da região variável (EPIYA).

A amplificação da região constante do gene *cagA* foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os primers CagA/ConF 5'-GTGCCTGCTAGTTTGTGTCAGCG-3') e CagA/ConR 5'-TTGGAAACCACCTTTTGTATTAGC-3') (ROTA et al., 2001). A PCR foi preparada num volume de 25 µL contendo 0,5 mM de cada iniciador; 1X tampão de PCR; 1,5 mM MgCl₂; água esterilizada, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo; 1.25u Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e 1 µL de amostra de DNA. As reações foram termocicladas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 ° C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 seg, de

anelamento de 54 °C e extensão à 72 °C durante 30 seg, terminando com 72 ° C durante 10 minutos. Controle negativo e positivo foi utilizado em todas as reações. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com Brometo de Etidium e visualizados em transiluminador de raios UV.

5.6. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3' DO GENE *cagA* E DETERMINAÇÃO DO PADRÃO EPIYA DO GENE *cagA*

A amplificação da região variável de 3' do gene *cagA* foi realizada por PCR com iniciadores previamente descritos por Yamaoka et al. (1998). A PCR foi preparada num volume de 25 µL contendo 0,5 mM de cada iniciador; 1X tampão de PCR; 1,5 mM MgCl₂; água esterilizada, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo; 1.25u Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e 1 µL de amostra de DNA. As reações foram termocicladas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 ° C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 ° C durante 1 min, de anelamento de 56 °C e extensão à 72 °C durante 1 min, terminando com 72 ° C durante 10 minutos.

Dependendo do tipo e número de repetições do motif EPIYA C na sequência do gene, obteve-se produtos de 500 a 850 pb, permitindo também a detecção de infecção mista de acordo com Batista et.al (2011). Controles negativos e positivos foram utilizados em todas as reações. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com Brometo de Etidium e visualizados em transiluminador de raios UV. Os resultados da PCR foram confirmados controles positivos para os diferentes padrões da região EPIYA.

5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação do gene *cagA* e dos *motfs* EPIYA com o desenvolvimento de câncer foi avaliada pelo cálculo de Odds ratio. Os parâmetros histológicos foram

avaliados pelo teste G e Odds ratio. A significância estatística foi aceita de 95%. Para análise dos dados foi utilizado o programa Biostat versão 3.0.

6. RESULTADOS

6.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

O estudo compreendeu a investigação de 384 pacientes com sintomatologias gástricas. Segundo o laudo histológico 50,52% (194/384) dos pacientes apresentavam gastrite crônica e 49,48% (190/384) apresentavam adenocarcinoma gástrico, sendo 32,11% (61/190) do tipo difuso e 67,89% (129/97) do tipo intestinal.

A faixa etária nos pacientes com gastrite crônica foi de 18 a 63 anos, sendo a média de idade de 37,2 anos. Nos pacientes com câncer gástrico, a faixa etária foi de 27 a 90 anos com média de idade 59,9 anos. Comparando-se a faixa etária entre os dois grupos de pacientes, foi observado que os pacientes com adenocarcinoma gástrico apresentaram maior faixa etária ($G=77,4051$ e $p=0,0001$).

Dentre os pacientes portadores de câncer gástrico, 20,53% (39/190) encontravam-se na faixa inferior a 50 anos, 34,21% (65/190) entre 50 e 60 anos e 45,26 % (86/190) acima de 60 anos. Nos pacientes com gastrite, 79,38% (154/194) encontravam-se na faixa inferior a 50 anos, 15,46% (30/194) entre 50 e 60 anos e 5,16 % (10/194) acima de 60 anos (Figura 10).

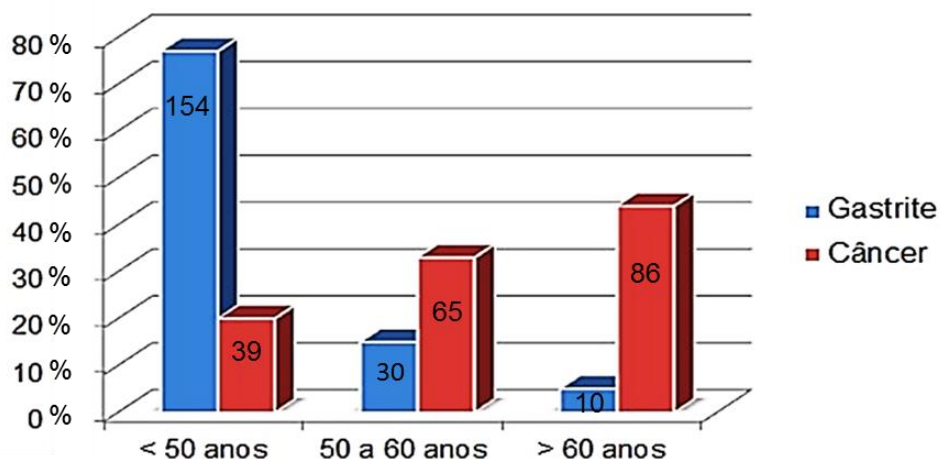


Figura 10. Distribuição da faixa etária por doença diagnosticada.

Quanto à distribuição por gênero, o sexo masculino foi mais prevalente em ambos os grupos. O sexo masculino representou 63,16% (120/190) dos pacientes com câncer, enquanto que no grupo com gastrite foi de 52,58% (102/194). Quanto ao grau de escolaridade, 56,7% (110/194) dos pacientes com gastrite chegaram a cursar pelo menos o ensino médio. O menor grau de escolaridade foi observado no grupo com câncer, sendo representado por 88,42% (168/190) dos participantes cursando até o ensino fundamental (Tabela 1).

Tabela 1. Grau de Escolaridade dos Pacientes do Estudo.

	Gastrite n (%)	Câncer n (%)
Analfabeto	6 (3,09)	29 (15,26)
Fundamental Incompleto	66 (34,02)	110 (57,90)
Fundamental Completo	12 (6,19)	29 (15,26)
Médio Incompleto	32 (16,49)	8 (4,21)
Médio Completo	54 (27,84)	14 (7,37)
Superior Incompleto	10 (5,15)	-
Superior Completo	14 (7,22)	-
Total	194 (100)	190 (100)

6.2 GENOTIPAGEM DO GENE *cagA*

Na caracterização do gene *cagA* das cepas bacterianas, ambos os grupos apresentaram alta prevalência deste gene. Porém, nos pacientes com câncer gástrico essa prevalência foi bem superior aos com gastrite (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição do gene *cagA* nos participantes do estudo.

Gene <i>cagA</i>	Gastrite n(%)	Câncer n(%)	OR (IC-95%)	P
Presente	100 (39,06)	156 (60,94)	4,31 (2,71-6,87)	< 0,001
Ausente	94 (73,44)	34 (26,56)		
Total	194 (100)	190 (100)		

6.3 DETERMINAÇÃO DO MOTIF EPIYA DO GENE *cagA*

Nos 256 pacientes que apresentaram cepas de *H. pylori* que possuíam o gene *cagA* foram pesquisados os diferentes *motifs* EPIYA da região 3' do gene *cagA*. A distribuição dos *motifs* EPIYA está presente na Tabela 3.

Tabela 3. Padrão e distribuição da região EPIYA do gene *cagA* associado ao tipo de doenças.

Padrão EPIYA		Gastrite n (%)	Câncer n (%)
Mono Infecção	EPIYA-AB	4 (5,40)	4 (5,26)
	EPIYA-ABC	42 (56,76)	19 (25)
	EPIYA-ABCC	26 (35,14)	25 (32,90)
	EPIYA-ABCCC	2 (2,70)	28 (36,84)
Infecção Mista	EPIYA-ABC / ABCC	20 (76,92)	33 (41,25)
	EPIYA-ABC / ABCCC	-	2 (2,5)
	EPIYA-ABCC / ABCCC	2 (7,7)	14 (17,5)
	EPIYA-ABC / ABCC / ABCCC	4 (15,38)	31 (38,75)

A mono infecção foi mais frequente nos paciente com gastrite representando 74% (74/100) destes. Já nos pacientes com adenocarcinoma gástrico esta característica foi observada em 48,72% (76/156).

A infecção mista foi observada em ambos os grupos estudados. Porém, foi mais freqüente nos pacientes com câncer gástrico representado por 51,28% (80/156), enquanto que nos pacientes com gastrite este tipo de infecção representou 26% (26/100).

Analisando-se os pacientes mono infectados quanto a infecção por cepas portadoras de padrões EPIYA de baixo risco (aquelas que apresentavam até um *motif* EPIYA C) e alto risco (aquelas que apresentavam dois ou mais *motifs* EPIYA C), observou-se maior prevalência do padrão de maior risco nas cepas isoladas dos pacientes com adenocarcinoma gástrico (tabela 4).

Tabela 4. Padrão e distribuição da região EPIYA do gene *cagA* associado ao tipo de doenças

Padrão EPIYA		Gastrite n(%)	Câncer n(%)	OR (IC-95%)	P
Mono Infecção	EPIYA (AB ou ABC)	46 (59,46)	23 (32,89)	3,79 (1,92-7,46)	< 10 ⁻³
	EPIYA (ABCC ou ABCCC)	28 (40,54)	53 (67,11)		

Entre os pacientes com infecção mista, não foram encontrados cepas mistas de baixo risco, de acordo com o critério adotado, já que todas as cepas apresentavam duas ou mais regiões C.

6.4. ASSOCIAÇÕES ENTRE OS DADOS MOLECULARES E OS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS.

Em relação à presença do gene *cagA*, houve diferença significativa nos níveis de grau de inflamação e atividade neutrofílica entre os pacientes infectados por cepas contendo o gene *cagA* daqueles infectados por cepas sem este gene de virulência (tabela 5 e 6).

Tabela 5. Associação da presença do gene *cagA* e o Grau de Inflamação

gene <i>cagA</i>	Grau de inflamação		OR (IC-95%)	P
	Leve n (%)	Mod/Int n (%)		
Presente	39 (15,23)	217 (84,77)	3,57 (2,18 – 5,84)	0,0001
Ausente	50 (39,06)	78 (60,94)		

Mod/Int = Moderado à intenso.

Tabela 6. Associação da presença do gene *cagA* e Atividade neutrofílica

gene <i>cagA</i>	Atividade neutrofílica		OR (IC-95%)	P
	Leve n (%)	Mod/Int n (%)		
Presente	51 (20)	205 (80)	11,11 (5,48 – 22,30)	0,0001
Ausente	94 (73,44)	34 (26,56)		

Mod/Int = Moderado à intenso.

Quando analisado o padrão EPIYA de pacientes mono infectados com o grau de inflamação e a atividade neutrofílica, não houve diferença significativa entre os padrões e as variáveis histopatológicas estudados (tabela 7 e 8).

Tabela 7. Associação entre o polimorfismo EPIYA do gene *cagA* de pacientes mono infectados e o grau de Inflamação.

Polimorfismo	Grau de Inflamação		Total
	Leve n (%)	mod/int n (%)	
EPIYA-AB	-	8 (5,33)	8 (5,33)
EPIYA-ABC	9 (6)	52 (34,67)	61 (40,67)
EPIYA-ABCC	9 (6)	42 (28)	51 (34)
EPIYA-ABCCC	4 (2,67)	26 (17,33)	30 (20)
TOTAL	22 (14,67)	128 (85,33)	150 (100)

$G_{willians}=2.73$; $p= 0.44$

Mod/Int = Moderado à intenso.

Tabela 8. Associação entre o polimorfismo EPIYA do gene *cagA* de pacientes mono infectados e a atividade neutrofílica.

Polimorfismo	Atividade neutrofílica		Total
	Leve n (%)	mod/int n (%)	
EPIYA-AB	-	8 (5,33)	8 (5,33)
EPIYA-ABC	13 (8,67)	48 (32)	61 (40,67)
EPIYA-ABCC	12 (8)	39 (26)	51 (34)
EPIYA-ABCCC	4 (2,67)	26 (17,33)	30 (20)
Total	29 (19,33)	121 (80,67)	150 (100)

$G_{willians}=4,63$; $p=0,20$

Mod/Int = Moderado à intenso.

Dos 384 participantes do estudo, 11,72% (45/384) dos pacientes apresentaram metaplasia segundo laudo histopatológico, destes 91,11% (41/45) tinham adenocarcinoma gástrico e 8,89% (4/45) gastrite.

Nos pacientes que apresentaram metaplasia foi observado uma alta frequência de cepas bacterianas com o gene *cagA* e com duas ou mais repetições do *motif C* (Tabela 9 e 10).

Tabela 9. Associação do gene *cagA* a presença de metaplasia.

Gene <i>cagA</i>	Metaplasia		OR (IC-95%)	p
	Presente n (%)	Ausente n (%)		
Positivo	39 (15,23)	217 (84,77)	3,65 (1,50-8,88)	0,004
Negativo	6 (4,69)	122 (95,31)		
Total	45	339		

Tabela 10. Associação do polimorfismo da região EPIYA dos participantes do estudo mono infectados e a presença de metaplasia.

<i>Padrão EPIYA</i>	Metaplasia		OR (IC-95%)	p
	Presente n (%)	Ausente n (%)		
EPIYA (AB ou ABC)	4 (7,89)	65 (92,11)	4,98 (1,60-15,46)	0,005
EPIYA (ABCC ou ABCCC)	19 (22,97)	62 (77,03)		
Total	23	127		

7. DISCUSSÃO

A prevalência de *H. pylori* difere significativamente entre e dentro dos países. Aproximadamente, 40 e 80% dos indivíduos adultos em países desenvolvidos e em desenvolvimento estão infectados, respectivamente (TIMÓTEO & MARTIN, 1995). Estudos anteriores relatam a importância da idade, sexo e baixo nível socioeconômico como preditores para a aquisição da infecção por *H. pylori* (ALBORZIA et al., 2006; GOODMAN & COCKBURN, 2001; HAZEL & FRANCIS, 2002).

Neste estudo se analisou como um fator socioeconômico o grau de escolaridade, sendo observada alta prevalência da infecção em pacientes apresentando menor grau de escolaridade, com 65,63% (252/384) dos participantes tendo como máximo grau de escolaridade o ensino fundamental. Em um estudo realizado no Irã, Sheikhan et al. (2011) também encontraram resultados semelhantes, com associação positiva para o nível de educação, assim como, Santos et al. (2011) analisando os fatores de risco associados em adulto do sudeste do Brasil.

Analisando a prevalência da infecção quanto ao gênero, os resultados indicaram associação do sexo sobre a prevalência da infecção pelo *H. pylori*, sendo mais prevalente no sexo masculino. Resultado semelhante foi encontrado por Repogle et al. (1995) e Broutet et al. (2001) descrevendo uma prevalência significativamente maior da infecção por *H. pylori* em homens.

Na comparação da frequência do sexo nos grupos estudados, o sexo masculino foi mais frequente em ambos os grupos, contudo foi maior no grupo com câncer, estando de acordo com outras publicações (RANGEL et al., 2003; YAMAGATA et al., 200). Porém, há divergência desses resultados com outros trabalhos encontrados na literatura, onde o sexo feminino foi mais frequente, resultados que podem ser influenciados por fatores sócio-culturais, como por exemplo, o aumento da participação do sexo feminino no mercado de trabalho, estando dessa forma mais exposta a fatores ambientais, alimentação inadequada, consome de álcool e fumo (CÉSAR et al., 2002 e PLUMMER et al., 2004).

Vários estudos tem demonstrado que o gene *cagA*, está relacionado com o aparecimento de gastrite crônica, metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico (FARINATI et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2001). Gatti et al. (2006) observaram que cerca de 80% dos pacientes com gastrite crônica apresentavam o *H. pylori* com genótipo *cagA* positivo. Na Colômbia, 72% a 90% das cepas de *H. pylori* possuem o gene *cagA* (BRAVO et al, 2002; QUIROGA et al., 2005), e a incidência de câncer gástrico é elevado (PINEROS et al., 2006). Esses achados evidenciam que a infecção por cepas altamente patogênicas da bactéria podem ser utilizados como marcadores para um maior risco de adenocarcinoma gástrico (ENROTH et al., 2000).

Na caracterização do gene *cagA* das cepas bacterianas isoladas dos participantes deste estudo, ambos os grupos apresentaram alta prevalência do gene *cagA*. Porém, nos pacientes com câncer gástrico essa prevalência foi bem superior aos com gastrite, apresentando forte associação para o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico.

A citotoxina CagA tem sido associada a um aumento da prevalência e intensidade de atrofia antral e metaplasia intestinal, além de maiores graus de infiltração celular com uma grande densidade de células polimorfonucleares na mucosa gástrica (SARUC et al., 2002; UMIT et al., 2009). Um alto grau de infiltração polimorfonuclear por longo período de tempo pode ser um fator de risco para a carcinogênese, já que o intenso processo oxidativo produzido pela desgranulação das células em mucosa gástrica libera substâncias com potencial mutagênico (CORREA, 1995). No presente estudo foi observado associação positiva entre o status *cagA* com a atividade neutrofílica, o grau de inflamação e metaplasia. Outros estudos realizados no Brasil e em Belém apresentam dados similares, demonstrando que a infecção por essas cepas se relaciona com evoluções mais graves. (THOMAZINI et al., 2006; VINAGRE et al., 2011).

Tem sido demonstrado que, além da presença do gene *cagA*, o padrão polimórfico do motif EPIYA da região carboxi-terminal deste gene influencia o grau de virulência, bem como o potencial oncogênico (BASSO et al., 2008, NAITO et al., 2006). Além disso, entre as cepas ocidentais, o fator mais importante para o

risco de câncer é o número de repetições do motif EPIYA-C (BASSO et al., 2008). A fim de avaliar a relevância clínica das variações da região 3' região do gene *cagA* sobre o desenvolvimento de câncer gástrico, analisou-se o padrão EPIYA de cepas de *H. pylori cagA* positivas isoladas dos pacientes do estudo. Os resultados mostraram maior número de segmentos EPIYA-C nos pacientes com câncer gástrico, estando estatisticamente associados. O risco de câncer gástrico aproximadamente 3 vezes maior em pacientes infectados com cepas *cagA* positivas com dois ou três motifs EPIYA-C, em comparação com pacientes infectados com cepas *cagA* positivas sem ou apenas um motif EPIYA-C. Como observado em estudos anteriores (BASSO et al., 2008, YAMAOKA et al., 1998, YAMAOKA et al., 1999), com cepas *cagA* com maior número de motifs EPIYA-C foram associados com maior risco de câncer gástrico do que cepas com apenas um motivo EPIYA-C. Contudo, não houve associação entre o padrão EPIYA e os achados histológicos, concordando com os resultados obtidos por QUEIROZ et al, (2011). Porém, houve discordâncias desses dados com outros trabalhos da literatura (SICINSCHI et al, 2010; FERREIRA et al, 2009).

Também se analisou se a colonização por diferentes cepas (infecção mista) pode ser associada com a evolução da doença. Observou-se que pacientes com câncer gástrico foram mais freqüentemente colonizado por cepas mistas, enquanto os pacientes com gastrite teve um tendência para a colonização mista menos intensa. Queiroz et al. (2011) revelaram ainda que a infecção por cepa mista foi significativamente mais freqüente em pacientes com câncer gástrico do que naqueles com gastrite.

8. CONCLUSÃO

1. Os pacientes com câncer gástrico apresentaram maior frequência do gene *cagA* comparado aos pacientes com gastrite, estando associado com a evolução para câncer gástrico.
2. Pacientes infectados por cepas contendo o gene *cagA* apresentaram maior grau de inflamação e atividade neutrofílica, além de apresentarem maior associação com o desenvolvimento de metaplasia intestinal.
3. As cepas de *H. pylori* que apresentaram polimorfismo da região (EPIYA) considerado de alto risco foi predominante nos pacientes com câncer gástrico apresentando significância estatística positiva para o desenvolvimento desta doença.
4. Pacientes infectados por cepas de alto risco quanto ao polimorfismo da região EPIYA não mostraram associação com o aumento do grau de inflamação e atividade neutrofílica, contudo apresentou-se associado com o desenvolvimento de metaplasia intestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, DCF; CORVELO, TC; ARAÚJO, M; CRUZ, E.M; DAIBES, S; ASSUMPÇÃO, M.B. Expressão dos antígenos ABH e Lewis na gastrite crônica e alterações pré-neoplásicas da mucosa gástrica. **Arq Gastroenterology**. v. 39, n. 4, p. 222-32, 2002.

AGUILAR, GR, AYALA, G, FIERROS-ZÁRATE, G. *Helicobacter pylori*: Recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. **Salud pública Méx**, v.43, n.3, p.237-247, 2001.

AHMED, N. 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*: Is the debate over? **Ann Clin Microbiol**, v.4, n.17, 2005.

AKOPYANTS, NS; CLIFTON, SW; KERSULYTE, D; CRABTREE, JE; YOUREE, BE; REECE, CA; BUKANOV, NO; DRAZEK, ES; ROE, BA; BERG, DE. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. **Mol Microbiol** 28, 37–53, 1998.

ÁLVARES, MMD; MARINO, M; OLIVEIRA, CA; MENDES, CC; COSTA, ACF; GUERRA, J; QUEIROZ, DMM; NOGUEIRA, AMMF. Características da gastrite crônica associada a *Helicobacter pylori*: aspectos topográficos, doenças associadas e correlação com o status cagA. **J Bras Patol Med Lab**. 42(1):51-59, 2006.

AL-MOAGEL, MA; EVANS, DG; ABDULGHANI, ME. et al. Prevalence of *Helicobacter* (formerly *Campylobacter*) *pylori* infection in Saudi Arabia: and comparison of those with and without upper gastrointestinal symptoms. **Am J Gastroenterol**, v.85, p.944e948, 1990.

ATHERTON, JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. **Gut**, v.40, p.701-3, 1997.

AYRES, M; AYRES, MJR; AYRES, DL; SANTOS, AS. Bioestat 5.0 –Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. **Sociedade Civil Mamirauá MCT – CNPq**, 2005.

AZUMA, T; YAMAZAKI, S; YAMAKAWA, A; OHTANI, M, MURAMATSU, A; SUTO, H; ITO, Y; DOJO, M; YAMAZAKI, Y; KURIYAMA, M; KEIDA, Y; HIGASHI, H; HATAKEYAMA, M. Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer. **J. Infect. Dis.** 189:820–827, 2004.

BACKERT, S; ZISKA, E; BRINKMANN, V et al. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. **Cell Microbiol** 2: 155–64, 2000.

BACKERT, S; MOESE, S; SELBACH, M; BRINKMANN, V; EYER, TF. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. **Mol. Microbiol.** 42:631–644, 2001.

BATISTA, SA; ROCHA, GA; ROCHA, AM; SARAIVA, IE; CABRAL, MM; OLIVEIRA, RC; QUEIROZ, DM. Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. **BMC Microbiol** 11, 61, 2011.

BARILE, KAS; MARTINS, LC; AMARAL, RKC; LOIOLA, RSP; CORVELO, TCO. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children and mothers in the Northern Region of Brazil. **Rev Panam Infectol.** 11(4):6-12, 2009.

BLASER, M.J; BERG, D.E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. **J. Clin. Invest**, 107(7):767-73, 2001.

BLASER, MJ; PEREZ-PEREZ, GI. *Helicobacter pylori* and other gastric Helicobacter-like organisms. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4th ed., [S.l.: s. n.], 1996, cap. 23, Não paginado. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed.section.1336>>. Acesso em: 19 sep. 2010.

BOURZAC, KM; BOURZAC, KG. *Helicobacter pylori*–host cell interactions mediated by type IV secretion. **Cellular Microbiology** 7:911–919, 2005.

BRUCE, MG; MAAROOS, HI. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter** 13: 1-6, 2008.

CARTÁGENES, VD; MARTINS, LC; CARNEIRO, LM; BARILE, KAS; CORVELO, TC. *Helicobacter pylori* em crianças e associação de cepas CagA na transmissão mãe-filho na Amazônia brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42(3):298-302, mai-jun, 2009

COVACCI, A; CENSINI, S; BUGNOLI, M et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. **Proc Natl Acad Sci USA** 90: 5791–5, 1993.

DEBELLIS, L. PAPINI, E; CAROPPO, R; MONTECUCCO, C; CURCI, S. *Helicobacter pylori* cytotoxin VacA increases alkaline secretion in gastric epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.281, p.1440-1448, 2001.

DELTENRE, M; KOSTER, E. How come I've got it? **European Journal of Gastroenterology & Hepatology** 12:479-482, 2000.

DE SOUZA, D; FABRI, LJ; NASH, A; HILTON, DJ; NICOLA, NA; BACA, M. SH2 domains from suppressor of cytokine signaling-3 and protein tyrosine phosphatase SHP-2 have similar binding specificities. **Biochemistry** 41:9229–9236, 2002.

DUNN, B. E; COHEN, H; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.l.], v. 10, n. 4, p. 720-734, Oct. 1997

EISIG, J. N.; SILVA, F.M. *Helicobacter pylori*. **Rev Bras Med.** 6, 59: 342-439, 2002.

FENG, GS; PAWSON, T. Phosphotyrosine phosphatases with SH2 domains: regulators of signal transduction. **Trends Genet.** 10:54–58, 1994.

FIEDOREK, SC; MALATY, HM; EVANS, DL; PUMPHREY, CL; CASTEEL, HB; EVANS, JR, D.J; GRAHAM, D.Y. Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. **Pediatric**, v.88, n.3, p.578-82, 1991.

FORMAN, D. et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. **Br. Med. J.**, v.302, p.302-5, 1991.

GALPIN, OP; WHITAKER, CJ; DUBIEL, AJ. *Helicobacter pylori* infection and overcrowding in childhood. **Lancet**, v.339, p.619, 1992.

GOBERT, AP; MARSEY, BD; CHENG, Y; BLUMBERG, DR; NEWTON, JC; WUILSON, KT. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macro-phage inducible nitric oxide synthase. **J Immunol.** 168: 6002-6006, 2002.

GOODWIN, CS; ARMSTRONG, JA; CHILVERS, T; PETERS, M; COLLINS, MD; SLY, L; MCCONNELL, W; HARPER, W.E.S. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pyloricomb.* nov. and *Helicobacter mustelae comb. nov.*, respectively. **Int J Syst Bacteriol.**, n.39, p.397-405, 1989.

GRAHAM, DY; ADAM, E; REDDY, GT et al. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. Comparison of developing and developed countries. **Dig Dis Sci**, v.36, p.1084-1088, 1991

HAN, S; ZSCHAUSCH, HE; MEYER, HW; SCHNEIDER, T; LOOS, M; BHAKDI, S; MAEURER, MJ. *Helicobacter pylori*: clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. **Journal of Clinical Microbiology** 38:3646-3651, 2000.

HARVEY, RA; CHAMPE, PC; FISHER, BD. **Microbiologia Ilustrada 2ª Edição** 341, 2008.

HATAKEYAMA, M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* Caga protein. **nature reviews cancer** 4:688–694, 2004.

HIGASHI, H; TSUTSUMI, R; FUJITA, A et al. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 14 428–33.a 2002.

HIGASHI, H; TSUTSUMI, R; MUTO S et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. **Science** 295: 683–686, 2002.

HIRATA, Y; MAEDA, S; MITSUNO, Y. *Helicobacter pylori* CagA protein activates serum response element – driven transcription independently of tyrosine phosphorylation. **Gastroenterology**, 123(6):1962-1971, 2002.

HOF, P; PLUSKEY, S; DHE-PAGANON, S; EOK, MJ; SHOELSON, SE. Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. **Cell** 92:441–450, 1998.

KIDD, MAJ; LASTOVICA, JC; ATHERTON. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? **Gut** 45:499–502. 1999.

KIM, N; LIM, SH; LEE, KH; CHOI, SE; JUNG, HC; SONG, IS; KIM, CY. Long-term effects of *Helicobacter pylori* eradication on intestinal metaplasia in patients with duodenal and benign gastric ulcers. **Dig Dis Sci**. v.45, p.1754-62, 2000.

KUSTERS, KJG; VLIET, AHMV; KUIPERS, EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, 19(3) 449-490, 2006.

LEE, JH; SHIN, JH; ROE, IH; SOHN, SG; KANG, GH; LEE, HK; JEONG, BC; LEE, SH.. Impact of Clarithromycin Resistance on Eradication of *Helicobacter pylori* in Infected Adults . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49(4):1600-1603, 2005.

LEUNG, WK; SIU, KLK; KWOK, CKL; CHAN, SY; SUNG, R; SUNG, JJY. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. **The American Journal of Gastroenterology** 94:2881-2884, 2004.

MAHDAVI, J; SONDEN, B; HURTIG, M et al. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. **Science**, 297:573–8, 2002.

MALATY, HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. 21(2):205-14, 2007.

MAGALHÃES, AFN. Úlcera péptica. **Rev Bras Med**, 57(11): 1203-1204, 2000.

MANES, S. et al. Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility. **Mol. Cell. Biol.** 19:3125–3135, 1999.

MONACK, DM; MUELLER, A; AND FALKOW, S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. **Nat Rev Microbiol** 2:747–765, 2004.

MAROUN, CR; NAUJOKAS, MA; HOLGADO-MADRUGA, M; WONG, AJ; PARK, M. The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. **Mol. Cell. Biol.** 20:8513–8525, 2000.

MARSHALL, BJ. Unidentified curved bacilli on gastric in active chronic gastritis. **Lancet**, 1:1273-1275, 1983.

MARSHALL, BJ; WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, 1(8390):1311-5, 1984.

MARSHALL, BJ. *Helicobacter pylori*: 20 years on. **Clin Med**, 2(2):47-152, 2002.

MARTINS, LC; CORVELO, TCO; OTI, HT; BARILE, KAS. Soroprevalência de anticorpos contra o antígeno *cagA* do *Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera gástrica na região Norte do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 35(4):307-10, 2002.

MARTINS, LC; CORVELO TC; DEMACHKI S; ARAÚJO MT; ASSUMPÇÃO MB; VILAR SC; FREITAS FB; BARBOSA HP; FECURY, AA; AMARAL, RK; SANTOS, SE. Clinical and pathological importance of *vacA* allele heterogeneity and *cagA* status in peptic ulcer disease in patients from North Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 100:875-81, 2005.

MÉGRAUD, F; BRASSENS-RABBÉ, MP; DENIS, F; BELBOURI, A; HOA, DQ. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. **J. Clin. Microbiol**, 27(8):1870-3, 1989.

MENDALL, MA; GOGGIN, PM; 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.896-7, 1992.

MITCHELL, HM; LI, YY; HU, PJ; LIU, Q; CHEN, M; DU, GG; WANG, ZJ; LEE, A; HAZELL, SL. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in Southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition. **J. Infect. Dis**, 166:149-53, 1992.

MÜLLER, I, MEDINA-SELBY, A; PALACIOS, JL et al. Cloning and comparison of ten gene sequences of a Chilean *H. pylori* strain with other *H. pylori* strains revealed higher variability for VacA and CagA virulence factors. **Biol. Res.** v.35, n.1, p.67-84, 2002.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Campylobacter e Helicobacter. In: _____. **Microbiologia médica. 5. ed.** Rio de Janeiro: Elsevier, Cap. 33, p. 339-347. 2006.

NIHCC (National Institute of Health Consensus Conference). *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. **JAMA**, v.272, p.65-9, 1994.

OLIVEIRA, AMR; QUEIROZ, DMM; ROCHA, GA; MENDES, EN. Soroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. **Am. J. Gastroenterol.** v. 89, p. 2201-04, 1994.

PALLI, D; MASALA, G; DEL GIUDICE, G; et al. CagA+ *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk in the EPIC-EURGAST study. **Int J Cancer**;120:859–867. 2007.

PAJARES, JM.; GISBERT, JP. *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. **Rev Esp Enferm Dig**, v.98, n.10, p.770-785, 2006.

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

PARSONNET, J; SHMUELY, H; HAGGERTY, T. Excreção fecal e oral de *Helicobacter pylori* por adultos sadios infectados. **Journal of American Medical Association - Brasil** 4:2935-2944, 2000.

PEEK, RM et al. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. **Cancer Res**, v.59, p.6124-31, 1999.

PEEK, RM JR; BLASER MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. **Nat Rev Cancer**;2:28–37, 2002.

QUEIROZ, D. M. M.; MENDES, E. N. H. *Helicobacter pylori* e outros microrganismos espiralados gástricos: aspectos microbiológicos. In: CASTRO, L. P.; Rocha, P. R. S.; Coelho, L. G. V. (eds.) Tópicos em gastroenterologia. São Paulo: Medsi. 4: 235-248, 1993.

ROTA, CA; PEREIRA-LIMA, JC, BLAYA, C; NARDI, NB. Consensus and variable region PCR analysis of *Helicobacter pylori* 39 region of *cagA* gene in isolates from individuals with or without peptic ulcer. **J. Clin. Microbiol.** 39:606–612. 2001.

SALAMA, NR. et al. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* lays a role during colonization in a mouse model of infection. **Infect. Immun**, v.69, n.2, p.730-6, 2001.

SATO, F; SAITO, N; KONISHI, K; SHOJI, E; KATO, M; TAKEDA, H; SUGIYAMA, T; ASAKA, M. Ultrastructural observation of *Helicobacter pylori* in glucose-supplemented culture media.

SELBACH, M; MOESE, S; HAUCK, CR; MEYER, TF; BACKERT, S. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. **J Biol Chem** 6775–8, 2002.

SIAVOSHI, F; SALMANIAN, AH; KBARI, FA; MALEKZADEH, R; MASSARRAT, S. Detection of *Helicobacter pylori*-specific genes in the oral yeast. **Helicobacter** 10:318-322, 2005.

SOUTO, FJD; FONTES, CJ; ROCHA, GA; OLIVEIRA, AM; MENDES, EN; QUEIROZ, M. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a rural area of the state of Mato Grosso, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 93, n. 2, p.171-74, 1998.

SOUZA, J. Belém tem alta incidência de câncer gástrico. **Beira do Rio - Jornal da Universidade Federal do Pará**, Belém, p. 79, 16 mar. 2010.

STEIN, M; RAPPUOLI, R; COVACCI, A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. **Proc. Natl Acad. Sci.USA** 97:1263–1268, 2000.

SUERBAUM, S; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* infection. **N Engl J Med.** v. 347, n. 15, p. 1175-86, 2002.

TAYLOR, D. N; BLASER, M. J. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Epidemiology Reviews**, v.13, p.42-59, 1991.

THOMSEN, LL; GAVIN, BJ.; TASMAN-JONES, C. Relation of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa in chronic gastritis of the antrum. **Gut.** 32(1): 230-236,1990.

TOMBOLA, F. et al. The *Helicobacter pylori* toxin is a urea permease that promote urea diffusion across epithelia. **J. Clin. Invest.**, v.108, n.6, p.929-37, 2001.

TRABULSI, L. **Microbiologia.** 3. Ed. São Paulo – SP: Atheneu; 2002.

VOLAND, P; WEEKS, DL.; MARCUS, EA.; PRINZ, C; SANCHS, G; SCOTT, D. Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 284:96-106, 2003.

VAN VACTOR, D; O'REILLY, AM; NEEL, BG. Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. **Curr. Opin. Genet.** 8:112–126, 1998.

WHO (World Health Organization). The evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: **International Agency for Research on Cancer**, Monograph nº 61, 1994.

YAMAOKA, Y; EL-ZIMAITY, HM; GUTIERREZ, O; FIGURA, N; KIM, JG; KODAMA, T; KASHIMA, K; GRAHAM, DY. Relationship between the cagA 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. **Gastroenterology** 117, 342–349. 1999

YAMAOKA, Y; KIKUCHI, S; EL-ZIMAITY, HM; GUTIERREZ, O; OSATO, MS; GRAHAM, DY. Importance of *Helicobacter pylori* ipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. **Gastroenterology** 123, 414–424. (2002).

YAMAOKA, Y; KODAMA, T; KASHIMA, K; GRAHAM, DY; SEPULVEDA, AR. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. **J Clin Microbiol** 1998; 36: 2258-63.

YU, IH; QU, CK; HENEGARIU, O; LU, X; FENG, GS. Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. **J. Biol. Chem.** 273:21125–21131, 1998.

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

Título: Associação das Variantes da Região Carboxiterminal do Gene *cagA* de *Helicobacter pylori* com o Desenvolvimento de Distúrbios Gastroduodenais em Belém-Pará.

Esclarecimentos sobre a Pesquisa

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria que causa doenças no estômago e no intestino, tais como gastrite e câncer de estômago. Contudo, existem diferentes tipos (cepas) de *H. pylori*. Esta pesquisa possui como principal objetivo estudar quais são os tipos de bactérias que estão associadas com as diferentes doenças do estômago. Com essa finalidade prestamos os seguintes esclarecimentos:

1 - Serão realizados exames de biópsias do estômago para saber qual o tipo de *H. pylori* que o paciente tem.

2 - A pesquisa oferece riscos mínimos para o participante, referente à endoscopia com biópsia por profissional especializado.

3 - O benefício para quem participa da pesquisa é a realização de um exame complementar que permitindo um melhor diagnóstico do seu problema gástrico, além de um maior conhecimento de um maior conhecimento sobre a infecção causada por essa bactéria.

4 - Os exames realizados pela pesquisa serão gratuitos, não necessitando nenhum custo por parte do participante para sua realização.

5 - Os resultados dos exames realizados pela pesquisa serão utilizados como dados de pesquisa, omitindo-se a identidade do participante.

6 - O material coletado para a pesquisa será usado exclusivamente para esse fim, e após o término da pesquisa, serão descartados de acordo com as normas de biossegurança.

7 - Somente o pesquisador responsável e o médico ficarão sabendo da participação e se for necessário, autoridades de saúde poderão ser informados para tomar medidas que beneficiem o participante da pesquisa ou a sociedade.

8 - Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como poderá se retirar dela no momento que desejar, sem qualquer prejuízo pessoal.

Solicitamos assim, a sua autorização para efetuarmos o referido exame e realizarmos uma entrevista, sendo que a mesma é confidencial; para desenvolvermos o estudo em questão.

Consentimento:

Declaro que li e compreendi as informações sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como os seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, _____/_____/2010.

Assinatura do Paciente

Adenilson Vilar e Silva
(Pesquisador responsável)

Endereço do pesquisador: Cidade Nova V WE 31, nº401- Ananindeua –PA, Fone: (91) 8438-2443
Ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical - Av. Generalíssimo Deodoro, nº 92, Umarizal -fone: 32016812.

ANEXO II

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** N°009/2011-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** ASSOCIAÇÃO DAS VARIANTES DA REGIÃO CARBOXITERMINAL DO GENE *CAGA* DE *HELICOBACTER PYLORI* COM O DESENVOLVIMENTO DE DISTÚRBIOS GASTRODUODENAIIS EM BELÉM-PARÁ
3. **Pesquisador Responsável:** Adenilson Vilar E. Silva
4. **Instituição / Unidade:** NMT/UFPA.
5. **Data de Entrada:** 03/06/11.
6. **Data do Parecer:** 06/06/11.

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela durante a reunião realizada no dia 16/02/2011. Considerando que, não foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS, manifestou-se pela aprovação do parecer do relator.

Parecer: **Aprovado**

Belém, 6 de junho de 2011.


Prof.ª Dr.ª Hellen Thais Fuzii
Coordenadora do CEP-NMT/UFPA.

Hellen Thais Fuzii
Coordenadora do Comitê de Ética