



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**Programa de Pós-graduação em Cirurgia**

**GENÓTIPOS *cagA*, *vacA* E ALELOS E SÍTIOS DE  
FOSFORILAÇÃO DE TIROSINA DA PROTEÍNA *CagA* DO *H.*  
*PYLORI* EM PACIENTES COM E SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE  
CÂNCER GÁSTRICO**

**Cícero Igor Simões Moura Silva**

**Fortaleza**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Cícero Igor Simões Moura Silva

**GENÓTIPOS *cagA*, *vacA* E ALELOS E SÍTIOS DE  
FOSFORILAÇÃO DE TIROSINA DA PROTEÍNA *CagA* DO *H.*  
*PYLORI* EM PACIENTES COM E SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE  
CÂNCER GÁSTRICO**

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

Orientadora:

Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo Braga

**Fortaleza**

**2009**

Cícero Igor Simões Moura Silva

**GENÓTIPOS *cagA*, *vacA* E ALELOS E SÍTIOS DE  
FOSFORILAÇÃO DE TIROSINA DA PROTEÍNA *CagA* DO *H.*  
*PYLORI* EM PACIENTES COM E SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE  
CÂNCER GÁSTRICO**

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

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

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

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

---

Profa. Dra. Márcia Maria de Negreiros Pinto Rocha  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

*A Deus, por sempre me fortalecer na  
caminhada da vida e na jornada acadêmica.*

*Aos meus pais pelo amor incondicional  
em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. LÚCIA LIBANEZ BESSA CAMPELO BRAGA, Professora adjunta do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade concedida, por sua orientação constante, pelo incentivo e competência com que exerce a vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, professor associado do Departamento de Cirurgia e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará (UFC), por sua dedicação à Pós-Graduação.

À Profa. Dra. MÁRCIA MARIA DE NEGREIROS PINTO ROCHA, Professora da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), pela presteza em avaliar este estudo e contribuir para o seu aperfeiçoamento.

À Srta. MEYSSA QUEZADO DE FIGUEIREDO CAVALCANTE, enfermeira, mestranda em cirurgia, pela parceria na rotina laboratorial para a realização deste estudo.

Ao Sr. FRANCISCO JOSEMAR ALVES DE OLIVEIRA, farmacêutico, pelo companheirismo e dedicação na conclusão deste estudo.

À Srta. MARIA HELANE ROCHA BATISTA GONÇALVES, enfermeira, mestranda em cirurgia, pela parceria no laboratório.

Às Sras. MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA MARIA GOMES FONTENELE, secretárias do Programa de Pós-graduação em Cirurgia da UFC, pela presteza e auxílio no desempenho das atividades letivas deste programa.

Ao Sr. EDSON FLÁVIO DOS SANTOS LOPES, pela amizade e apoio incondicional em todos os momentos necessários.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da UFC, pelas disciplinas ministradas e conhecimentos partilhados para a execução do método científico.

A todos e todas que, de diversas formas, participaram, contribuíram e viabilizaram a realização deste trabalho.

A Deus, por tudo.

“Fase dourada em que a gente pode criar e recriar à nossa própria imagem e semelhança... Essa idade tão fugaz na vida da gente chama-se presente e tem a duração do instante que passa.”

Mário Quintana

## RESUMO

**Genótipos cagA, vacA e alelos e sítios de fosforilação de tirosina da proteína CagA do *H. pylori* em pacientes com e sem história familiar de câncer gástrico.** Cícero Igor Simões Moura Silva. Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Universidade Federal do Ceará. Dissertação de Mestrado. Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo Braga.

As cepas de *H. pylori* demonstram um alto nível de diversidade fenotípica e genotípica, pela expressão de vários genes, que conferem maior patogenicidade à bactéria. Familiares de pacientes com câncer gástrico têm maior risco de desenvolver doenças gástricas, principalmente se forem infectados por cepas mais virulentas de *H. pylori*. O objetivo foi caracterizar as cepas de *H. pylori*, quanto à presença dos genes vacA, cagA e dos sítios de fosforilação de tirosina da proteína CagA – EPIYA, em pacientes com e sem história familiar de câncer gástrico, e correlacionar a presença do gene cagA com o grau de atividade e de inflamação da gastrite crônica. A genotipagem das cepas de *H. pylori* foi realizada através da técnica de PCR e do sequenciamento dos sítios de fosforilação EPIYA. Foram avaliados 94 fragmentos de biópsia de mucosa gástrica provenientes de pacientes dispépticos *H. pylori* positivo, 55 com história familiar de câncer gástrico e 39 sem história familiar. Todas as cepas genotipadas foram vacA positivas, sendo 45,7% com o alelo vacA s1m1; 26,6% vacA s1m2; 4,3% eram vacA s2m1; 10,6% vacA s2m2; 3 cepas híbridas e 9 (9,6%) apresentaram somente o alelo da sequência sinal(s). Das 94 cepas genotipadas 87,2% foram cagA positivas, não havendo diferença estatística entre os grupos de familiares e não familiares (92,7% vs 82,0%;  $p= 0.058$ ). O gene cagA estava presente na maioria dos pacientes portadores de gastrite, havendo significância estatística no grupo dos familiares de câncer ( $p= 0,004$ ). O grau de atividade e inflamação da gastrite, foi mais significativo no grupo de pacientes com cepas cagA positivo, com pangastrite e gastrite corporal. No antro, somente houve significância com relação à atividade da gastrite. Das cepas estudadas, 93,9% apresentaram sítios de fosforilação EPIYA, sendo que 59,2% destas apresentaram somente um sítio, 38,2% com dois sítios e 2,6% com três sítios. Não houve diferença estatística com relação ao número de sítios EPIYA, entre os grupos estudados. É importante a caracterização genética das cepas de *H. pylori* para se estabelecer com clareza o seu papel nos diversos quadros clínicos a ele relacionado. Palavras-chave: *H. pylori*. Familiares de câncer gástrico. cagA. Sítios EPIYA.



## ABSTRACT

**CagA, and vacA alleles and sites of tyrosine phosphorylation of CagA protein of *H. pylori* in patients with and without family history of gastric cancer.** Cícero Igor Simões Moura Silva. Post-Graduate Program (*Stricto Sensu*) in Surgery. Federal University of Ceará. Essay Master. Advisor: Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo Braga.

The *H. Pylori* strains demonstrate a high level of phenotypic and genotypic diversity, the expression of various genes, which confer greater pathogenicity to the bacteria. Relatives of patients with gastric cancer have a higher risk of developing gastric diseases, especially if they are infected with more virulent strains of *H. pylori*. The objective was to characterize the strains of *H. pylori*, the presence of genes *vacA*, *cagA*, and sites of tyrosine phosphorylation of CagA protein - EPIYA in patients with and without family history of gastric cancer, and correlate the presence of the *cagA* gene to the level of activity and inflammation chronic gastritis. The genotyping of strains of *H. pylori* was performed by PCR and sequencing of the phosphorylation sites EPIYA. We evaluated 94 biopsy samples of gastric mucosa from dyspeptic patients *H. pylori* positive, 55 with a family history of gastric cancer and 39 without family history. All genotyped strains were *vacA* positive, and 45.7% with the *vacA* allele s1m1; s1m2 *vacA* 26.6%, 4.3% were *vacA* s2m1; 10.6% *vacA* s2m2; 3 hybrid strains and 9 (9.6 %) showed only the allele sequence signal (s). Of the 94 strains genotyped 87.2% were *cagA* positive, with no statistical difference between groups of familiar and unfamiliar (92.7% vs 82.0%,  $p = 0.058$ ). The *cagA* gene was present in most patients with gastritis, with statistical significance in the group of relatives of cancer ( $p = 0.004$ ). The degree of activity and inflammation of gastritis, was more significant in the group of patients with *cagA* positive strains, with pangastritis Corpal and gastritis. In the antrum, there were significant only in relation to the activity of gastritis. The studied strains, 93.9% showed EPIYA phosphorylation sites, with 59.2% of these had only one site, 38.2% with two sites and 2.6% with three sites. There was no statistical difference in the number of sites EPIYA between the groups. It is important to genetically characterize the strains of *H. pylori* to establish clearly its role in different clinical conditions related to it. Keywords: *H. pylori*. Relatives of gastric cancer. *cagA*. EPIYA sites.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

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

CagA – citotoxina A do *Helicobacter pylori*

C<sup>13</sup> - Carbono 13

C<sup>14</sup> - Carbono 14

EPIYA – sequência codificadora dos aminoácidos dos sítios de fosforilação da proteína

CagA

et al - e outros

*H. pylori* - *Helicobacter pylori*

IL-6 – Interleucina-6

IL-8 – Interleucina-8

IL-1 $\beta$  – Interleucina-1  $\beta$

HUWC – Hospital Universitário Walter Cantídio

rpm – rotações por minuto

vacA – gene da citotoxina vacuolizante

VacA – citotoxina vacuolizante

## LISTA DE GRÁFICOS, FIGURAS E TABELAS

GRÁFICO 1: Distribuição dos pacientes em função do sexo .....	36
FIGURA 1: Gel de Agarose para visualização das bandas do alelo s1 do gene vacA ...	43
FIGURA 2: Gel de Agarose para visualização das bandas dos alelos m1 e m2 do gene vacA .....	44
FIGURA 3: Gel de Agarose para visualização das bandas do gene cagA .....	45
TABELA 1: Primers usados na amplificação dos genes cagA e alelos de vacA .....	35
TABELA 2: Caracterização dos pacientes, por grupos, quanto ao sexo e a idade.....	36
TABELA 3: Distribuição dos pacientes, por grupos, em função do diagnóstico endoscópico .....	37
TABELA 4: Distribuição dos pacientes, por grupos, em função do diagnóstico histopatológico .....	38
TABELA 5: Gene cagA , vacA e alelos em pacientes com e sem historia familiar de câncer .....	40
TABELA 6: Distribuição dos pacientes, por grupos, quanto ao número de sítios EPIYA .....	41
TABELA 7: Presença de cepas cagA com alelos vacA .....	41
TABELA 8: Tipos de inflamação gástrica em relação à presença do gene cagA .....	42

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

### LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

### LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1. Breve histórico sobre a descoberta do <i>Helicobacter pylori</i> .....	<b>13</b>
1.2. Patogenicidade do <i>Helicobacter pylori</i> .....	<b>13</b>
1.3. Genética do <i>H. pylori</i> .....	<b>15</b>
1.3.1. O gene vacA .....	<b>16</b>
1.3.2. O gene cagA .....	<b>16</b>
1.3.3. Os sítios de fosforilação do gene cagA .....	<b>18</b>
1.4. Epidemiologia do <i>H. pylori</i> .....	<b>19</b>
1.5. Diagnóstico do <i>H. pylori</i> .....	<b>20</b>
1.6. Tratamento do <i>H. pylori</i> .....	<b>22</b>
1.7. Aspectos clínicos da infecção pelo <i>H. pylori</i> .....	<b>22</b>
1.8. <i>H. pylori</i> e câncer gástrico .....	<b>25</b>
1.9. <i>H. pylori</i> e história familiar de câncer gástrico .....	<b>26</b>
1.10. Justificativa .....	<b>29</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1. Objetivo geral .....	<b>30</b>
2.2. Objetivos específicos .....	<b>30</b>
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1. Casuística .....	<b>31</b>
3.2. Desenho do Estudo .....	<b>31</b>
3.3. Seleção dos pacientes .....	<b>31</b>
3.4. Métodos .....	<b>32</b>
3.4.1. Coleta de fragmentos de mucosa gástrica .....	<b>32</b>
3.4.2. Estudo histopatológico .....	<b>32</b>
3.4.3. Critérios de positividade e negatividade para o <i>H. pylori</i> .....	<b>33</b>
3.4.4. Extração do DNA de <i>H. pylori</i> em tecido de biópsia gástrica ..	<b>33</b>
3.4.5. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) .....	<b>34</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>

4.1. Caracterização dos pacientes estudados .....	36
4.2. Caracterização dos pacientes quanto aos sintomas.....	37
4.3. Caracterização dos pacientes quanto ao exame endoscópico .....	37
4.4. Caracterização dos pacientes estudados através do histopatológico ...	38
4.5. Caracterização do gene <i>vacA</i> e seus alelos nas cepas de <i>H. pylori</i> estudadas .....	39
4.6. Caracterização das cepas de <i>H. pylori</i> quanto ao gene <i>cagA</i> e os sítios de fosforilação de tirosina EPIYA da proteína CagA .....	40
4.7. Caracterização das cepas de <i>H. pylori</i> quanto a associação dos genes <i>cagA</i> com <i>vacA</i> e alelos .....	41
4.8. Correlação entre as cepas <i>cagA</i> positivo nos casos de gastrite .....	42
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>65</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Breve histórico sobre a descoberta do *Helicobacter pylori*

A partir do isolamento do *Helicobacter pylori* em biópsias gástricas por Marshall e Warren em 1983, o estudo da microbiologia gástrica recebeu grande impulso e passou a figurar dentro do campo de interesse científico.

Microorganismos achados no suco gástrico de pacientes com carcinoma ulcerado do estômago foram relatados em um estudo do início do século passado (KREINITZ, 1906). Outro estudo abrangente de necropsia relatou a prevalência de 43% de presença de bactérias espiraladas no estômago humano, mas não fez qualquer correlação entre a presença destes microorganismos e doenças gástricas (DOENGES, 1938).

O bacilo espiralado, gram-negativo e microaerófilo isolado e identificado da mucosa gástrica de pacientes com gastrite crônica ativa e doença ulcerosa péptica por Marshall e Warren (MARSHAL; WARREN, 1983), foi denominado inicialmente de *Campylobacter like organisms*, passando depois a ser denominado *Campylobacter pyloridis*. Posteriormente, por uma correção gramatical, foi chamado de *Campylobacter pylori*. Após vários estudos taxonômicos, seu nome foi atualizado para *Helicobacter pylori*, devido às suas características bioquímicas e genéticas, que são diferentes de outras espécies do gênero *Campylobacter*.

A descoberta do *Helicobacter pylori* revolucionou a gastroenterologia contemporânea e possibilitou respostas sobre a etiologia de diversos estados patológicos do estômago humano.

### 1.2. Patogenicidade do *Helicobacter pylori*

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), é uma bactéria gram-negativa espiralada, com 2,5 a 3,5 µm de comprimento e 0,5 a 1,0µm de diâmetro, que possui seis flagelos. Esta bactéria coloniza o estômago humano especialmente no antro e na cárdia, que são áreas não-secretoras de ácido, e é produtora de enzimas como: catalase, oxidase, protease, fosfolipase e uréase.

O *H. pylori* é forte produtor de urease, enzima que quebra a uréia transformando-a em amônia e CO<sub>2</sub>, neutralizando o pH gástrico ao redor da bactéria, possibilitando sua sobrevivência em meio ácido (MOBLEY, 2001). Através de sua motilidade, o *H. pylori* chega à superfície gástrica, onde passa a aderir às células do estômago (JOSENHANS e SUBERBAUM, 2001).

O *H. pylori* coloniza a mucosa gástrica humana com mínima competição por parte de outros microorganismos. Os seus fatores de virulência permitem que o *H. pylori* sobreviva ao ambiente inóspito do estômago; estes fatores são: o formato espiralado, a motilidade, as enzimas e proteínas de adaptação e a capacidade de aderir às células da mucosa e ao muco gástrico (BRUCE, 1993), bem como, os fatores genéticos e biomoleculares do microorganismo, como a presença dos genes *vacA*, *cagA* e dos sítios de fosforilação da proteína CagA (Epiya) (YAMAOKA et al, 1999; GOMES et al, 2007; ARGENT et al, 2004).

Os mecanismos patogênicos são aqueles que rompem a integridade da mucosa gástrica, incluindo toxinas e mediadores da inflamação, ou que contribuem para a atividade clorido-péptica do estômago. É importante salientar que ocorre uma superposição entre esses fatores. Os principais mecanismos patogênicos do *H. pylori* estudados são:

**Motilidade:** Esta propriedade é considerada essencial para que o microorganismo penetre na camada de muco que reveste o epitélio gástrico, protegendo-se assim da acidez e do peristaltismo estomacal (HAZEL et al., 1986).

**Aderência:** A capacidade de adesão do *H. pylori* à superfície epitelial impede sua eliminação através dos movimentos peristálticos, além de promover elevadas concentrações de toxinas em determinadas áreas da mucosa gástrica. O microorganismo liga-se basicamente às células secretoras de muco, incluindo focos de metaplasia gástrica. Na microscopia eletrônica, esta aderência às células de muco do estômago pode envolver a justaposição das membranas celulares bacterianas e mucosas assemelhando-se a “pedestais de inserção”. A bactéria adere à mucosa permitindo uma série de ações, que facilitam sua colonização e início do processo inflamatório (BRUCE, 1993).

A aderência do *H. pylori* consiste na interação entre adesinas do microorganismo e receptores da célula da mucosa gástrica. A adesina de maior importância é a BabA, uma proteína de 78 kDa ligada a antígenos B de Lewis presentes em pessoas do grupo sanguíneo “O” (ILVER et al., 1998). Após a adesão à mucosa, dá-se início a um processo inflamatório local e a elaboração de toxinas por parte da bactéria, os quais são os principais responsáveis pela redução da integridade da mucosa.

**Produção de urease:** O *H. pylori* produz elevada quantidade de urease, uma enzima que converte a uréia em amônia que, no ambiente gástrico, pode promover a desestabilização da camada de muco, provocando lesões sobre o epitélio de

revestimento, principalmente em situações de gradientes elevados de pH (HAZEL et al., 1986).

Ações sobre as secreções das mucosas antral e oxíntica: Indivíduos infectados com o *H. Pylori* mostram maior concentração de gastrina plasmática, elevados níveis de interleucina-1 $\beta$ , interleucina-2, interleucina-6, interleucina-8 (IL-8), Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e secreção de ácido que indivíduos controle, com os valores retornando ao normal após a erradicação do microorganismo (CRABTREE et al., 1991, 1994; YAMAOKA et al., 1996, 1997).

O *Helicobacter pylori* é adquirido por via oral e penetra na camada de muco, multiplicando-se em contato íntimo com as células epiteliais do estômago. As bactérias, após instaladas na mucosa gástrica, liberam diferentes agentes quimiotáticos, que penetram através do epitélio lesado e induzem a migração de polimorfonucleares para a lâmina própria e o epitélio. As proteínas bacterianas também ativam os mastócitos, promovendo sua degranulação, liberando outros ativadores inflamatórios que aumentam a permeabilidade vascular, a expressão de moléculas de adesão de leucócitos às células endoteliais, bem como uma migração acentuada dessas células ao sítio da infecção. O *H. pylori* estimula o epitélio gástrico a produzir IL-8, que tem sua produção potencializada pelo TNF- $\alpha$ , pela interleucina-1 (IL-1) e pelo fator de necrose  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), liberados pelos macrófagos em resposta à parede lipopolissacarídica da bactéria (CRABTREE et al., 1991, 1994; MOBLEY, 2001; MAEDA et al., 2001).

### 1.3. Genética do *H. pylori*

O cromossomo do *H. pylori* tem um tamanho estimado de 1.68-1.73Mb, e as sequências genômicas apresentam baixo conteúdo de citosina e guanina, em média 32.5 mol% (TAYLOR et al., 1991).

Muitos fatores genéticos têm sido implicados nos mecanismos de virulência do *H. pylori*, incluindo os genes da urease (*ureA* e *ureB*), o gene da citotoxina vacuolizante (*vacA*), o gene associado à citotoxina (*cagA*), os genes da produção de flagelos (*flaA* e *flaB*), e o gene *picB* com potencial habilidade na indução da produção de IL-8 pelas células do epitélio gástrico (CENSINI et al., 1996).

Os genes mais estudados e que têm maiores achados de correlação com patologias gástricas são o *vacA* e o *cagA*.



### 1.3.1. O gene *vacA*

Um gene de importância para a virulência das cepas de *H. pylori* é o gene da citotoxina vacuolizante - *vacA*, que apresenta dois tipos de sequências sinalizadoras, denominadas de: s1 (e seus subtipos s1a, s1b, e s1c) e s2; e dois tipos de sequências moduladoras ou região média do gene: m1 e m2. O gene *vacA* está presente em todas as cepas de *H. pylori* e diversifica-se a partir da combinação em mosaico de seus alelos. É devido a essa variada expressão combinando as regiões da sequência sinal (s) e região média (m) que é determinada a produção da citotoxina vacuolizante (proteína VacA) e o grau de patogenicidade da bactéria (ATHERTON et al., 1995; VAN DOORN et al., 1998; UMIT et al., 2008).

As linhagens que apresentam o genótipo s1a parecem mais patogênicas que as que expressam s1b, s1c e s2 e são mais frequentemente encontrados na doença ulcerosa e no adenocarcinoma gástrico. Também as cepas que apresentam a região média m1 parecem mais virulentas que as que expressam m2 (WANG et al., 2003).

A combinação em mosaico das duas regiões determinará a produção da citotoxina vacuolizante e seu potencial patogênico. A citotoxina vacuolizante é uma proteína de 87 KDa, codificada pelo gene *vacA* que, embora esteja presente em todas as cepas de *H. pylori*, expressa essa proteína em apenas 65% das cepas do microorganismo, sendo ela responsável pelo surgimento de vacúolos nas células epiteliais do estômago (UMIT et al., 2008). As cepas *vacA* s1/m1 produzem grande quantidade de citotoxina, as linhagens s1/m2 produzem quantidade moderada, enquanto as cepas tipo s2/m2 não produzem citotoxina ou o fazem em pequenas quantidades (WANG et al., 2003).

Segundo estudo anterior, no Brasil, como na América do Sul e na península Ibérica predominam, na população infectada com *H. pylori*, cepas *vacA* com o alelo s1b, tendo-se menos indivíduos infectados com cepas que expressem os outros alelos (s1a, s1c e s2). O alelo m1 também é mais prevalente que m2 nos países dessas regiões (VAN DOORN, 1999).

### 1.3.2. O gene *cagA*

Tem-se demonstrado também que as cepas de *H. pylori* demonstram um alto nível de diversidade fenotípica e genotípica, através da expressão de vários genes e com o dano que essa bactéria pode causar (PEEK, 1995; CENSINI et al., 1996).

Há 19 anos, Cover et al., relataram uma forte associação entre úlcera péptica e resposta sorológica do hospedeiro a determinada proteína do *H. pylori*, de alto peso

molecular, entre 120 e 140 kDa, atualmente denominada de citotoxina associada ao gene A - CagA (COVER et al, 1990).

Posteriormente, o gene que codifica a proteína CagA foi identificado e observado que o gene *cagA* é um marcador de uma região no cromossomo, completamente diferente do restante do genoma do *H. pylori*, considerado como ilha de patogenicidade Cag (PAI), presente em algumas cepas de *H. pylori* (CENSINI et al., 1996).

A ilha de patogenicidade *cag* é uma região de 40 kilobase do cromossomo do *H. pylori*, compreendendo 27 a 31 genes específicos, incluindo *cagA*, *cagE*, *cagH*, *cagI* e *cagL*, dentre outros (CENSINI et al., 1996). Esses genes codificam componentes celulares que induzem a produção de citocinas inflamatórias, atuando como fatores de virulência do microorganismo. O gene *cagA* é comumente usado para identificar o locus *cag* (GONZALLES et al, 2003), e a maioria dos genes *cag* estão provavelmente envolvidos na gênese secretória que transloca a proteína CagA para o citoplasma das células epiteliais gástricas. Uma vez dentro da célula epitelial, a proteína CagA é fosforilada, agindo como um fator de crescimento, levando a uma resposta celular e a produção de citocinas pela célula hospedeira (HIGASHI et al., 2002). Estudos relatam que o gene *cagA* está presente em 60 a 70% das cepas de *H. pylori* (GATTI et al, 2006).

Os genes da ilha de patogenicidade *cag* têm sido mostrados como envolvidos na indução de respostas pró-inflamatórias nas células da mucosa gástrica de indivíduos infectados com *H. pylori*, através da produção de interleucina-8 (IL-8), um potente fator quimiotático e ativador de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos pelas células do hospedeiro. Os produtos secretados provavelmente interagem diretamente com o epitélio desencadeando uma cascata de eventos que levam à lesão irreversível das células epiteliais. A proteína CagA e o gene que a codifica, o *cagA*, têm sido o maior foco de atenção de vários estudos em nível molecular (ARGENT et al., 2004; MATTAR et al., 2007).

No Brasil, diversos estudos têm correlacionado a presença de *H. pylori cagA*-positivo com as doenças gástricas mais importantes, tais como, gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico. Porém, há uma grande variedade de genótipos das cepas de *H. pylori* no país, o que leva também a variações na prevalência dessas cepas e, conseqüentemente, no desenvolvimento das doenças gástricas (QUEIROZ et al., 1998; EVANS et al., 1998; QUEIROZ et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; MARTINS et al., 2005; GATTI et al., 2006; MATTAR et al., 2007).

### 1.3.3. Os sítios de fosforilação do gene *cagA*.

A ilha de patogenicidade *cag*, mais especificamente a região terminal variável 3' do gene *cagA*, codifica um sistema secretório do tipo IV, que favorece a fosforilação e o rearranjo do citoesqueleto das células gástricas e o produto terminal 3' da ilha *cag*, a proteína CagA, é translocada para as células do epitélio gástrico através de mecanismo patogênico de transferência do *H. pylori* (ARGENT et al., 2004).

Dentro da célula hospedeira, a proteína CagA induz a fosforilação de resíduos de tirosina, através de uma modificação contendo uma seqüência de cinco aminoácidos (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala), denominada EPIYA. A proteína CagA fosforilada, ativa conseqüentemente, um sistema fosfatase SHP-2, levando a modificações morfológicas nas células hospedeiras, que podem gerar displasia, metaplasia e o câncer gástrico (HIGASHI, et al., 2002; SGHNEIDER et al, 2009).

O número e os tipos de modificadores EPIYA podem variar substancialmente. Eles variam em número de sítios EPIYA, entre hospedeiros e também de acordo com a região geográfica (CHOI et al., 2007).

Os números de sítios variam de 1 a 6 modificadores de fosforilação de tirosina EPIYA (ARGENT et al., 2004) e apresentam diferenças estruturais entre os pacientes dos países ocidentais e os do leste da Ásia. Nos países ocidentais, apresentam-se os segmentos de aminoácidos denominados A, B e C dos modificadores EPIYA do *H. pylori*, sendo 32 aminoácidos do segmento EPIYA-A, 40 aminoácidos do segmento EPIYA-B e 34 aminoácidos do segmento EPIYA-C. Já nos países asiáticos, não há o resíduo C, e no seu lugar tem-se o resíduo D. *In vitro*, todos os tipos de modificadores de fosforilação da tirosina EPIYA do CagA podem ser fosforilados (HATAKEYAMA, 2005).

As cepas que possuem mais de 3 sítios modificadores de fosforilação estão altamente mais associadas com atrofia gástrica, metaplasia intestinal e câncer gástrico. Estudos observando a expressão da proteína CagA, mostram que o número de modificadores EPIYA presentes nas cepas *cagA* está associado com a intensidade da fosforilação da proteína CagA, com o alongamento celular e com a indução de citocinas proinflamatórias, como a IL-8 (BARTCHEWSKY JR et al., 2009; SGHNEIDER et al, 2009), mostram também que a proteína CagA com 2 ou menos modificadores de fosforilação EPIYA não fosforilam e não induzem o alongamento celular, enquanto as

que têm 3 ou mais sítios EPIYA têm um poder de fosforilação e indução de rearranjo celular potencialmente maior (ARAS et al., 2003).

#### **1.4. Epidemiologia do *Helicobacter pylori***

Aproximadamente 50% da população mundial está infectada pelo *H. pylori*. E esta infecção é considerada um problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, onde a prevalência da infecção é alta, acredita-se que devido às baixas condições higiênicas e sanitárias, o que também contribui para a aquisição da bactéria já desde a infância e a permanência da infecção por um longo período. O fato de o *H. pylori* residir normalmente somente no estômago é presumido pela possibilidade de que ele penetre no meio ambiente através de fezes, saliva ou vômitos (PARSONNET et al., 1999).

Evidências indicam que a transmissão direta pessoa-pessoa é o meio mais provável de disseminação da bactéria, seja através de contatos fecal-oral, oral-oral ou gastro-oral (PARSONNET, 1998).

No Brasil, há uma variação na prevalência da infecção pelo *H. pylori* entre as regiões do país, variando de 70 a 92%, sendo que grande parte da população adquire a bactéria precocemente na infância. Um estudo com crianças brasileiras de baixo nível socioeconômico demonstrou uma prevalência de 34% de infecção pelo *H. pylori* (OLIVEIRA et al., 1994), percentagem considerada elevada quando comparada aos dados dos países desenvolvidos, porém inferiores a outros países subdesenvolvidos como a Índia, a Nigéria, a Argélia e a Costa do Marfim (MÉGRAUD et al., 1989; GRAHAM et al., 1991).

Em Fortaleza, Ceará, estudo realizado em uma comunidade urbana de baixa renda, utilizando teste respiratório marcado com Carbono 13 ( $C^{13}$ ), em crianças e adolescentes mostrou que 30% das crianças estavam contaminadas aos 2 anos de idade atingindo 74% aos 20 anos (RODRIGUES et al., 2004) Nos indivíduos acima de 20 anos a prevalência é em torno de 82% (BRAGA et al., 1995).

Esses resultados estão em consonância com o que é descrito na literatura para os países em desenvolvimento, ou seja, as taxas de infecção são elevadas e o microorganismo é adquirido em geral em tenra idade. O tempo de infecção parece estar fortemente associado às alterações histopatológicas consideradas pré-malignas e o risco de desenvolver o câncer gástrico é relatado através dessas alterações histopatológicas e

funcionais ocorridas após a infecção pela bactéria (SIPPONEN, 1994; EL-OMAR, 1997).

### **1.5. Diagnóstico do *Helicobacter pylori***

Existem vários métodos para diagnóstico do *Helicobacter pylori*, e estes podem ser efetuados através da endoscopia, que são denominados métodos invasivos. Pode-se destacar dentre estes métodos a cultura direta da bactéria, o exame histopatológico e o teste rápido da urease a partir de espécimen de biópsia.

Há também os métodos nos quais não se faz necessário o exame endoscópico, sendo não invasivos. Dentre eles, estão os testes sorológicos através das técnicas de ELISA, Western Blotting e a pesquisa de antígeno fecal, além do teste respiratório com uréia marcada com Carbono 13 ou 14 (COELHO, 1998).

A cultura é o mais preciso de todos os métodos para identificar o *H. pylori*, no entanto, o seu cultivo é difícil, exigindo um meio enriquecido adequadamente e uma incubação prolongada durante 3 a 5 dias, em ambiente microaerofílico, pobre em oxigênio e controlado.

A bactéria pode ser cultivada a partir de tecido gástrico obtido endoscopicamente. Quando se cultiva a bactéria, a coloração mais adequada é a de Gram. Mas, usualmente não se emprega este método para diagnóstico clínico, ficando o mesmo reservado para circunstâncias especiais, como determinação de perfis de sensibilidade a antimicrobianos por cepas resistentes (MONTGOMERY *et al.*, 1988).

A análise histopatológica, que faz a pesquisa da bactéria empregando técnicas de coloração, como a hematoxilina-eosina, é outro método de detecção. Este é o mais utilizado a partir dos fragmentos colhidos na endoscopia, porém a sensibilidade varia de acordo com a técnica de coloração, o número de microorganismos presentes e a experiência do patologista (MORRIS *et al.*, 1989).

O exame histopatológico é o padrão para a detecção do *H. pylori* em muitos estudos, uma vez que confirma a presença da bactéria e da gastrite. Há excelente correlação entre a cultura de bactérias e a identificação histopatológica (BARTHEL e EVERETT, 1990). A detecção do *Helicobacter pylori* na biópsia gástrica tornou-se rotina, pela acurácia no resultado do conhecimento da gastrite causada por esta bactéria.

Outro método de detecção pelo material colhido na endoscopia é o teste rápido da urease, que se baseia na produção de urease pela bactéria para efetuação do diagnóstico indireto da presença do *Helicobacter pylori*, Com sensibilidade em torno de 89-98% e especificidade variando de 93-98% (THILLAINAYAGAN *et al.*,1991).

A detecção indireta do *Helicobacter pylori* realizada pelo teste rápido da urease através de amostras retiradas da mucosa antral gástrica, é um método bastante utilizado por ser simples e rápido (HOWDEN e HUNT, 1998). Este teste é o preferido quando se indica a endoscopia diagnóstica para que se investigue a presença de uma determinada patologia gástrica responsável pelos sintomas do paciente.

Através da sorologia, podem-se detectar, pelo ensaio imunossorbente ligado à enzima (ELISA) e pelo Western Blotting, os anticorpos da classe IgG e IgA dirigidos a vários antígenos bacterianos. Mesmo com o decréscimo nos níveis de anticorpos após a erradicação bem-sucedida das bactérias, eles continuam altos até 3 anos após a cura. Portanto, a acurácia deste método para avaliar a “cura” pós-tratamento do *Helicobacter pylori*, fica limitada devido a essa “cicatriz sorológica” (CRABTREE *et al.*,1991; ROCHA *et al.*, 1998). Esses métodos têm grande utilidade em estudos epidemiológicos.

A pesquisa de antígenos do *H. pylori* nas fezes (HpSA), é mais um método não invasivo e tem obtido valia para o diagnóstico da infecção por esta bactéria. A pesquisa de antígenos fecais expressa vantagem porque obtêm-se o resultado em torno de uma hora. Segundo um estudo multicêntrico, em pacientes não tratados a pesquisa de antígenos fecais do *H. pylori* tem acurácia comparável ao teste respiratório, como também se mostra eficaz no controle da erradicação. A pesquisa de antígenos fecais ainda tem uma boa relação custo-benefício, é fácil de ser realizada, e obtêm-se resultado rápido (em torno de uma hora), e não requer equipamentos ou cuidados especiais (VAIRA *et al.*, 2000).

O teste respiratório baseia-se no fato de o *H. pylori* ser produtor de urease e clivar a uréia em amônia e gás carbônico. Nele, o paciente ingere uma pequena quantidade de uréia rádio-marcada com C<sup>13</sup> ou C<sup>14</sup>. Quando ingerida, a uréia é desdobrada pela urease do *H. pylori*, presente na mucosa gástrica dos pacientes infectados, em amônia e CO<sub>2</sub> marcado, que é rapidamente absorvido através do epitélio gástrico e atinge a circulação sanguínea, indo até os pulmões e sendo eliminado pela expiração. O CO<sub>2</sub> marcado, coletado através da exalação respiratória em um balão específico, é detectado através do

ar expirado pelo paciente por espectômetro de massa ou de cintilação líquida, conforme tenha sido usado o  $C^{13}$  ou o  $C^{14}$ , respectivamente (MÉGRAUD, 1997; COELHO, 1998).

O teste respiratório constitui, hoje, o melhor exame para controle de tratamento da infecção quando não se faz necessária a avaliação da mucosa (MÉGRAUD, 1997; COELHO, 1998; EHSO, 2007).

Atualmente, pode-se utilizar também testes de biologia molecular para averiguar a presença do *H. pylori*, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR, pela sigla em inglês). Essas técnicas não são ainda utilizadas na prática do diagnóstico clínico, mas são de grande importância na pesquisa científica.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) baseia-se na amplificação de fragmento específico de DNA, a partir de uma sequência de DNA molde. A técnica requer a utilização de “primers”, que são pequenos fragmentos de DNA, tipicamente de vinte pares de bases, complementares a cada uma das extremidades da sequência de DNA de interesse, onde a partir deles uma DNA polimerase (Taq-DNA polimerase), promoverá a síntese de DNA por adição de nucleotídeos complementares. A amplificação do DNA é possível através de etapas bem definidas de: desnaturação, anelamento e extensão, que são executadas em um termociclador. Deste modo, uma sequência de interesse dentro de todo o genoma de uma espécie pode ser amplificada e este pequeno fragmento se torna majoritário na amostra de DNA, através da amplificação do mesmo. O grau de homologia do “primer” complementar é que determina a especificidade do PCR. O método é mais sensível e tão específico quanto a cultura. A utilização de “primers” específicos permite identificar os diversos genótipos das cepas patogênicas (LAGE et al, 1995).

Pode-se também aplicar a técnica de hibridização reversa ou colorimétrica para detectar produtos de amplificação do DNA. Aplicações promissoras da técnica incluem a identificação de pontos de mutação responsáveis pelo desenvolvimento de resistência bacteriana e a detecção de determinantes de virulência, como os genótipos *cagA* e *vacA* das cepas infectantes e sua relação com patologias gastroduodenais específicas.

### **1.6. Tratamento do *H. pylori***

Há muito está estabelecido que a erradicação da bactéria deve ser o ponto crucial no tratamento das doenças gástricas (NIH, 1994; HOPKINS et al., 1996; COELHO, 1998; EHSO, 2007). Não está definido ainda o esquema ideal. Nem se sabe exatamente

por que, o *H. pylori* sendo sensível in vitro a muitos antimicrobianos, sua real erradicação seja tão difícil (COELHO, 2005).

O pH baixo e inconstante, que varia nas diferentes regiões do estômago onde o microorganismo reside, a secreção ativa, o esvaziamento gástrico, a interferência dos alimentos na dispersão e absorção das drogas, e a própria localização do microorganismo, abaixo da camada de muco, que atua como um obstáculo à penetração completa dos fármacos nos possíveis sítios de colonização, podem levar à resistência farmacológica por parte do microorganismo.

Atualmente o esquema recomendado pelos consensos brasileiros e internacionais é a terapia tripla baseada em Inibidores da bomba de prótons (IBP), associada com antimicrobianos, que tem um percentual de erradicação em torno de 80% (COELHO, 2005; EHS, 2007).

### **1.7. Aspectos Clínicos da infecção pelo *Helicobacter pylori***

Embora a primoinfecção pelo *H. pylori* passe despercebida pela maioria dos pacientes, às vezes, após um período variável de incubação, alguns indivíduos desenvolvem um quadro clínico caracterizado por dor ou mal-estar epigástrico, pirose, náusea, vômito, flatulência, sialorréia, halitose, cefaléia e astenia. Os sintomas tendem a permanecer por uma a duas semanas. As anormalidades macroscópicas são extremamente variáveis à endoscopia, desde pequeno eritema até erosões, úlceras ou mesmo lesões pseudotumorais. Na maioria dos pacientes, as lesões concentram-se fundamentalmente no antro, podendo, às vezes, comprometer também o corpo gástrico (MOBLEY, 2001).

Mesmo a presença do *H. pylori* evocando resposta imune local e sistêmica, a infecção, uma vez adquirida, persiste para sempre, sendo raramente eliminada espontaneamente. Mais ainda, é sempre acompanhada por gastrite histológica, de intensidade variável (PEREZ-PEREZ et al., 1988).

A resposta inflamatória gástrica é um achado invariável em indivíduos infectados pelo *H. pylori* e representa uma resposta imune do hospedeiro a este microorganismo (CRABTREE, 1996).

O antro é tipicamente a primeira região a ser acometida, podendo, às vezes, predominar o comprometimento do corpo ou, mesmo, de todo o órgão (pangastrite). A distribuição do *H. pylori* no estômago é importante, pois parece ser um indicador do padrão de evolução da gastrite. Assim, indivíduos com gastrite predominantemente



antral terão secreção gástrica normal ou elevada graças à manutenção da mucosa oxíntica íntegra, e poderão ter um risco aumentado para úlcera duodenal. Indivíduos com gastrite afetando de forma predominante o corpo gástrico terão secreção ácida reduzida, em consequência da destruição progressiva da mucosa oxíntica (SUERBAUM e MICHETTI, 2002).

É sabido que a topografia da inflamação pelo *Helicobacter pylori* assume correlação com o desenvolvimento das patologias. Quando a gastrite associada ao patógeno é predominantemente antral ocorre maior correlação com as úlceras do duodeno. Porém, quando o processo inflamatório envolve o corpo com intensidade similar ou superior a porção antral, esta pangastrite ou modelo corpo-predominante possui um maior risco de desenvolver o câncer gástrico, através de uma cascata de eventos, iniciada com a gastrite atrófica e alterações secretórias, seguida de metaplasmo intestinal, displasia e câncer gástrico (EL-OMAR, 2000; SUERBAUM, 2002).

Histologicamente tem-se uma mistura de gastrite crônica superficial e alterações atróficas com tendência a progredir com o passar dos anos, ou décadas, podendo ocorrer também o desenvolvimento de metaplasia intestinal. Estima-se que a gastrite crônica do corpo gástrico, associada à atrofia acentuada, eleva de três a quatro vezes o risco de carcinoma gástrico do tipo intestinal (SUERBAUM e MICHETTI, 2002)

A gastrite crônica causada pelo *H. pylori*, de caráter infeccioso e transmissível, implica em preocupantes taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em decorrência de sua evolução para úlcera péptica e câncer (SUERBAUM e MICHETTI, 2002).

Vários outros fatores, além da presença do *H. pylori*, também estão implicados na gênese da gastrite de padrão atrófico como: fatores ambientais (dieta pobre em vitamina C, alta ingestão de sódio, álcool e tabagismo), refluxo duodenogástrico, formação de substâncias à base de nitratos compostos, deficiência de vitaminas e minerais, além de fatores genéticos. Todos esses fatores podem interagir para produzir a doença. Contudo, um enorme volume de dados corrobora um papel central da resposta imune do hospedeiro na definição da evolução da doença (BONNEY et al., 1986).

A gastrite atrófica começa, em geral como um processo multifocal no estômago distal. Progride, então, continuamente por duas a três décadas. No decorrer deste período, pode ocorrer coalescência dos focos iniciais, com redução da produção de ácido clorídrico, podendo chegar a acloridria. Esta gastrite de padrão atrófico e,

sobretudo, a metaplasia intestinal, podem evoluir para displasia que, finalmente, evolui para câncer (SIPPONEN et al., 1992).

O *H. pylori* é considerado o principal agente etiológico da úlcera péptica. Em torno de 95% dos pacientes com úlcera duodenal e 70% a 80% dos pacientes com úlcera gástrica estão infectados com a bactéria (MARSHALL, 1994; NIH, 1994).

No entanto, a evidência principal da associação do microorganismo com essas patologias vem de estudos de avaliação da eficácia do tratamento em que a erradicação da bactéria acelera a cicatrização da úlcera, mesmo sem o uso de anti-secretores (HOSKING et al., 1994; LAM et al., 1997).

Invariavelmente, a erradicação do *H. pylori* é acompanhada de grande redução nos índices de recidiva e de complicações posteriores das doenças gástricas, facilitando, inclusive, a possibilidade de cura (MARSHALL et al., 1988; TYTGAT, 1994; PENSTON, 1994; NIH, 1994; HOPKINS et al., 1996; MACRI et al., 1998).

Apenas 10 a 15% dos pacientes infectados com *H. pylori* desenvolvem úlcera péptica. Porém, a despeito do inquestionável papel da bactéria no processo de comprometimento ulceroso do estômago, há que se considerar as características biológicas e de saúde do hospedeiro e outros fatores de virulência da própria bactéria ainda não identificados.

### **1.8. *H. pylori* e câncer gástrico**

Em 1994, a *Internacional Agency for Research on Cancer*, divisão da Organização Mundial de Saúde, concluiu, com base em extensas pesquisas na área, que o *Helicobacter pylori* é um agente carcinógeno tipo I, com relação a carcinogênese gástrica (BLASER, 1996). Várias publicações subsequentes vieram reforçar essa associação (NOMURA et al., 1991; PARSONNET et al., 1991; FORMAN et al., 1991; PARSONNET et al., 1997), e uma em cada 100 pessoas infectadas com o *H. pylori* pode desenvolver câncer gástrico (KUIPERS, 1998).

O risco de desenvolvimento de câncer gástrico é maior para o paciente colonizado com cepas mais agressivas do *H. pylori* como as que possuem o gene *cagA*, com expressão dos sítios de fosforilação EPIYA da proteína CagA, e o gene *vacA* com o alelo *s1/m1* (ATHERTON et al., 1995).

Recente meta-análise, incluindo 16 estudos com 2.284 casos e 2.770 controles, confirmam que a infecção por *H. pylori* aumenta o risco de câncer e esse torna-se ainda mais elevado quando as cepas são *cagA* positivas (HUANG, JQ et al., 2003).

Entretanto outros estudos não encontraram associação entre cepas *cagA* e os diversos grupos de pacientes infectados com gastrite, câncer ou doença ulcerosa péptica (ZHENG, PY et al 2000; BACKERT et al. 2004).

No Brasil, têm sido realizados estudos os quais sugerem que cepas *cagA* positivas podem ter relevância clínica, com prevalência variando de 61 a 83% nas populações estudadas (OLIVEIRA et al. 2003; MARTINS et al.2005). Estes estudos têm buscado a associação dos genótipos do *Helicobacter pylori* presentes no país, tais como *vacA*, *babA*, *iceA*, *dupA* e especialmente do gene *cagA*, com os desfechos clínicos, e associações com outros fatores, em diversos grupos de pacientes (ASHOUR et al., 2001; GATTI et al., 2003; QUEIROZ et al., 2005).

Há vários indícios de que a infecção se inicia desde a infância, com cepas que possuem esses genes, e de forma mais considerável o *cagA*, pode levar ao desenvolvimento de úlcera duodenal e carcinoma gástrico (QUEIROZ et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003; ROCHA et al., 2005; GATTI et al., 2006; GOMES et al., 2007).

A infecção pelo *Helicobacter pylori* é importante fator no desenvolvimento do câncer, mesmo sendo essa neoplasia uma doença multifatorial. Estudos têm demonstrado que a infecção pelo *H. pylori* juntamente com uma predisposição genética e fatores ambientais, aumentam o risco de câncer gástrico (LA VECCHIA et al., 1992; HUANG et al., 1998; DANESH, 1999). É evidente que o desenvolvimento ou não do câncer gástrico envolve aspectos relacionados à defesa do hospedeiro, fatores de virulência do microorganismo e fatores ambientais.

### **1.9. *H. pylori* e história familiar de câncer gástrico**

É grande a correlação entre carcinoma gástrico e história familiar. Estudos relataram que 10-15% dos casos de carcinoma gástrico advinham de pessoas com história familiar de câncer gástrico. O risco de três vezes de desenvolver o câncer gástrico em parentes de primeiro grau foi constatado em outro estudo (LISSOWSKA et al, 1999).

A predisposição familiar ao desenvolvimento do carcinoma gástrico é bem reconhecida, especialmente nos casos de mais de um familiar acometido, quando comparado a casos esporádicos de apenas um afetado (GRANHAM; LELENFELD,

1958; CWERN *et al.*, 1981; OGAWA; KATO; TOMINAGA, 1985; ZANGHIERI *et al.*, 1990; LA VECCHIA *et al.*, 1992).

A associação da presença do *Helicobacter pylori* e história familiar de câncer gástrico eleva este risco para oito vezes maior no desenvolvimento do câncer gástrico (BRENNER; BODE; BOEING, 2000).

Outro estudo reportou que quando existe uma predisposição genética associada à presença do *Helicobacter pylori* há um risco 6,9 vezes maior de ocorrer o desenvolvimento do carcinoma gástrico (HANSEN *et al.*, 1999).

O *Helicobacter pylori* está diretamente implicado na predisposição ao carcinoma gástrico através da indução de atrofia do estômago e hipocloridia. Nos parentes em primeiro grau de indivíduos com câncer gástrico estas alterações são mais frequentes, apresentando um maior risco de desenvolver câncer gástrico (EL-OMAR *et al.*, 2000).

Com relação à predisposição genética, foi verificado em um estudo, que condições pré-neoplásicas (atrofia, hipocloridia e metaplasia intestinal) ocorrem em 1/3 dos familiares de pacientes com câncer gástrico infectados pelo *H. pylori* (CARNEIRO *et al.*, 1993).

Diversos fatores genéticos estão implicados na predisposição dos familiares de câncer a atrofia, tais como, o aumento da secreção da interleucina IL-1 $\beta$  causado por um polimorfismo no gene da mesma e a presença dos alelos HLA-DQA1\*0102 ou HLA-DQB1\*0401 (NIV, 2003). A aquisição de cepas virulentas do *H. pylori* combinada a estes fatores, em pacientes com história familiar de câncer gástrico, contribui para a predisposição a este tipo de câncer. A elevação dos níveis de IL-1 $\beta$  aumenta a suscetibilidade para a hipocloridia e atrofia da mucosa gástrica (EL-OMAR, 2001).

Atualmente, os consensos mundiais recomendam tratar a infecção pelo *H. pylori* nos familiares de pacientes com câncer gástrico independentemente de apresentarem sintomas ou alterações histopatológicas consideráveis, uma vez que estes indivíduos estão em um grupo de risco mais elevado para o desenvolvimento de câncer do estômago (EHS, 2007).

Estudo realizado no Hospital Walter Cantídio, que avaliou 222 pacientes, divididos em dois grupos, compostos de 104 familiares de pacientes com câncer gástrico e 118

pacientes com dispepsia sem história familiar de câncer gástrico, correlacionou a infecção pelo *H. pylori* com as lesões pré-cancerosas observadas, através do histopatológico. Nesse estudo foi encontrada alta prevalência da infecção pelo *H. pylori* em ambos os grupos, familiares de câncer (84,7%) e pacientes do grupo controle (75,9%). Foi observada maior prevalência de lesões precursoras do câncer gástrico nos familiares de câncer, como displasia e também foi detectado um paciente com câncer gástrico na fase inicial. O padrão de gastrite encontrada nesses pacientes foi o de pangastrite do corpo associada à presença de folículos linfóides, que é definido como o fenótipo de maior risco para a carcinogênese gástrica (MOTTA et. al., 2008).

É crescente o interesse pelo estudo dos fatores de virulência do *H. pylori*, dadas as diferenças regionais entre as cepas e sua possível correlação com desfechos clínicos mais graves. Mediante tão consistentes achados relacionando a infecção pelo *H. pylori* à história familiar de câncer gástrico, torna-se importante avaliar os fatores de virulência da bactéria nesse grupo de pacientes.

No Ceará, não existem estudos avaliando os fatores de virulência tipo *cagA* e *vacA* em pacientes dispépticos, existe um estudo avaliando a presença de cepas *cagA* somente em pacientes com câncer gástrico (LIMA et al., 2008). Na região Nordeste, existe um estudo com um número reduzido de pacientes proveniente de Pernambuco (BRITO et al., 2003). Os genótipos das cepas de *H. pylori* provenientes de familiares de pacientes com câncer gástrico não foram estudadas em nenhuma região do país.

A avaliação do número sítios de fosforilação de triosina da proteína *CagA* e sua correlação com as patologias advindas da infecção por esta bactéria ainda são pouco estudadas, tanto em outros países quanto no Brasil (ARGENT et al., 2004; BARTCHEWSKY JR et al., 2009). Faz-se necessária uma análise destes marcadores para uma melhor percepção do perfil genético das cepas circulantes e para avaliar se a presença destes é relevante para o desenvolvimento de doenças.

### **1.10. Justificativa**

Tendo em vista a alta prevalência da infecção pelo *H. pylori* em Fortaleza em adultos e crianças e os altos índices de doenças gástricas causadas pela presença desta bactéria, é de grande importância um estudo mais apurado de caracterização dos fatores de virulência expressos pelas diversas cepas circulantes na população do nosso estado. A identificação, através de técnicas de biologia molecular, dos fatores de virulência das cepas de *H. pylori* com maior potencial patogênico e lesivo, poderá ser de grande importância do ponto de vista clínico, na identificação e acompanhamento de pacientes com maior risco de desenvolver doenças com desfechos mais graves e ajudar a elaborar protocolos clínicos efetivos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar os fatores de virulência das cepas de *H. pylori* provenientes de pacientes dispépticos com e sem história familiar de câncer gástrico.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Caracterizar os genótipos *cagA*, *vacA* e alelos das cepas de *H. pylori* provenientes de pacientes com e sem história familiar de câncer gástrico.

Correlacionar a presença do gene *CagA* com o grau de atividade e de inflamação da gastrite crônica encontrada nos pacientes estudados

Avaliar o número de sítios de fosforilação de tirosina da proteína *CagA* EPIYA do *H. pylori* nos grupos estudados.

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1. Casuística**

Foram convidados para participar do estudo, indivíduos com queixas de dispepsia com e sem história familiar de câncer gástrico atendidos no ambulatório de gastroenterologia do Hospital Universitário Walter Cantídio, que aceitaram participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, fazendo um total de 120 pacientes. As amostras selecionadas para este estudo foram àquelas positivas para a presença de *Helicobacter pylori*, através do teste da urease e hispatologia.

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

#### **3.2. Desenho do Estudo**

Estudo descritivo e analítico transversal.

#### **3.3. Seleção dos Pacientes**

Foram critérios de inclusão:

- Idade mínima de 18 anos e máxima de 80 anos de ambos os sexos;
- Indivíduos parentes em primeiro grau de pacientes com história familiar de câncer não-cárdia;
- Pacientes com queixas dispépticas persistentes e sem história familiar de câncer gástrico, os quais foram encaminhados para investigação diagnóstica;
- Pacientes que assinaram o termo de consentimento informado.

Foram critérios de exclusão:

- Gravidez ou lactação;
- Condições associadas a distúrbios da fisiologia gástrica, como vagotomia, cirurgia prévia de ressecção gástrica, síndrome de Zollinger-Ellison ou estenose pilórica;
- Insuficiência Renal, Insuficiência hepática, Insuficiência Cardíaca Congestiva ou instabilidade hemodinâmica que contra-indique a investigação endoscópica.



### **3.4. Métodos**

#### **3.4.1. Coleta de fragmentos de mucosa gástrica**

Fragmentos de mucosa gástrica dos pacientes dispépticos foram obtidos durante a esofagogastroduodenoscopia. A endoscopia foi realizada com o paciente em jejum de, no mínimo 8 horas, após receber Diazepam (5 mg por via oral) e anestesia tópica da orofaringe com Cloridrato de Lidocaína (Xilocaína spray a 10%). Antecedendo a cada exame, o endoscópio foi lavado vigorosamente com água e sabão e mergulhado em glutaraldeído a 2,0% por 30 minutos.

Fragmentos de mucosa gástrica foram colhidos na pequena curvatura do antro e na grande curvatura do corpo gástrico para o teste da urease pré-formada (n=1) e o estudo histopatológico (n=2).

O teste da urease pré-formada (teste ultra-rápido) foi realizado na sala da endoscopia pela imersão de um fragmento da região antral em tubo contendo uréia e indicador de pH. A análise foi efetuada imediatamente após a coleta do material e uma leitura final foi realizada uma hora após. O teste rápido da urease foi considerado positivo quando houve mudança da coloração da uréia de “amarelo” para “vermelho”. Nos casos em que a solução permaneceu “amarela” por vinte e quatro horas após a coleta, o teste foi considerado negativo. Quando houve dificuldade em estabelecer a mudança de coloração, o teste foi tido como indeterminado.

#### **3.4.2. Estudo histopatológico**

A análise histopatológica foi realizada no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Os fragmentos de mucosa gástrica, amostras do corpo e do antro provenientes do exame endoscópico, foram fixados em formol, desidratados em álcool e xilol e a seguir incluídos em parafina. Cortes de 4 µm de espessura foram obtidos. As lâminas foram coradas pela Hematoxilina-Eosina para estudo histopatológico. Essas lâminas foram examinadas em microscópio óptico, por dois patologistas sem o conhecimento de quaisquer resultados, sendo avaliada a concordância inter-observador com posterior revisão de todas as lâminas.

Foi considerado material suficientemente adequado para a análise histopatológica quando as amostras incluíram toda a espessura da mucosa, necessária para avaliar a presença de atrofia e o nível do infiltrado inflamatório.

Os achados histológicos da mucosa gástrica foram interpretados de acordo com a classificação de Sidney ligeiramente modificada, através da colheita de cinco fragmentos de biópsias gástricas (Dixon *et al*, 1996), como descrito a seguir: a) Ausência de gastrite - nenhuma alteração do epitélio superficial ou glandular, com ausência de células inflamatórias na lâmina própria (grau 0); b) Intensidade da gastrite, que será graduada em leve (grau 1), moderada (grau 2) ou intensa (grau 3) com base na presença de mononucleares na lâmina própria e/ou no epitélio superficial ou glandular e c) Intensidade da atividade inflamatória, que será graduada em leve (grau 1), moderada (grau 2) ou intensa (grau 3) em relação à presença de polimorfonucleares na lâmina própria e/ou no epitélio superficial ou glandular. Foi também usada uma graduação de 0 – 4, para pontuar a intensidade da inflamação pela presença de mononucleares, a atividade inflamatória por polimorfonucleares, atrofia, metaplasia intestinal e displasia no antro (A) e no corpo (C) gástrico, preenchendo os requisitos de: ausência (0), discreta (1), moderada (2), acentuada (3) e inadequada (4) para essas alterações.

A presença de gastrite atrófica, metaplasia intestinal, pólipo adenomatoso e displasia foram classificados como lesões pré-cancerosas. Além disso, a análise histopatológica avaliou a amostra quanto a ausência (0), presença (1) e amostra inadequada (4) dos seguintes achados: folículos linfóides, edema, erosões, atrofias degenerativas, vacuolização citoplasmática, diminuição do muco, atipias regenerativas e hiperplasia foveolar no antro (A) e no corpo (C).

#### **3.4.3. Critérios de positividade e negatividade para o *H. pylori***

Os pacientes foram considerados positivos para a infecção pelo *H. pylori* quando os testes da urease pré-formada e histologia foram positivos. Todas as amostras foram confirmadas através da PCR.

#### **3.4.4. Extração do DNA de *Helicobacter pylori* em tecido de biópsia gástrica**

Para a extração do DNA bacteriano do *H. pylori*, foi feita a maceração das amostras de biópsias. O material genômico foi extraído das amostras com os reagentes do QIAamp DNA mini kit (QIAGEN<sup>®</sup>), como manda o fabricante. Resumidamente, a digestão do material celular foi feita em minitubos Eppendorf, com 180µL de tampão ATL e 20µL de Proteinase K, que são colocados em banho-maria a 56°C, por vinte e quatro horas.

Após a digestão, foram adicionados 200µL de tampão AL, e incubou-se em banho-maria a 70°C por dez minutos, em seguida, adicionou-se 200µL de Etanol 100%.

O conteúdo foi transferido para que fosse eluído em coluna Spin QIAamp<sup>®</sup>, centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto em microcentrífuga Eppendorf, o filtrado foi descartado e foram adicionados 250µL de tampão AW1 (QIAGEN<sup>®</sup>), fazendo duas centrifugações a 8.000 rpm por um minuto, depois, foram colocados 250µL de tampão AW2, com centrifugação a 14.000 rpm por três minutos, repetindo o procedimento.

Por último, adicionaram-se 50µL de tampão AE, centrifugando a 8.000 rpm por um minuto e repetindo essa última lavagem para uma eficaz extração do material genético. Após a extração do DNA, as amostras foram estocadas a -20°C até o seu processamento.

#### **3.4.5. Reação em cadeia de Polimerase (PCR)**

O material genômico de *H. pylori* extraído das biópsias gástricas foi utilizado como molde de DNA para a amplificação dos fragmentos dos genes *cagA* e *vacA* e seus alelos a partir de “primers” específicos previamente descritos na literatura. Foram colocados 5,0µL do DNA extraído em tubos específicos e foram adicionados os seguintes reagentes: 12,5µL da enzima Taq-DNA polimerase GoTaq green<sup>®</sup>, que catalisa as reações; 2,5µL dos “primers” específicos para o gene *ureA*, que é típico de todas as cepas de *H. pylori*, no intuito de confirmar tratar-se realmente da bactéria em estudo; 2,5µL dos “primers” para o gene *cagA* e para os alelos *s1*, *m1* e *m2* do gene *vacA*, para identificar as cepas que possuem estes genótipos. As reações ocorreram separadas para cada gene. A tabela 1 indica os primers que foram utilizados para cada marcador.

A amplificação do DNA extraído foi realizada em termociclador, obedecendo o protocolo de ciclos específicos para o gene *ureA*, para o gene *cagA* e para os alelos *s1*, *m1* e *m2* do gene *vacA*.

As condições da reação para a amplificação do gene *ureA*, segundo Atherton et al., 1995, foram as seguintes: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos; 35 ciclos com desnaturação a 94°C por um minuto; anelamento a 45°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, seguidos de uma extensão final a 72°C por cinco minutos. O gene *ureA* foi identificado por tratar-se de um marcador da presença do *H. pylori*.

Para o gene *cagA*, as condições foram as seguintes: 1 ciclo para desnaturação inicial de um minuto e meio a 94°C, 39 ciclos com desnaturação a 94°C por um minuto;

anelamento a 55°C por um minuto e extensão a 72°C por dois minutos, seguidos de mais um ciclo de extensão final a 72°C por sete minutos.

A sequência sinal (alelo *s1*) do gene *vacA* foi amplificada da seguinte forma: 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C, 34 ciclos com desnaturação a 95°C por um minuto; anelamento a 52°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, seguido de mais um ciclo de extensão final de sete minutos a 72°C. Para os alelos da região média do gene *vacA* (*m1* e *m2*), a amplificação deu-se da seguinte maneira: 1 ciclo inicial a 95°C de um minuto e trinta segundos, seguido de 34 ciclos com desnaturação de trinta segundos a 95°C; anelamento a 56°C por um minuto; extensão por um minuto e trinta segundos a 72°C e um último ciclo de cinco minutos a 72°C para extensão final.

Após extração e amplificação do DNA, foi realizado um gel de agarose a 2%, corado com Brometo de Etídio. O gel é embebido em tampão Tris Acetato EDTA (TAE), onde são colocadas as amostras para observar a presença das bandas de nucleotídeos do DNA de *H. pylori*, e é corrido por eletroforese a 100V por 40 minutos. O gel é então revelado em câmara eletrônica de ultravioleta para evidenciação dos pares de bases, estabelecendo assim, o resultado positivo ou negativo para o gene *cagA* e para os alelos do gene *vacA* a partir da presença ou ausência das bandas de nucleotídeos pertencentes a esses genes.

Para averiguar a presença dos sítios de fosforilação EPIYA da proteína CagA e os demais subtipos dos alelos do gene *vacA*, as amostras de DNA extraído foram enviadas e analisadas por sequenciamento na Faculdade de Medicina de Belo Horizonte – MG, através de PCR em tempo real, para a observação da quantidade de sítios de fosforilação e dos demais marcadores.

**Tabela 1: Primers usados na amplificação dos genes *cagA* e alelos de *vacA***

Primer	Sequência (5' - 3')	Pares de base
<i>cagA</i> - F	GATAACAGGCAAGCTTTGAGG	349
<i>cagA</i> - R	CTGCAAAAGATTGTTTGCGAGA	
<i>vacA s1</i> - F	ATGGAAATACAACAAACACAC	259
<i>vacA s1</i> - R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	
<i>vacA s2</i> - F	ATGGAAATACAACAAACACAC	286
<i>vacA s2</i> - R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	
<i>vacA m1</i> - F	GTAATGGTGGTTTCAACACC	290
<i>vacA m1</i> - R	TAATGAGATCTTGAGCGCT	
<i>vacA m2</i> - F	GGAGCCCCAGGAAACATTG	352
<i>vacA m2</i> - R	CATAACTAGCGCCTTGAC	

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Características dos pacientes estudados

Dos 120 pacientes avaliados, 94 foram *H. pylori* positivo. Dos 94 pacientes *H. pylori* positivos, 62 (66,0%) eram do sexo feminino e 32 (34,0%) do sexo masculino. A idade variou de 19 a 78 anos, com média de idade de  $41,6 \pm 12,6$  anos (Gráfico 1).

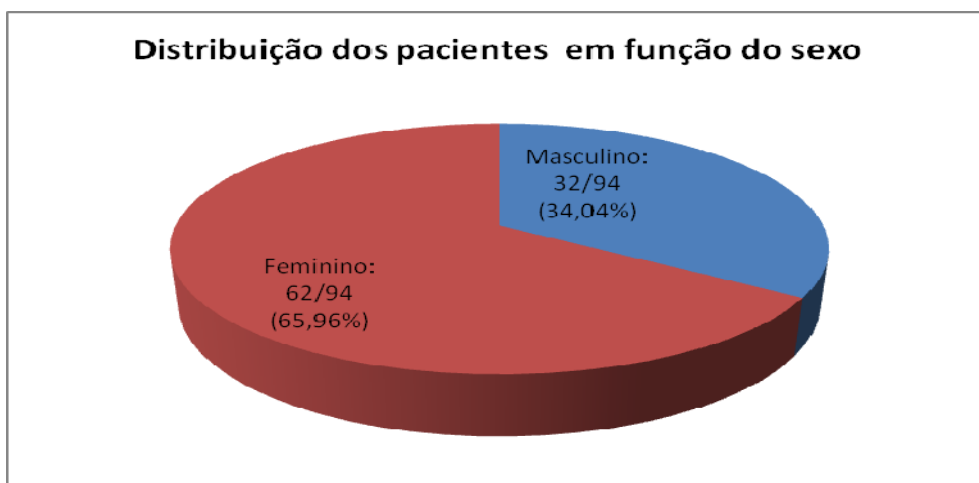
Do total de pacientes estudados, 55 (58,5%), eram familiares em primeiro grau de pacientes com câncer gástrico, que foram denominados de grupo “familiares”, e 39 (41,5%), eram pacientes portadores de dispepsia sem história familiar de câncer gástrico, que foram alocados no grupo “não familiares”.

No grupo dos 55 “familiares”, 17 (30,9%) eram do sexo masculino e 38 (69,1%) do sexo feminino. A média de idade foi de  $40,0 \pm 11,8$  anos.

Dos 39 “não familiares”, 15 (38,5%) eram do sexo masculino e 24 (61,5%) eram do sexo feminino. A média de idade foi de  $43,8 \pm 13,5$  anos (Tabela 2).

Os dois grupos apresentaram características equivalentes com relação ao sexo e faixa etária dos participantes, além de serem provenientes de classes socioeconômicas próximas, apresentando aspectos sócio-culturais e higienodietéticos similares, caracterizando a homogeneidade das amostras.

**Gráfico 1:**



**Tabela 2: Caracterização dos pacientes, por grupos, quanto ao sexo e a idade.**

	Masculino n (%)	Feminino n (%)	Média de Idade (anos)
Familiares de câncer (n= 55)	17 (30,9%)	38 (69,1%)	$40,0 \pm 11,8$
Não Familiares de câncer (n= 39)	15 (38,5%)	24 (61,5%)	$43,8 \pm 13,5$

#### 4.2. Caracterização dos pacientes estudados quanto aos sintomas.

Dos 94 pacientes estudados, 55 (58,5%) relataram sentir epigastralgia recorrente. Destes, 33 (60,0%) eram do grupo dos “familiares” e 22 (40,0%) do grupo “não familiares”.

Do total de pacientes estudados, 28 (29,8%) relataram ter disfagia, sendo, 16/55 (29,1%) no grupo dos familiares e 12/28 (42,9%) do grupo “controle”.

#### 4.3. Caracterização dos pacientes quanto ao exame endoscópico.

Dos 94 pacientes estudados, 8 apresentaram diagnóstico normal na endoscopia (1 familiar de paciente com câncer e 7 do grupo “não familiares”). Do total de pacientes estudados, 86 (95,7%) apresentaram alguma alteração no exame endoscópico, sendo, 54 (62,8%) “familiares” e 32 (37,2%) “não familiares”.

Gastrite antral foi detectada em 23 casos. Gastrite corpal foi encontrada em 12 pacientes e pangastrite em 18 pacientes segundo os achados endoscópicos.

O edema no antro foi observado em 12 casos do total dos indivíduos estudados. A erosão no antro gástrico foi vista em 33 pacientes

Edema no corpo gástrico foi evidenciado em 7 pacientes. Erosões no corpo gástrico foram vistas também em 7 pacientes do total estudado.

A tabela 3 apresenta a caracterização da amostra de pacientes estudados, quanto ao diagnóstico endoscópico, por grupos de “familiares” e “não familiares” de câncer gástrico.

**Tabela 3: Distribuição dos pacientes, por grupos, em função do diagnóstico endoscópico**

	familiar de cancer	não familiar de cancer	Subtotal
Diagnóstico normal	1/8	7/8	8/94 (8,5%)
Gastrite antral	12/23	11/23	23/94 (24,5%)
Gastrite corpal	10/12	2/12	12/94 (12,8%)
Pangastrite	9/18	9/18	18/94 (19,1%)
Edema no corpo gástrico	4/7	3/7	7/94 (7,4%)
Edema no antro gástrico	7/12	5/12	12/94 (12,8%)
Erosões no corpo gástrico	4/7	3/7	7/94 (7,4%)
Erosões no antro gástrico	23/33	10/33	33/94 (35,1%)

#### 4.4. Caracterização dos pacientes estudados através do histopatológico

No exame histopatológico, 3 dos 94 pacientes apresentaram úlcera gástrica, e 4 apresentaram úlcera duodenal.

Com relação ao diagnóstico de gastrite crônica pelo histopatológico: 10 pacientes apresentaram gastrite crônica do antro gástrico, 12 apresentaram gastrite crônica do corpo gástrico e 67, apresentaram gastrite crônica do antro e do corpo gástrico.

A presença de gastrite crônica com atrofia do antro foi detectada em 4 dos pacientes estudados. Gastrite crônica com atrofia do corpo foi encontrada em 6 pacientes, bem como, houveram mais 6 casos detectados de gastrite crônica com atrofia no antro e no corpo gástrico

Gastrite crônica com metaplasia intestinal no histopatológico foi detectada em 16 dos pacientes estudados. (Tabela 4).

A tabela 4 apresenta a caracterização da amostra de pacientes estudados, quanto ao diagnóstico histopatológico, por grupos de “familiares” e “não familiares” de câncer gástrico.

**Tabela 4: Distribuição dos pacientes, por grupos, em função do diagnóstico histopatológico**

	familiar de câncer (n= 55)	não familiar de câncer (n=39)	Subtotal (n=94)
Úlcera gástrica	0	3/3	3/94 (3,2%)
Úlcera duodenal	2/4	2/4	4/94 (4,3%)
Gastrite crônica antral	5/10	5/10	10/94 (10,6%)
Gastrite crônica corporal	8/12	4/12	12/94 (12,8%)
Gastrite crônica do antro e do corpo	44/67	23/67	67/94 (71,3%)
Gastrite crônica atrófica antral	3/4	1/4	4/94 (4,3%)
Gastrite crônica atrófica corporal	3/6	3/6	6/94 (6,4%)
Gastrite crônica com metaplasia	9/16	7/16	16/94 (17,0%)
Gastrite crônica com atrofia do antro e do corpo	3/6	3/6	6/94 (6,4%)

#### 4.5. Caracterização do gene *vacA* e seus alelos nas cepas de *H. pylori* estudadas

O gene *vacA* foi encontrado em todos os 94 pacientes estudados. Neste estudo, foram genotipados os alelos de *vacA* e as combinações entre sequência sinal (*s1* e *s2*) e região média (*m1* e *m2*) do gene.

Das cepas encontradas nos indivíduos estudados, 43 (45,7%) apresentaram o alelo *vacA s1m1*; 25 (26,6%) tinham o alelo *s1m2*; 4 (4,3%) eram *vacA s2m1*; 10/94 (10,6%) apresentaram *vacA s2m2*; 2 cepas das 94(2,1%) foram híbridas na sequência sinal, apresentando o genótipo *vacA s1s2m2*; 1 cepa das 94(1,1%) foi híbrida tanto na sequência sinal quanto na região média, expressando o genótipo *vacA s1s2m1m2* e 9 cepas (9,6%) apresentaram o alelo da sequência sinal(*s*) , porém não expressaram alelo da região média(*m*).

As cepas presentes no grupo dos 55 familiares de pacientes com câncer apresentaram a seguinte distribuição: 29 (52,7%) expressaram o gene *vacA* com alelo *s1m1*; 10 (18,8%) foram *vacA s1m2*; 2 (3,7%) eram *vacA s2m1*; 6 (10,9%) apresentaram *vacA s2m2*, 1 cepa (1,8%) foi híbrida na sequência sinal, apresentando *vacA s1s2m2*; 6 cepas (10,9%) apresentaram sequência sinal (*s*), porém não expressaram região média (*m*) do gene. Foi neste grupo que 1 cepa das 55 (1,8%) apresentou-se híbrida para a sequência sinal e para a região média do gene, apresentando o genótipo *vacA s1s2m1m2*.

No grupo dos 39 “não familiares”, a distribuição das cepas foi a seguinte: 14 (35,9%) eram *vacA s1m1*; 15 (38,5%) apresentaram genótipo *vacA s1m2*; 2 (5,1%) foram *vacA s2m1*; 4 (10,2%) eram *vacA s2m2*; 3 (7,7%) apresentaram a sequência sinal com ausência da região média do gene, e 1 cepa(2,6%) era híbrida na sequência sinal, expressando o genótipo *vacA s1s2m2*.

A tabela 5 mostra a genotipagem das cepas de *H. pylori* com relação aos alelos do gene *vacA* e ao gene *cagA*, distribuídos nos grupos de familiares e não familiares de câncer.



Tabela 5: Gene <i>cagA</i> , <i>vacA</i> e alelos em pacientes com e sem historia familiar de câncer				
Genótipos	Familiar de câncer	Não familiar de câncer	Subtotal (n = 94)	valor de <i>p</i>
<i>vacA</i> s1m1	29/55 (52,72%)	14/39 (35,89%)	43	0,107
<i>vacA</i> s1m2	10/55 (18,18%)	15/39 (38,46%)	25	0,028
<i>vacA</i> s2m1	2/55 (3,63%)	2/39 (5,13%)	4	0,724
<i>vacA</i> s2m2	6/55 (10,90%)	4/39 (10,25%)	10	0,919
<i>vacA</i> s1s2m1m2	1/55 (1,81%)	0/39 (0,00%)	1	1
<i>vacA</i> s1s2m2	1/55 (1,81%)	1/39 (2,56%)	2	1
<i>vacA</i> s com ausência de alelo m	6/55 (10,90%)	3/39 (7,69%)	9	0,414
<i>cagA</i> positivo	51/55 (92,7%)	32/39 (82,0%)	82	
<i>cagA</i> negativo	4/55 (7,3%)	8/39 (20,5%)	12	0,058
Total	55	39		

#### 4.6. Caracterização das cepas de *H. pylori* quanto ao gene *cagA* e os sítios de fosforilação de tirosina EPIYA da proteína CagA

Dos pacientes infectados pelo *H. pylori*, 82/94 (87,2%) tinham cepas *cagA*-positivas, através da análise de PCR e presença de sítios de fosforilação da proteína CagA (EPIYA), sendo que 72 foram caracterizadas pelo PCR e no sequenciamento dos sítios EPIYA, foram caracterizadas mais 10 cepas além do número encontrado pela PCR.

Dos 82 pacientes *cagA*-positivos, 76 (93,9%) apresentaram expressão de pelo menos um sítio de fosforilação EPIYA da proteína CagA, sendo que 45/76 (59,2%) tinham um sítio C de fosforilação da proteína; 29/76 (38,2%) tinham dois sítios C, e 2/76 (2,6%) tinham três sítios C de fosforilação EPIYA da proteína CagA. (Tabela 5).

Dos familiares de pacientes com câncer, 51 (92,7%) estavam infectados por cepas de *H. pylori* *cagA*-positivas. Destes, 45 (88,2%) apresentaram expressão de sítios de fosforilação EPIYA da proteína CagA, sendo: 25/45 (55,6%) com um sítio C de fosforilação da proteína; 19/45 (42,2%) tinham dois sítios C e 1/45 (2,2%) tinham três sítios de fosforilação EPIYA.

No grupo dos pacientes “não familiares”, 31/39 (79,5%) apresentavam cepas de *H. pylori* *cagA*-positivas, sendo que 31/31 (100,0%) apresentavam cepas com expressão

dos sítios de fosforilação da proteína CagA, onde: 20/31 (64,5%) expressaram um sítio C de EPIYA; 10/31 (32,2%) dois sítios C e 1/31 (3,3%) tinham três sítios C de fosforilação EPIYA da proteína CagA (Tabela 6).

#### 4.7. Caracterização das cepas de *H. pylori* quanto a associação dos genes *cagA* com *vacA* e alelos.

Dos 82 pacientes que apresentaram cepas *cagA* positivas, encontrou-se o seguinte perfil: 43 (52,4%) eram cepas que expressavam o genótipo *cagA/vacA s1m1*; 22 cepas (26,8%) tinham a expressão de *cagA/vacA s1m2*; somente uma cepa apresentou o alelo *vacA s2m1* associado ao gene *cagA*; 6 cepas (7,3%) tinham a combinação *cagA/vacA s2m2*; 7 cepas apresentaram o gene *cagA* associado ao *vacA* tendo a sequência sinal, porém, com ausência da região média do gene. Todas as 3 cepas híbridas para os alelos do gene *vacA* encontradas eram também *cagA* positivas (Tabela 7).

**Tabela 6: Distribuição dos pacientes, por grupos, quanto ao número de sítios EPIYA**

Sítios EPIYA	Familiar de câncer	Não familiar de câncer	
ABC	25/45 (55,6%)	20/31 (64,5%)	
ABCC	19/45 (42,2%)	10/31 (32,2%)	
ABCCC	1/45 (2,2%)	1/31 (3,3%)	$p = 0,32$
Total	45	31	

**Tabela 7: Presença de cepas *cagA* com alelos *vacA***

	<i>cagA</i> positivo	valor de $p$
<i>vacA s1m1</i>	43/82 (52,4%)	
<i>vacA s1m2</i>	22/82 (26,8%)	
<i>vacA s2m1</i>	1/82 (1,3%)	
<i>vacA s2m2</i>	6/82 (7,3%)	
<i>vacA s</i>	7/82 (8,6%)	
<i>vacA híbrida</i>	3/82 (3,6%)	0,43

#### 4.8. Corrrelação entre cepas cagA-positivo nos casos de gastrite

Do total de pacientes estudados, 89 (94,7%), apresentavam algum tipo de gastrite crônica (antral, corporal ou pangastrite). Destes, 76/89 (85,4%) tinham cepas cagA positivas, sendo 51/76 (67,1%) de familiares de pacientes com câncer gástrico e 25/76 (32,9%) de pacientes do grupo “não familiares” ( $p= 0,004$ ).

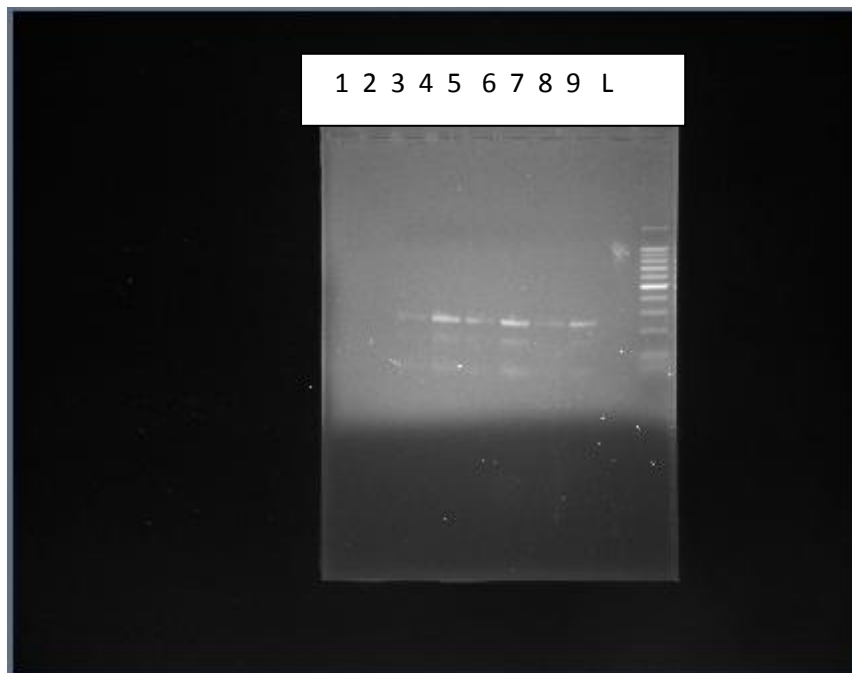
Dos 76 pacientes que tinham cepas cagA positivo, 11 (14,5%) apresentavam gastrite crônica do corpo gástrico, 7 (9,2%) apresentavam gastrite crônica do antro e 58 (76,3%) tinham gastrite crônica do antro e do corpo.

Com relação ao grau de inflamação e atividade de polimorfonucleares no antro gástrico dos pacientes com cepas cagA positivo, 73,2% apresentaram grau moderado de inflamação antral ( $p= 0,29$ ), e 42,7% apresentaram atividade neutrofílica moderada ( $p= 0,01$ ).

O grau de inflamação no corpo gástrico dos pacientes que tinham cepas cagA positivo foi moderada em 54,9% destes indivíduos ( $p= 0,08$ ). A atividade de polimorfonucleares no corpo gástrico foi predominantemente moderada nos pacientes que tinham cepas cagA ( $p= 0,02$ ), uma vez que não houve atividade moderada ou acentuada naqueles que tinham cepas cagA-negativas (Tabela 8).

Tabela 8: Tipos de inflamação gástrica em relação à presença do gene cagA				
Tipo	Grau	cagA positivo	cagA negativo	valor de $p$
Inflamação Antral	Discreta	9/82 (11,0%)	6/12 (50,0%)	0,29
	Moderada	60/82 (73,2%)	6/12 (50,0%)	
	Acentuada	2/82 (24,4%)	0	
Atividade Antral	Discreta	25/82 (30,5%)	7/12 (58,3%)	0,01
	Moderada	35/82 (42,7%)	2/12 (16,6%)	
	Acentuada	2/82 (24,4%)	0	
Inflamação corporal	Discreta	27/82 (32,9%)	8/12 (66,6%)	0,08
	Moderada	45/82 (54,9%)	2/12 (16,6%)	
	Acentuada	1/82 (12,2%)	0	
Atividade corporal	Discreta	36/82 (43,9%)	2/12 (16,6%)	0,02
	Moderada	15/82 (18,3%)	0	
	Acentuada	0	0	

**Figura 1: Gel de Agarose para visualização das bandas do alelo s1 do gene vacA.**



Da esquerda para a direita tem-se:

Poço 1: Controle negativo

Poço 2: vacA s1 negativo

Poço 3: vacA s1 negativo

Poço 4: vacA s1 positivo

Poço 5: vacA s1 positivo

Poço 6: vacA s1 positivo

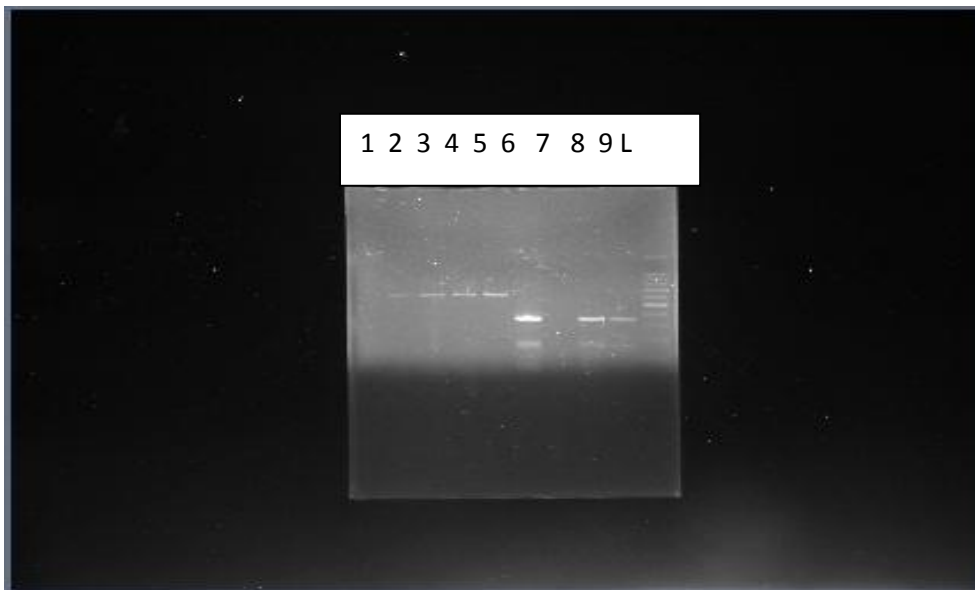
Poço 7: vacA s1 negativo

Poço 8: vacA s1 positivo

Poço 9: vacA s1 negativo

Poço L: DNA Ladder

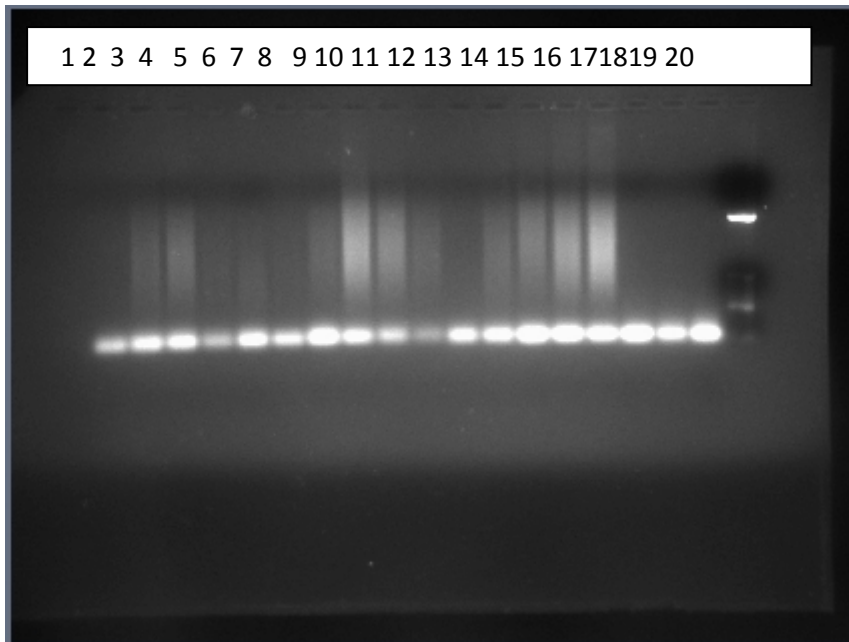
**Figura 2: Gel de Agarose para visualização das bandas dos alelos m1 e m2 do gene vacA.**



Da esquerda para a direita tem-se:

Poço 1: Controle negativo	Poço 6: vacA m2 positivo
Poço 2: vacA m1 negativo	Poço 7: vacA m2 negativo
Poço 3: vacA m1 positivo	Poço 8: vacA m2 positivo
Poço 4: vacA m1 positivo	Poço 9: vacA m2 positivo
Poço 5: vacA m1 positivo	Poço L: DNA Ladder

**Figura 3: Gel de Agarose para visualização das bandas do gene cagA.**



Da esquerda para a direita tem-se:

Poço 1: Controle negativo	Poço 11: cagA negativo
Poço 2: cagA negativo	Poço 12: cagA positivo
Poço 3: cagA positivo	Poço 13: cagA positivo
Poço 4: cagA positivo	Poço 14: cagA positivo
Poço 5: cagA negativo	Poço 15: cagA positivo
Poço 6: cagA positivo	Poço 16: cagA positivo
Poço 7: cagA positivo	Poço 17: cagA positivo
Poço 8: cagA positivo	Poço 18: cagA positivo
Poço 9: cagA positivo	Poço 19: cagA positivo
Poço 10: cagA negativo	Poço 20: DNA Ladder

## 5. DISCUSSÃO

A prevalência da infecção pelo *Helicobacter pylori*, sua associação com as doenças gastroduodenais e com o câncer gástrico e a variabilidade genética de suas cepas, faz com que este tema seja relevante e desperte interesse em pesquisas científicas por todo o mundo.

Tem sido bem demonstrado que há uma grande diversidade fenotípica e genotípica do *Helicobacter pylori*, através da expressão de vários genes, tais como o *cagA* e o *vacA*, que codificam proteínas que conferem virulência específica à bactéria (COVER et al., 1990; VAN DOORN et al., 1999).

Os genes da ilha de patogenicidade *cag*, especialmente o *cagA*, têm sido mostrados como envolvidos na indução de respostas pró-inflamatórias nas células da mucosa gástrica de indivíduos infectados com *H. pylori* e que parecem estar envolvidos com desfechos clínicos mais graves (BLASER et al., 2001; ARGENT et al., 2004; MCCLAIN et al., 2009).

Neste estudo, foram genotipadas 94 cepas de *H. pylori*, advindas de pacientes infectados com e sem história familiar de câncer gástrico. Em ambos os grupos foi analisado o perfil genético das cepas de *H. pylori* pela presença do gene *vacA* e seus alelos, do gene *cagA* e dos sítios de fosforilação de tirosina da proteína CagA (EPIYA).

Todas as cepas das amostras de biópsias analisadas, apresentaram o gene *vacA* em sua diversa combinação de alelos entre a sequência sinal (*s1* e *s2*), e a região média (*m1* e *m2*) do gene, o que é concernente com a literatura (ATHERTON et al., 1995; VAN DOORN et al., 1998; UMIT et al., 2008). Foram encontradas ainda três cepas com alelos mistos (*s1s2m2* e *s1s2m1m2*). Nove cepas expressaram somente a sequência sinal sem expressar a região média. A presença de cepas de *H. pylori* com alelos híbridos do gene *vacA* é também reportado em outros estudos de genotipagem da bactéria (SICINSCHI et al., 2003; WANG et al., 2003). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos com relação à presença dos alelos *s1m1 s2m1*, *s2m2* do gene *vacA*. Houve significância entre os grupos com relação à presença do alelo *s1m2* do gene *vacA*, que estava presente majoritariamente no grupo dos “não familiares”. É relatado na literatura que esse alelo não pode ser tido como um marcador efetivo de virulência da bactéria, (WANG et al., 2003; UMIT et al., 2008)

O índice de cepas *cagA*-positivas sofre variações de acordo com a área geográfica e a população estudada. Estudos anteriores acharam diferenças na positividade para o gene *cagA* na Turquia, onde foi reportada diferença de 61,7 a 80,4% de cepas *cagA*-positivas em pacientes dispépticos (DEMITURK et al., 2001; BULENT et al., 2003). No Brasil, essas diferenças também são encontradas em estudos nas diversas regiões do país (EVANS et al., 1998; ASHOUR et al., 2001; BRITO et al., 2003; MARTINS et al., 2005; MATTAR et al., 2007; CABRAL et al., 2007).

Nesse estudo, 87,2% das cepas de *H. pylori* estudadas foram *cagA*-positivas. A presença do gene *cagA* foi baseada em resultado obtido por PCR e sequenciamento dos sítios EPIYA, método mais acurado para detecção deste gene (ARGENT et al., 2004). Não houve diferença estatisticamente significativa da presença do gene *cagA* entre os grupos de familiares e não familiares, com percentuais respectivos de 92,7% e 79,5% ( $p=0,443$ ).

As cepas *cagA* estavam presentes em 85,4% dos pacientes portadores de gastrite, havendo maior significância estatística no grupo dos familiares de câncer, com percentuais respectivos de 67 % e 32,8%, entre os grupos estudados ( $p=0,004$ ). Com relação ao grau de atividade e inflamação da gastrite, houve significância maior no grupo de pacientes *cagA* positivo com pangastrite e gastrite corporal ( $p=0,002$ ). No antro houve significância apenas na atividade da gastrite ( $p=0,001$ ).

Os resultados encontrados no presente estudo são similares a outros relatados em estudos anteriores de genotipagem do *H. pylori* no Brasil em outros países. Yamaoka et al. (1999), em estudo multicêntrico realizado em quatro países (China, Colômbia, Portugal e Estados Unidos), analisando a infecção por cepas de *H. pylori* *cagA* positivas em pacientes com gastrite, úlcera duodenal e câncer gástrico, obteve achados percentuais acima de 80% em quase todos os grupos estudados. Queiroz et al. (1998) e Oliveira et al. (2003), em Minas Gerais, encontraram um predomínio de 79,8% de cepas *cagA* em pacientes com gastrite crônica, concluindo que há associação entre a presença do gene *cagA* e o alto grau de inflamação antral em adultos.

Em Pernambuco, Brito et al. (2003), estudaram 40 pacientes com gastrite e encontraram prevalência do gene *cagA* em 60%. Em São Paulo, Gatti et al. (2005; 2006), acharam prevalência das cepas *cagA* do *H. pylori* em pacientes com gastrite em torno de 48% e 69%, respectivamente, sendo um valor relativamente baixo e diferente do



encontrado no presente estudo assim como nos demais estudos de genotipagem realizados no país.

Nas cepas estudadas, foram encontrados sítios de fosforilação da tirosina da proteína CagA com os segmentos EPIYA A,B e C, de acordo com o que é descrito na literatura para as cepas ocidentais de *H. pylori*. Os resultados confirmam os achados de sítios de fosforilação descritos na literatura (HATAKEYAMA et al., 2005).

Com relação ao número de sítios de fosforilação EPIYA da proteína CagA 2,6% das cepas apresentaram três sítios C, 38,2% apresentaram dois sítios C e 59,2% tinham apenas um sítio C de fosforilação. Não houve relevância estatística entre os grupos de familiares e não familiares de câncer com relação ao número de sítios EPIYA expressos nas cepas de *H. pylori* ( $p= 0,32$ ), uma vez que a maioria das cepas expressou dois ou menos sítios de fosforilação, o que não confere maior poder patogênico à bactéria.

Não foram feitos estudos prévios no Brasil e não existem trabalhos na literatura envolvendo a genotipagem das cepas de *H. pylori* em familiares de pacientes com câncer gástrico. A maioria dos trabalhos avaliaram o perfil das cepas de *H. pylori* principalmente através dos genes *vacA* e *cagA* por PCR, tendo sido realizados poucos estudos envolvendo o sequenciamento dos sítios de fosforilação EPIYA, não havendo portanto, parâmetros de comparação totalmente equivalentes para o presente estudo.

A busca por marcadores biomoleculares que confirmem maior patogenicidade ao *Helicobacter pylori* tem sido um dos pontos mais investigados sobre os mecanismos na patogênese deste microorganismo e tem assumido importância científica e clínica considerável.

É importante a avaliação desses marcadores do microorganismo, aliados a outros fatores genéticos, bem como, às respostas imunológicas desencadeadas pelo hospedeiro para se estabelecer com clareza o papel do *H. pylori* nos diversos quadros clínicos a ele relacionado.

## 6. CONCLUSÃO

Os alelos do gene *vacA s1* foram observados em todas as amostras analisadas, apresentando também cepas com alelos mistos desse gene, sugerindo um polimorfismo genético da bactéria com relação à combinação em mosaico desses alelos.

As cepas *cagA* foram altamente prevalentes na amostra estudada de pacientes dispépticos, não havendo diferença entre os grupos estudados. O gene *cagA* esteve presente na maioria dos pacientes portadores de gastrite, havendo maior significância estatística no grupo dos familiares de câncer. O grau de atividade e inflamação da gastrite, foi mais significativa no grupo de pacientes com cepas *cagA* positivo, com pangastrite e gastrite corporal. No antro somente houve significância com relação a atividade da gastrite.

As cepas estudadas apresentaram perfil genético de sítios de fosforilação de tirosina EPIYA com resíduo C, que é descrito para o tipo de cepas ocidentais do *H. pylori*. Sendo a maioria das cepas com 1 sítio C de fosforilação, um número reduzido apresentou três sítios C. Não houve diferença estatística com relação ao número de sítios EPIYA, entre os grupos estudados de familiares e não familiares de câncer.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ARAS, R. A.; LEE, Y.; KIM, S. K.; ISRAEL, D.; PEEK, R. M. Jr.; BLASER, M. J. Natural variation in populations of persistently colonizing bacteria affect human host cell phenotype. **J. Infect. Dis.**, v.188: p. 486–496, 2003.

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

ASHOUR, A. A. R.; COLLARES, G. B.; MENDES, E. N.; de GUSMÃO, V. R.; QUEIROZ, D. M. M.; MAGALHÃES, P. P.; CARVALHO, A. S. T.; OLIVEIRA, C. A.; NOGUEIRA, A. M. M. F.; ROCHA, G. A.; ROCHA, A. M. C. iceA genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from brazilian children and adults. **J. of Clin. Microb.**, v. 39, n. 5: p. 1746-1750, 2001.

ATHERTON, J. C.; CAO, P.; PEEK, R. M.; TUMMURU, M. K. R.; BLASER, M. J.; COVER, T. L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 1771-1777, 1995.

BACKERT, S.; SCHWARZ, T.; MIEHLKE, S.; KIRSCH, C.; SOMMER, C.; KWOK, T.; GERHARD, M.; GOEBEL, U. B.; LEHN, N.; KOENING, W.; MEYER, T. F. Functional analysis of the cag pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 2: p. 1043-1056, Feb. 2004.

BARTCHEWSKY JR., W.; MARTINI, M. R.; MASIERO, M.; SQUASSONI, A. C.; ALVAREZ, M. C.; LADEIRA, M. S.; SALVATORE, D.; TREVISAN, M.; PEDRAZZOLI JR., J.; RIBEIRO, M. L. Effect of *Helicobacter pylori* infection on IL-8, IL-1 $\beta$  and COX-2 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 44, n. 2: p. 153-161, 2009.

BARTHEL, J. S.; EVERETT, E. D. Diagnosis of *Campylobacter pylori* infections: The “gold standard” and the alternatives. **Rev. Infect. Dis.**, v.12: p. S107, 1990.

BLASER, M. J.; PEREZ-PEREZ, G. I.; KLEANTHOUS, H.; COVER, T. L.; PEEK, R. M.; CHYOU, P. H.; STEMMERMANN, G. N.; NOMURA, A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cag A is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*, v.55, p.2111-2115, 1995.

BLASER, M. J.; CRABTREE, J. E. CagA and the outcome of *Helicobacter pylori* infection. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 106: p. 565-567, 1996.

BONNEY, G.; ELSTON, E.; CORREA, P.; HAENZEL, W.; ZAVALA, D.E.; ZARAMA, G.; COLLAZOS, T.; CUELLO, C. Genetic etiology of gastric carcinoma I: Chronic gastritis. **Genet. Epidemiol.**, v. 3, p. 213-224, 1986.

BRAGA, L. L. B. C.; MARSHAL, B. J.; GUERRANT, R. L. *H. pylori*: Gastritis, Peptic Ulcer and Gastric Cancer in Developing Countries. **Edge Develop.**, p.127-144, 1995.

BRENNER, H.; BODE, G.; BOEING, H. *Helicobacter pylori* infection among offspring of patients with stomach cancer. **Gastroenterology**, v.118: p.31-35, Jan. 2000.

BRENNER, H.; ARNDT, V.; STEGMAIER, C.; ZIEGLER, H.; ROTHENBACHER, D.: Is *Helicobacter pylori* infection a Necessary Condition for Noncardia Gastric Cancer? **Am J Epidemiol**, v.159, p.252-258, 2004.

BRITO, C. A. A.; SILVA, L. M. B.; JUCÁ, N.; NILMA, C.; LEAL, C. N.; SOUZA, W., QUEIROZ, D.; CORDEIRO, F.; SILVA, N. L. Prevalence of cagA and vacA genes in isolates from patients with *Helicobacter pylori* associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98: p. 817-821, 2003.

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

BULENT, K.; MURAT, A.; ESIN, A., FATIH, K.; MMMURAT, H.; HAKAN, H.; MELIH, K.; MEHMET, A.; BULENT, Y.; FATIH, H. Association of *cagA* e *vacA* presence with ulcer and non-ulcer dyspepsia in a Turkish population. **World J. Gastroenterology**, v.9: p. 1580-1583, 2003.

CABRAL, M. M.; OLIVEIRA, C. A.; MENDES, C. M.; GUERRA, J.; QUEIROZ, D. M. M.; ROCHA, G. A.; NOGUEIRA, A. M. Gastric epithelial cell proliferation and *cagA* status in *Helicobacter pylori* gastritis at different gastric sites. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 42, n. 5: p. 545-554, 2007.

CARNEIRO, F.; TAVEIRA-GOMES, A .; CABRAL-CORREA, A . *et al.* Characteristics of the gastric mucosa of direct relatives of patients with sporadic gastric carcinoma. **Eur. J. Cancer Prev.**, v.2: p.239-246, 1993.

CASSARO, M.; RUGGE, M.; GUTIERREZ, O.; LEANDRO, G.; GRAHAM, D. Y.; GENTA, M. R. M. Topografic patterns of intestinal metaplasia and gastric cancer. **Am. J. Gastroenterol.**, v.95, n.6: p.1431-1438, 2000.

CENSINI, S.; LANGE, C.; XIANG, Z.; CRABTREE, J. E.; GUIARA, P.; BORODOVSKY, M.; RAPPUOLI, R.; COVACCI, A. *cagA*, a patogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.93: p. 14648-13653, 1996.

CHELI, R.; GIACOSA, A. Atrophic gastritis. In: SHERLOCK, P.; MORSON, B.C.; BARBARA, L.; VERONESI, U. (Ed.) **Precancerous lesions for the gastrointestinal tract.**, New York: Raven Press, 1983.

CHOI, K. D.; KIM, N.; LEE, D. H.; KIM, J. M.; JUNG, H. C.; SONG, I. S. Analysis of the 3' Variable Region of the *cagA* Gene of *Helicobacter pylori* Isolated in Koreans. **Dig. Dis. Sci.**, v. 52: p. 960-966, 2007.

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

COELHO, L. G. V. *Helicobacter pylori* e doenças gastroduodenais. In: MINCIS, M. **Gastroenterologia & Hepatologia - Diagnóstico e Tratamento**, São Paulo: Lemos Editorial, p. 313-332, 1998.

- COELHO, L. G. V.; ZATERKA, S.; Núcleo Brasileiro para o estudo do *Helicobacter*. II Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. **Arq. Gastroenterol.**, v.42, n. 2: p. 128-132, 2005.
- CORREA, P. A model for gastric cancer epidemiology. **Lancet**, v. 2, p. 58-59, 1975.
- CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process – First American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. **Cancer Res.**, v. 52, p. 6735 – 6740, 1992.
- COVER, T. L.; DOOLEY, C. P.; BLASER, M. J. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 3: p. 603-610, Mar., 1990.
- CRABTREE, J. E.; SHALLCROSS, T. M.; HEATLEY, R. V.; *et al.* Evaluation of a commercial ELISA for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **J. Clin. Pathol.**, v. 44: p. 326-328, 1991.
- CRABTREE, J. E.; SHALLCROSS, T. M.; HEATLEY, R. V.; WYATT, J. I. Mucosal tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. **Gut**, v.32: p.1473-1477, 1991.
- CRABTREE, J. E.; WYATT, J. I.; TREJDOSIEWICZ, L. K., *et al.*: Inteleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. **J. Clin. Pathol.**, v.47: p.61-66, 1994.
- CWERN, M.; GARCIA, R.; DAVIDSON, M. I.; FRIEDMAN, I. H. Simultaneous occurrence of gastric carcinoma in identical twins. **Am. J. Gastroenterol.**, v.75: p.41-47, 1981.
- DANESH, J. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.13: p. 851-856, 1999.
- DEMITURK, L.; OZEL, A. M.; YAZGAN, Y.; SOLMAZGUL, E.; YILDIRIM, S.; GULTEPE, M.; GURBUZ, A. K. CagA status in dyspeptic patients with and without peptic ulcer disease in Turkey: association with histopathologic findings. **Helicobacter**, v. 6: p. 163-168, 2001.

- DIXON, M. F.; GENTA, R. M.; YARDLEY, J. H.; CORREA, P. Classification and grading of gastritis – the updated Sydney system. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 20: p.1161-1181, 1996.
- EL-OMAR, E. M.; OIEN, K.; MURRAY, L.; EL-NUJUMI, A.; WIRZ, A.; GILLEN, D. *et al.* Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: Critical role of *H. pylori*. **Gastroenterology**, v.118: p. 22-30, Jan. 2000.
- EL-OMAR, E. M.; CARRINGTON, M.; CHOW, W. H., *et al.* Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature**, v.404: p. 398-402, 2000.[ Erratum, Nature, v. 412: p. 99, 2001].
- ESLICK, G.D.; LIM, L.L.; BYLES, J.E.; XIA, H.H; TALLEY, N.J. Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: a meta-analysis. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 94, n. 9: p.2373-2379, 1999.
- EHSO - EUROPEAN HELICOBACTER STUDY GROUP. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III consensus report. **Gut**, v. 56: p. 772-781, 2007.
- EVANS, D. G.; QUEIROZ, D. M. M.; MENDES, E. N.; EVANS JR., D. J. *Helicobacter pylori* cagA status and s and m alleles of vacA in isolates from individuals with a variety of *H. Pylori*-associates gastric diseases. **J. of Clin. Microb.**, v. 36, n. 11: p. 5435-5437, 1998.
- FORMAN, D.; NEWELL, D.; FULLERTON, F. *et al.* Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: Evidence from a prospective investigation. **Biol. Med. J.**, v. 302: p. 1302-1305, 1991.
- FUCHS, C.; MAYER, R.J. Gastric carcinoma. **N Engl J Med.**, v.333: n.1, p. 32-41, Jul. 1995.
- GATTI, L. L.; AGOSTINHO, F. J.; LÁBIO, R., *et al.*, *Helicobacter pylori* and cagA and vacA gene status in children from Brazil with chronic gastritis. **Clin. Med. Exp. Med.**, v. 3: p. 166-172, 2003.
- GATTI, L. L.; FAGUNDES E SOUZA, E. K.; LEITE, K. R.; BASTOS, E. L.; VICENTINI, L. R.; SMITH, M. A. C.; PAYÃO, S. L. M. cagA, vacA alleles and babA2

genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric disease in Brazilian adult patients. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 51, n. 4: p. 231-235, 2005.

GATTI, L. L.; LÁBIO, R.; SILVA, L. C.; SMITH, M. A. C.; PAYÃO, S. L. M. *cagA* positive *Helicobacter pylori* in Brazilian children related to chronic gastritis. **The Brazilian Journal of Infections Diseases.**, v. 10, n.4: p. 254-258, 2006.

GATTI, L. L.; PAYÃO, S. L. M.; SMITH, M. A. C.; FUKUHARA, Y.; MÓDENA, J. L.; de OLIVEIRA, R. B.; BROCHI, M. Prevalence of *Helicobacter pylori cagA*, *iceA* and *babA2* alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. **Acta Trop.**, v. 100, n. 3: p. 232-240, 2006.

GOMES, L. I.; ROCHA, G. A.; ROCHA, A. M. C.; SOARES, T. F.; OLIVEIRA, C. A.; BITTENCOURT, P. F. S.; QUEIROZ, D. M. M. Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with *dupA*-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients. **Int. J. of Med. Microb.**, v. 298: p. 223-230, 2007

GONZALES, C. A.; PENA, S.; CAPELLA, G. Clinical usefulness of virulence factors of *Helicobacter pylori* as predictors of the outcomes of infection. What is the evidence?, **Scand. J. Gastroenterology.**, v. 38, N. 9: P. 905-915, Sept. 2003. Review

GRANHAM, S.; LILENFELD, M. Genetic studies of gastric cancer in humans: na appraisal. **Cancer**, v.11: p. 945-958, 1958.

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

HALL, C. N.; DARKIN, D.; BRIMBLECOMBE, R.; COOK, A. J.; KIRKHAM, J. S.; NORTHFIELD, T. C. Evaluation of the nitrosamine hypothesis of gastric carcinogenesis in precancerous conditions. **Gut**, v. 27: p. 491-498, 1986.

HANSEN, S.; MELBY, K.; AASE, S.; JELLUM, E.; VOLLSET, S. *Helicobacter pylori* infection and risk of cardia cancer and non-cardia gastric cancer. A nested case-control study. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.34: p. 353-360, 1999.



- HANSSON, L.; NYREN, O.; HSING, A.W. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. **N Engl J Med**, v.325, p. 242-249, 1996.
- HATAKEYAMA, M.; HIGASHI, H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. **Cancer Sci.**, v. 96, n. 12: p. 835-843, 2005.
- HAZEL, S. L.; LEE, A.; BRADY, L.; HENNESSEY, W. *Campylobacter pyloridis*: association with intracellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factor in colonization of the gastric epithelium. **J. Inf, Dis.**, v. 153: p. 658-663, 1986.
- HIGASHI, H.; TSUTSUMI, R.; MUTO, S. et al.: SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. **Science**, v.295: p. 683-686, 2002.
- HILL, M.J. Salt and gastric cancer. **Eur. J. Cancer Prev.**, v.7: p. 173-175, 1998.
- HOWDEN, C. W.; HUNT, R. H. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection. **Am. J. Gastroenterol.**, v.93: p. 2330-2338, 1998.
- HOPKINS, R. J.; GIRARDI, L. S.; TURNEY, E. A. Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and reduced duodenal and gastric ulcer recurrence: A review. **Gastroenterology**, v. 110: p. 1244-1252, 1996.
- HOSKING, S. W.; LING, T. K. W.; CHUNG, S. C. S.; YUNG, M. Y.; CHENG, A. F. B.; SUNG, J. J. Y.; LI, A. K. C. Duodenal ulcer healing by eradication of *Helicobacter pylori* without anti-acid treatment: randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 343: p. 508-510, 1994.
- HUANG, J. Q.; SRIDHAR, S. ; CHEN, Y.; HUNT, R. H. Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. **Gastroenterology**, v.114: p. 1169-1179, 1998.
- HUANG, J. Q.; ZHENG, G. F.; SUMANAC, K.; IRVINE, E. J.; HUNT, R. H. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. **Gastroenterology**, v. 125: p.1636 – 1644, 2003.
- ILVER, D.; ARNQVIST, A. ; OGREN, J. et al.: *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. **Science**, v. 279: p.373-377, 1998.

JOSENHANS, C.; SUERBAUM, S. *Helicobacter* motility and chemotaxis. In: ACHTMAN, M.; SUERBAUM, S. (Ed.). ***Helicobacter pylori: molecular and cellular biology***. Wymondham: Horizon Scientific Press, p. 171-184. 2001.

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

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

LA VECCHIA, C.; NEGRI, E.; FRANCESCHI, S.; GENTILE, A. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. **Cancer**, v.70: p. 50-55, 1992.

LADEIRA, M. S; RODRIGUES, M. A.; SALVADORI, D. M; NETO, P. P.; ACHILLES, P.; LERCO, M. M.; RODRIGUES, P. A.; GONÇALVES JR., I.; QUEIROZ, D. M. M.; FREIRE-MAIA, D. V. Relationships between cagA, vacA and iceA genotypes of *Helicobacter pylori* and DNA damage in the gastric mucosa. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 44, n. 2: p. 91-98, 2004.

LAGE, A.P.; GODFROID, E.; FAUCONNIER, A., et al. Diagnosis for *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 10: p. 2752-2756, out., 1995.

LAM, S. K.; CHING, C. K.; LAI, K. C.; WONG, B. C. Y.; LAI, C. L.; CHAN, C. K.; ONG, L. Does treatment of *Helicobacter pylori* with antibiotics alone heal duodenal ulcer? A randomised double blind placebo controlled study. **Gut**, v. 41: p. 43-48, 1997.

LANSDOWN, M.; QUIRKE, P.; DIXON, M. F. et al. High-grade dysplasia of the gastric mucosa: a marker for gastric carcinoma. **Gut**, v. 31, p. 977-983, 1990.

LAUWERS, G. Y.; RIDDELL, R. H. Gastric epithelial dysplasia. **Gut**, v. 45, p.784-790, 1999.

LIMA, V. P.; LIMA, M. A. P.; ANDRÉ, A. R.; FERREIRA, M. V. P.; BARROS, M. A. P.; RABENHORST, S. H. B. *H. pylori* (Cag A) and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas: Correlation with p53 mutation and c-Myc, Bcl-2 and Bax expression. **World. J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 6: p. 884-891

LISSOWSKA, J.; GROVES, F. D.; SOBIN, L. H. *et al.* Family history and risk of stomach cancer in Warsaw, Poland. **Eur. J. Cancer Prev.**, v.8: p. 223-227, 1999. diated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells. **J. Biol. Chem.**, v. 276: p. 44856-44864, 2001.

MACRI, G.; MILANI, S.; SURRENTI, E.; PASSALEVA, M. T.; SALVADORI, G.; SURRENTI, C. Eradication of *Helicobacter pylori* reduces the rate of duodenal ulcer rebleeding: a long-term follow-up study. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 93: p. 925-927, 1998.

MAEDA, S.; AKANUMA, M.; MITSUNO, Y.; HIRATA, Y.; OGURA, K.; YOSHIDA, H.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. Distinct mechanism of *Helicobacter pylori-m*

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

MARSHALL, B. J.; GOODWIN, C. S.; WARREN, J. R.; MURRAY, R.; BLINCOW, E. D.; BLACKBOURN, S. J.; PHILLIPS, M.; WATERS, T. E.; SANDERSON, C. R. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. **The Lancet**, v. 2: p. 1437-1442, 1988.

MARSHALL, B. J. *Helicobacter pylori*. *Am. J. Gastroenterol.*; v. 89: p.116-126, 1994.

MARTINS, L. C.; CORVELO, T. C.; DEMACHKI, S.; ARAUJO, M. T.; ASSUMPÇÃO M. B.; VILAR, S. C.; FREITAS, F. B.; BARBOSA, H. P.; FECURY, A. A.; AMARAL, R. K.; DOS SANTOS, S. E. Clinical and pathological importance of *vacA* allele heterogeneity and *cagA* status in peptic ulcer disease in patients from North Brazil., **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.100, n. 8: p.875-881, dez. 2005.

MATTAR, R.; MARQUES, S. B.; MONTEIRO, M. S.; SANTOS, A. F.; IRIYA, K.; CARRILHO, F. J. *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil., **J. of Méd. Microb.**, v. 56: p. 9-14, 2007.

MEGRAUD, F.; BRASSENS-RABBÉ, M.B.; DENIS, F.; BELBOURI, A.; HOA, D.Q. Seroepidemiology of *Cmpylobacter pylori* infection in various populations. **J. Clin. Microbiol.** v. 27, n.8, p. 1870-1873, 1989.

- MÉGRAUD, F. How should *Helicobacter pylori* infection be diagnosed? **Gastroenterology**, v. 113, p. 93-98, 1997. Supplement.
- MOBLEY, H. L. T. *Helicobacter pylori* urease. In: ACHTMAN, M.; SUERBAUM, S. (Ed.). ***Helicobacter pylori: molecular and cellular biology***. Wymondham: Horizon Scientific Press, p. 155-170. 2001.
- MOBLEY, H. L. T.: *Helicobacter pylori* urease. In: ACHTMAN, M.; SUERBAUM, S. (Ed.) ***Helicobacter pylori: molecular and cellular biology***. Wymondham, United Kingdom: Horizon Scientific Press: p.155-170, 2001.
- MONTGOMERY, E.; MARTIN, M. F.; PEURA, D. A. Rapid diagnosis of *Campylobacter pylori* by Gram's stain. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.90: p.606-609, 1988.
- MORRIS, A.; ALI, M. R.; BROWN, P. et al. *Campylobacter pylori* infection in biopsy specimens of gastric antrum: Laboratory diagnosis and estimation of sampling error. **J. Clin. Pathol.**, v.42: p.727-732, 1989.
- MOTTA, C. R. A.; CUNHA, M. P. S. S.; QUEIROZ, D. M. M.; CRUZ, F. W. S.; GUERRA, E. J. C.; MOTA, R. M. S.; BRAGA, L. L. B. C. Gastric precancerous lesions and *Helicobacter pylori* infection in relatives of gastric cancer patients from northeastern Brazil. **Digestion**, v. 78: p. 3-8, 2008.
- NIH CONSENSUS CONFERENCE. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH consensus development panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. **JAMA**, v. 272: p. 65-69, 1994.
- NIV, Y. Family History of Gastric Cancer: Should We Test and Treat for *Helicobacter pylori*? **J. Clin. Gastroenterol.**, v.36: p. 204-208, 2003.
- NOMURA, A.; STEMMERMANN, G. N.; CHYOU, P. et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. **N. Engl. J. Med.**, v.325: p. 1132-1162, 1991.
- OGAWA, H.; KATO, I.; TOMINAGA, S.: Family history of cancer among cancer patients. **Jpn. J. Cancer Res.**, v.76: p. 113-118, 1985.
- OHATA, H.; KITAUCHI, S.; YOSHIMURA, N.; MUGITANI, K.; IWANE, M.; NAKAMURA, H. et al. Progression of chronic atrophic gastritis associated with

*Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. **Int. J. Cancer**, v. 109: p. 138-142, 2004.

OLIVEIRA, A. G.; SANTOS, A.; GUERRA, J. B.; ROCHA, G. A.; ROCHA, A. M.; OLIVEIRA, C. A.; CABRAL, M. M.; NOGUEIRA, A. M.; QUEIROZ, D. M. babA2- and cagA-positive *Helicobacter pylori* strains are associated with duodenal ulcer and gastric carcinoma in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 8: p. 3964-3966, Aug. 2003.

OLIVEIRA, A. M. R.; QUEIROZ, D. M. M.; ROCHA, G. A.; MENDES, E. N. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. **Am. J. Gastroenterology.**, v. 89, p. 2201 – 2204, 1994.

PARKIN, D. M.; LAARA, E.; MUIR, C. S.: Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. **Int. J. Cancer**, v. 41: p. 184,1988.

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

PARSONNET, J.; FRIEDMAN, G. D.; VANDERSTEEN, D. P. *et al.* *Helicobacter pylori* and the risk of gastric carcinoma. **N Engl J Med**, v.325: p. 1127-1131, 1991.

PEEK, R. M.; MILLER, G. G.; THAM, K. T.; PÉREZ-PÉREZ, G. I.; COVER, T. L.; ATHERTON, J. C.; DUNN, G. D.; BLASER, M. J. Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. **Journal of Clinical Microbiology.**, v. 33, n.1: p. 28-32, 1995.

PENSTON, J. G. *Helicobacter pylori* eradication - understandable caution but no excuse for inertia. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 8: p. 369-389, 1994.

PEREZ-PEREZ, G. I., DWORKIN, B. M., CHODOS, J. E.; BLASER, M.J. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. **Ann. Intern. Med.**, v. 109, n. 1: p.11-17, 1988.

QUEIROZ, D. M. M., MENDES, E. N., ROCHA, G. A. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25: p.2378-2379, 1987.

QUEIROZ, D. M. M., MENDES, E. N., ROCHA, G. A., OLIVEIRA, A. M. R., OLIVEIRA, C. A., MAGALHÃES, P. P., MOURA, S. B., CABRAL, M. M. D. A., NOGUEIRA, A. M. M. F. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. **Int. J. Cancer**, v.78: p.135-139, 1998.

QUEIROZ, D. M. M., MENDES, E. N., CARVALHO, A. S. T., ROCHA, G. A., OLIVEIRA, A.M. R., SOARES, T. F., SANTOS, A., CABRAL, M. M. D. A., NOGUEIRA, A. M. M. F. Factors associated with *Helicobacter pylori* infection by a *cagA*-positive strain in children. **J. Infect. Dis.**, v.181: p. 626-630, 2000.

QUEIROZ, D. M. M.; ROCHA, G. A.; OLIVEIRA, C. A.; ROCHA, A. M. C.; SANTOS, A., CABRAL, M. M. D. A.; NOGUEIRA, A. M. M. F. Role of corpus gastritis and *cagA*-positive *Helicobacter pylori* infection in reflux esophagitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 8: p. 2849-2853, 2002.

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

RIBEIRO, M. L.; GODOY, A. P. O.; BENVENGO, Y. H. B. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian clinical isolates. **Immunol. Med. Microbiol.**, v. 36: p. 181-185, 2003

ROCHA, G. A.; OLIVEIRA, A. M. R.; QUEIROZ, D. M. M, et al. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection by cobas core ELISA in adults from Minas Gerais, Brazil. **Brazil Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 10: p. 1263-1268, 1998.

SANDOR, J.; KISS, I.; FARKAS, O.; EMBER, I. Association between gastric cancer mortality and nitrate content of drinking water: ecological study on small area inequalities. **Eur. J. Epidemiol.**, v.17: p. 443-447, 2001.

SCHNEIDER, N.; KRISHNA, U.; ROMERO-GALLO, J.; ISRAEL, D. A.; PIAZUELO, M. B.; CAMARGO, M. C.; SINCINSCHI, L. A.; SCHNEIDER, B. G.;

- CORREA, P.; PEEK, R. M. Role of *Helicobacter pylori* CagA molecular variations in induction of host phenotypes with carcinogenogenic potential. **J. Infect. Dis.**, v. 119: p. 1-4, Ap. 2009.
- SERAFINI, M.; BELLOCCO, R.; WOLK, A.; EKSTRÖM. Total Antioxidant Potential of Fruit and Vegetables and Risk of Gastric Cancer. **Gastroenterology**, v.123: p. 985-991, 2002.
- SHIMIZU, T.; OGUCHI, S.; YAMASHIRO, Y. *et al.* *Helicobacter pylori* transmission between a boy with duodenal ulcer and his father. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 18: p. 655-656, 1999.
- SICINSCHI, L. A.; CORREA, P.; SCHNEIDER, G. Comparison of genotyping of *Helicobacter pylori* cagA and vacA virulence genes from gastric biopsies and stool specimens. **Helicobacter**, v. 8, n. 6: p. 601-607, 2003.
- SIPPONEN, P.; KOSUNEN, T. U.; VALLE, J.; RIIHELÄ, M.; SEPPÄLÄ, K. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis in gastric cancer. **J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 319-323, 1992.
- SIPPONEN, P.; HYVARINEN, H.; SEPPALA, K.; BLASER, M.J. Review article: Pathogenesis of the transformation from gastritis to malignancy. **Aliment Pharmacol Ther**, v.12(suppl 1): p.61-71, 1998.
- SUERBAUM, M. D. S.; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* Infection. Review Article. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n.15: p.1175-1186, Oct. 2002.
- SUGIYAMA, A.; MARUTA, F.; IKENO, T.; ISHIDA, K.; KAWASAKI, S.; KATSUYAMA, T.; SHIMIZU, N.; TATEMATSU, M. *Helicobacter pylori* infection enhances N-methyl-N-nitrosourea- induced stomach carcinogenesis in the *Mongolian gerbil*. **Cancer Res.**, v. 58: p. 2067-2069, 1998.
- SUTTON, P.; WILSON, J.; GENTA, R. *et al.* A genetic basis for atrophy: Dominant non-responsiveness and *Helicobacter*-induced gastritis in F<sup>1</sup> hybrid mice. **Gut**, v.45: p. 335-340, 1999.
- TALLEY, N. J.; ZINSMEISTER, A. R.; WEAVER, A.; DIMAGNO, E. P.; CARPENTER, H. A.; PEREZ-PEREZ, G. I.; BLASER, M. J. Gastric Adenocarcinoma and *Helicobacter pylori* infection. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 83: p. 1734-1739, 1991.

TAYLOR, D. F.; SIMONS, M.; CHANG, N. Differentiation of *Helicobacter pylori* isolates by pulsed-field gel electrophoresis of genome DNA. **Microbiol. Ecol. Health Dis.**, v. 4, special issue: p. S172, 1991.

TATEMATSU, M.; YAMAMOTO, M.; SHIMIZU, N.; YOSHIKAWA, A.; FUKAMI, H.; KAMINISHI, M. *et al.*: Induction of glandular stomach cancers in *Helicobacter pylori*-sensitive Mongolian gerbils treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in drinking water. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 89: p. 97-104, 1998.

TERRY, P.; NYREN, O.; YUEN, J. Protective effects of fruits and vegetables on stomach cancer in a cohort of Swedish twins. **Int. J. Cancer**, v.76: p. 35-37, 1998.

THILLAINAYAGAM, A. V.; ARVIND, A. S.; COOK, R. S. *et al.*: Diagnostic efficiency of an ultrarapid endoscopy room test for *Helicobacter pylori*. **Gut**, v. 32: p. 467-469, 1991.

TSUGANE, S.; KABUTO, M.; IMAI, H. *et al.*: *Helicobacter pylori*, dietary factors, and atrophic gastritis in five Japanese populations with different gastric cancer mortality. **Cancer Causes Control**, v. 4: p. 297-305, 1993.

TYTGAT, G. N. J. Treatments that impact favourably upon the eradication of *Helicobacter pylori* and ulcer recurrence. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 8: p. 359-368, 1994.

UEMURA, N.; OKAMOTO, S.; YAKAMOTO, S. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. **N. Engl. J. Med.** , v. 345: p. 784-789, 2001.

UMIT, V.; TEZEL, A.; BUKAVAZ, S.; UNSAL, G.; OTKUN, M.; SOYLU, A. R.; TUCER, D.; BILGI, S. The relationship between virulence factors of *Helicobacter pylori* and severity of gastritis in infected patients. **Dig. Dis. Sci.**, v. 54, n. 1: p. 103-110, 2008.

VAIRA, D.; HOLTON, J.; MENEGATTI, M. Invasive and non-invasive tests for *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol.**, v. 14 (supl. 3): p. 13-22, 2000.

VAN DOORN, L. J.; FIGUEIREDO, C.; SANNA, R.; PENA, S.; MIDOLO, P.; ATHERTON, J. C.; BLASER, M. J.; QUINT, W. G. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36: p. 2597-2603, 1998.



VAN DOORN, L. J.; FIGUEIREDO, C.; SANNA, R. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 116: p.823, 1999.

WANG, J.; VAN DOORN, L. J.; ROBINSON, P. A.; JI, X.; WANG, D.; WANG, Y.; GE, L.; TELFORD, J. L.; CRABTREE, J. E. Regional variation among *vacA* alleles of *Helicobacter pylori* in China. **J. Clin. Microb.**, v. 41, n. 5: p. 1942-1945, 2003.

WATANABE, Y.; OZAWA, K.; HIGASHI, A. *et al.*: *Helicobacter pylori* infection and atrophic gastritis: a case-control study in a rural town of Japan. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 25: p. 391-394, 1997.

YAMAOKA, Y.; KITA, M.; KODAMA, T.; SAWAI, N.; IMANISHI, J. *Helicobacter pylori* *cagA* gene expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. **Gastroenterology**, v. 110: p. 1744-1752, 1996.

YAMAOKA, Y.; KITA, M.; KODAMA, T.; SAWAI, N.; IMANISHI, J. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains. **Gut**, v. 41: p. 442-451, 1997.

YAMAOKA, Y.; KODAMA, T.; GUTIERREZ, O.; KIM, J. G.; KASHIMA, K.; GRAHAM, D. Y. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA* and *vacA* status and Clinical outcome: Studies in four different countries. **J. of Clin. Microb.**, v. 37, n. 7: p. 2274-2279, 1999.

ZANGHIERI, G.; DI GREGORIO, C.; SACCHETTI, C. *et al.* Familial occurrence of gastric cancer in the 2-year experience of a population-based registry. **Cancer**, v.66: p. 2047-2051, Nov.1990.

ZHENG, P. Y.; HUA, J.; YEOH, K. G.; HO, B. Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens but not *cagA*, *iceA*, and *vacA* in *Helicobacter pylori* isolates in an Asian population. **Gut**, v. 47, n. 1: p. 18-22, Jul. 2000.

## ANEXO A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título: Estudo das cepas *cagA* do *Helicobacter pylori* e sua correlação com as alterações encontradas na mucosa gástrica de pacientes dispépticos.

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

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

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

Procedimento: Serão realizadas biópsias da mucosa gástrica, por ocasião desse estudo, nos pacientes com sintomas dispépticos. Essa coleta nos permitirá identificar a presença ou não de *Helicobacter pylori*, bem como avaliar mais detalhadamente as alterações microscópicas, após análise complementar de um médico patologista.

Com relação à punção venosa para a colheita de sangue, pode haver dor local e ocasionar a formação de hematomas no local da punção. Risco de gravidade mínima para o paciente. A colheita de sangue será feita por profissionais devidamente treinados, o que certamente tende a minimizar o desconforto causado e evitar a formação de hematomas no local da punção.

Não há benefício direto, por tratar-se de estudo experimental, com a finalidade de testar a hipótese de que o *Helicobacter pylori* se relaciona com algumas patologias gástricas. Somente ao final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

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

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

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

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

Contato com o pesquisador: Dra Lucia Libanez B.C. Braga e Cícero Igor Simões Moura Silva, pode ser feito pelo telefone (085) 3366-8052. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, você poderá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC no número (085) 3366-8338.

Consentimento Livre e Esclarecido:

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento para que participe do estudo, até que eu decida o contrário. Receberei uma cópia assinada deste consentimento.

Assinatura do Paciente:

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

Assinatura da testemunha:

\_\_\_\_\_

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

Assinatura do responsável pelo estudo:

\_\_\_\_\_

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

## ANEXO B

## UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ-UFC

## Faculdade de Medicina

## Mestrado em Cirurgia

Projeto de Pesquisa – Questionário  
GRUPO DE ESTUDO

Estudo das cepas *cagA* do *Helicobacter pylori* e sua correlação com as alterações encontradas na mucosa gástrica de pacientes dispépticos.

FICHA N° : \_\_\_-\_\_\_-\_\_\_

DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Preenchido por : \_\_\_\_\_

## 1. IDENTIFICAÇÃO

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

1.2 Sexo: 1.  Masculino 2.  Feminino 1.3 Idade: \_\_\_ 1.4 Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

1.5 Naturalidade: \_\_\_\_\_

1.6 Procedência: \_\_\_\_\_

1.7. Endereço: \_\_\_\_\_

1.8 Fone contato: \_\_\_\_\_

1.9 Referência: \_\_\_\_\_

1.10 Cidade: \_\_\_\_\_ 1.11 Estado: \_\_\_\_\_

## 2. HISTÓRIA CLÍNICA

2.1) Queixa Principal: \_\_\_\_\_

2.2) Dor:  1. Queimação  2. Pontada  3. "Roendo"  4. Tipo "fome" 5. Outra \_\_\_\_\_2.3) Localização:  1. Epigástrica  2. Hipocôndrio direito  3. Costas 4. Outra \_\_\_\_\_2.4) Dor noturna:  1. Frequente  2. Rara  3. Nunca2.5) Relação com o estresse:  1. Sim  2. Não2.6) Alívio da dor:  1. Alimentação  2. Antiácidos  3. Antagonista H2 4. Inibidor bomba de prótons  5. Outros: \_\_\_\_\_2.7) Hematêmese:  1. Sim  2. Não 2.8) Melena:  1. Sim  2. Não2.9) Perda de peso?:  1. Sim  2. Não; Quantos quilos? \_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_2.10) Empachamento?:  1. Sim  2. Não 2.11) Azia?  1. Sim  2. Não2.12) Disfagia?  1. Sim  2. Não2.13) Endoscopia prévia?  1. Sim  2. Não Quantas? \_\_\_\_\_

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

2.14) História de úlcera na família?  1. Sim ; Qual o parentesco? \_\_\_\_\_ 2. Não2.15) Câncer gástrico na família?  1. Sim; Qual o parentesco? 1.1 Irmão(ã);  1.2 Tio/Tia ;  1.3 Pai;  1.4 Mãe ;  1.5 Avô/Avó;  1.6 Filho(a) ; 1.7 Pai e Mãe 2. Não

2.16) Câncer na família em outros sítios?  1.Sim Local: \_\_\_\_\_  
 2.Não

2.17) Uso freqüente de AINES (Anti-inflamatórios Não-Esteroidais)? :  
 1.Sim Qual? \_\_\_\_\_  2.Não

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

2.19) Fumante (atual)?  1.Sim  2.Não 2.20) Etilista?  1.Sim  2.Não

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

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

2.23) Uso freqüente de anti-secretores?  1.Sim  2. Não

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

### 3. CONDIÇÕES PSICO-SOCIAIS

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

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

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

3.5) Possui água encanada?  1.Sim  2.Não

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

3.7) Tipo de ingestão da água:  1. Sem tratamento  2. Filtrada  3. Fervida

4. Ozonizada  5. Mineral  6. Outros \_\_\_\_\_

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

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

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

3.10) Profissão: \_\_\_\_\_

3.11) Renda Mensal:  1. < 1 SM  2. 1 SM a 2 SM  3. 2 SM a 3 SM

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

### 4. HÁBITOS ALIMENTARES:

4.1) Ingestão freqüente de defumados?  1.Sim  2.Não

4.2) Ingestão freqüente de carnes secas/salgadas?  1.Sim  2.Não

4.3) Ingestão freqüente de farináceos?  1.Sim  2.Não

4.4) Ingestão freqüente de verduras/frutas cítricas?  1.Sim  2.Não

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

4.5.1) Geladeira/Freezer:  1.Sim  2.Não

4.5.2) "salga" e "seca" as carnes  1.Sim  2.Não

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

### 5. OBSERVAÇÕES:

---

Estudo das cepas *cagA* do *Helicobacter pylori* e sua correlação com as alterações encontradas na mucosa gástrica de pacientes dispépticos.

## ANEXO C

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ-UFC  
 Faculdade de Medicina  
 Mestrado em Cirurgia

Projeto de Pesquisa

Estudo das cepas *cagA* do *Helicobacter pylori* e sua correlação com as alterações encontradas na mucosa gástrica de pacientes dispépticos.

## Ficha de Endoscopia

Caso N°           

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: 1.    M 2.    F

Idade:        (em anos)

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

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

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

<b>5. Diagnóstico</b>	5.1. Normal	<input type="checkbox"/>
	5.2. Gastrite do antro	<input type="checkbox"/>
	5.3. Gastrite do Corpo	<input type="checkbox"/>
	5.4. Gastrite do antro e corpo	<input type="checkbox"/>
	5.5. Úlcera Gástrica	<input type="checkbox"/>
	5.6. Atrofia Antral	<input type="checkbox"/>
	5.7. Atrofia Corpal	<input type="checkbox"/>
	5.8. Atrofia Corpo e Antro	<input type="checkbox"/>
	5.9. Metaplasia Intestinal	<input type="checkbox"/>
	5.10. Outro(s): _____	

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

**7. Observações:**

---



---



---

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

## ANEXO D

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ-UFC  
 Faculdade de Medicina  
 Mestrado em Cirurgia

Projeto de Pesquisa

Estudo das cepas *cagA* do *Helicobacter pylori* e sua correlação com as alterações encontradas na mucosa gástrica de pacientes dispépticos.

## Ficha de Histopatologia

Caso nº

Prontuário nº           Patologista : \_\_\_\_\_

Nome : \_\_\_\_\_

Sexo:  ( *M ou F* )

Idade :   ( *em anos* )

**1- Por favor, anote para antro (A) e corpo (C) da seguinte maneira:**

**0: ausente - 1 : discreta - 2: moderada - 3: acentuada - 4: inadequada**

1.1 Inflamação	A <input type="checkbox"/>	C <input type="checkbox"/>
1.2 Atividade	A <input type="checkbox"/>	C <input type="checkbox"/>
1.3 Atrofia	A <input type="checkbox"/>	C <input type="checkbox"/>
1.4 Metaplasia Intestinal	A <input type="checkbox"/>	C <input type="checkbox"/>
1.5 Displasia*	A <input type="checkbox"/>	C <input type="checkbox"/>

\* No item 1.5 considerar apenas 0: ausente, 1: baixo grau, 3: alto grau e 4: amostra inadequada.

**2—Por favor, anote para antro (A) e corpo (C) da seguinte maneira:**

**0: ausente - 1: presente - 4: inadequada**

2.1 Foliculos Linfóides	A <input type="checkbox"/>	C <input type="checkbox"/>
2.2 Edema	A <input type="checkbox"/>	C <input type="checkbox"/>
2.3 Erosões	A <input type="checkbox"/>	C <input type="checkbox"/>
2.4 Atrofia degenerativa	A <input type="checkbox"/>	C <input type="checkbox"/>
2.5 Vacuolização citoplasmática	A <input type="checkbox"/>	C <input type="checkbox"/>
2.6 Diminuição de muco	A <input type="checkbox"/>	C <input type="checkbox"/>
2.7 Atipia regenerativa	A <input type="checkbox"/>	C <input type="checkbox"/>
2.8 Hiperplasia foveolar	A <input type="checkbox"/>	C <input type="checkbox"/>



**3- Por favor, anote para antro (A) e corpo (C) da seguinte maneira:**

**O: ausente – 1: raros – 2: número médio – 3: grande número – 4: inadequada**

3.1 *Helicobacter pylori*

A

C

**4- Diagnóstico anátomo-patológico** (não anote nestas casas: )

- |  |                          |
|--|--------------------------|
| 4.1 Normal   | <input type="checkbox"/> |
| 4.2 Gastrite Crônica do Antro                            | <input type="checkbox"/> |
| 4.3 Gastrite Crônica do Corpo                            | <input type="checkbox"/> |
| 4.4 Gastrite Crônica do Antro e Corpo (Pangastrite)      | <input type="checkbox"/> |
| 4.5 Gastrite Crônica com Atrofia do Antro                | <input type="checkbox"/> |
| 4.6 Gastrite Crônica com Atrofia do Corpo                | <input type="checkbox"/> |
| 4.7 Gastrite Crônica com Atrofia do Corpo e Antro        | <input type="checkbox"/> |
| 4.8 Gastrite Crônica com Metaplasia Intestinal           | <input type="checkbox"/> |
| 4.9 Gastrite Crônica com Atrofia e Metaplasia Intestinal | <input type="checkbox"/> |
| 4.10 Úlcera Gástrica                                     | <input type="checkbox"/> |
| 4.11 Displasia   | <input type="checkbox"/> |
| 4.12 Outro (s) _____                                     | <input type="checkbox"/> |
| 4.13 Amostra Inadequada                                  | <input type="checkbox"/> |

**5- Observações :**

---



---



---

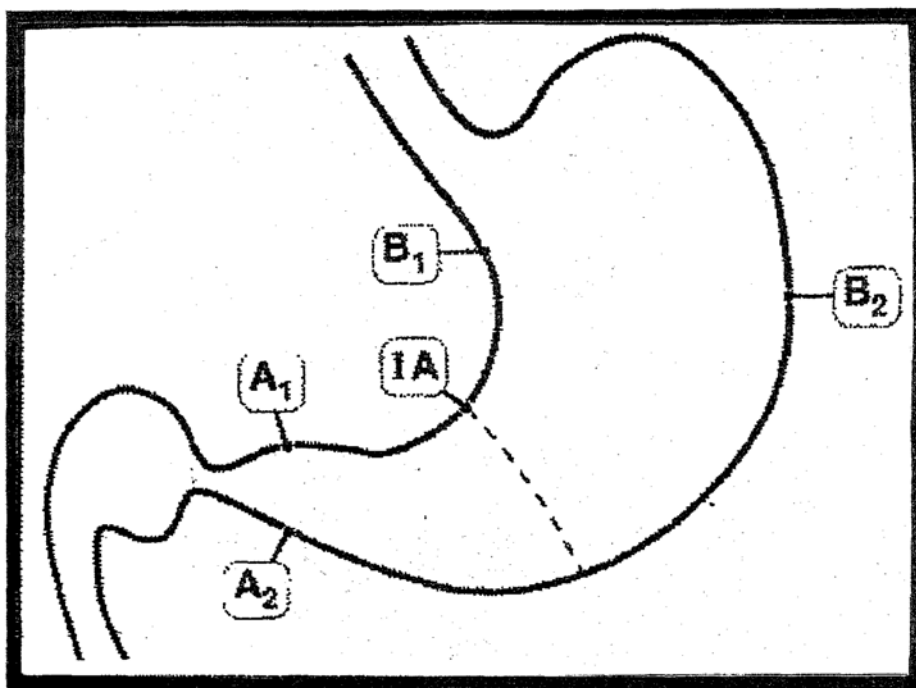
## ANEXO E

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ-UFC  
 Faculdade de Medicina  
 Mestrado em Cirurgia

Projeto de Pesquisa

Estudo das cepas *cagA* do *Helicobacter pylori* e sua correlação com as alterações encontradas na mucosa gástrica de pacientes dispépticos.

## MAPA DE BIÓPSIAS



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

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

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)