

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**

**A INFECCÃO PELO *Helicobacter pylori cagA* POSITIVO APRESENTA  
MAIOR EXPRESSÃO DE *IL-8* E *CCR-2***

**NATALIA MARIA JACOM WOOD DA SILVA**

**UBERABA**

**2018**

**NATALIA MARIA JACOM WOOD DA SILVA**

**A INFECÇÃO PELO *Helicobacter pylori* cagA POSITIVO APRESENTA  
MAIOR EXPRESSÃO DE *IL-8* E *CCR-2***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba-MG, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: **Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues**

Coorientador: **Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior**

**UBERABA**

**2018**

***ATESTADO DE APROVAÇÃO***

---



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

### ATESTADO DE APROVAÇÃO

Uberaba, 10 de dezembro de 2018.

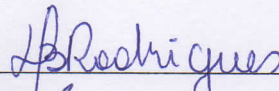
Defesa de tese e exame final de **NATÁLIA MARIA JACOM WOOD DA SILVA**, candidato (a) ao grau de Doutor (a) em Ciências – Patologia Básica e Experimental.

A Comissão Examinadora comunica à Coordenadoria do PGCS/UFTM, para os devidos fins, que procedeu, nesta data, ao exame da Tese de Doutorado “**A INFECÇÃO PELO *Helicobacter pylori* cagA POSITIVO APRESENTA MAIOR EXPRESSÃO DE IL-8 E CCR-2**” do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, bem como ao exame final.

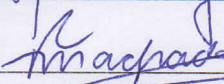
O (a) candidato (a) foi considerado (a) APROVADA.

A COMISSÃO:

Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

  
\_\_\_\_\_

Dra. Fernanda Machado Fonseca

  
\_\_\_\_\_

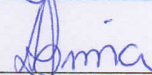
Dr. Geraldo Thedei

  
\_\_\_\_\_

Dra. Sheila Jorge Adad

  
\_\_\_\_\_

Dra. Sanívia Aparecida Lima Pereira

  
\_\_\_\_\_



## ***DEDICATÓRIA***

---

Dedico este trabalho...

... ao meu marido Emerson, amigo e companheiro e o maior incentivador no meu aperfeiçoamento profissional e acadêmico com muito amor e carinho;

... aos meus filhos Guilherme, Bruno e Larissa, verdadeira razão da minha vida;

... e aos meus pais Yolanda e Geraldo (*in memoriam*) e ao meu irmão Marcos que sempre me incentivaram nas minhas conquistas.

... à minha querida neta Maria Isabel que com apenas meses de vida já nos encanta como se já tivesse anos de convivência familiar.

## ***AGRADECIMENTOS***

---

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois me permitiu concluir mais uma etapa da minha vida.

À Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues, minha orientadora, que com paciência, disponibilidade, carinho e competência me ajudou a concluir este estudo.

Ao Prof. Dr. Virmondes Rodrigues, meu coorientador, que com a sua experiência e competência colaborou grandemente com a conclusão deste estudo.

Aos médicos do Serviço de Endoscopia Digestiva da Universidade Federal do Triângulo Mineiro que mostraram entusiasmo e dedicação na realização dos exames e na coleta de material dos pacientes.

À Profa. Dra. Renata Margarida Etchebehere pela imensa colaboração, amizade e incentivo colaborando com a realização dos exaustivos e detalhados exames anatomopatológicos dos pacientes para engrandecimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Adriana Gonçalves de Oliveira que abriu as portas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro permitindo assim aprofundar este estudo.

À Doutoranda Jacqueline Batista Sousa que com a sua educação, competência e paciência que me ajudou na realização dos exames de microbiologia.



Aos funcionários do Serviço de Endoscopia, do Laboratório de Imunologia e do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro que sem a participação deles não teria conseguido concluir este trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo e que não foram citados aqui.

Aos pacientes que aceitaram participar deste trabalho e com boa vontade nos forneceram dados preciosos.

***RESUMO***

---

## RESUMO

**Introdução:** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é um importante agente etiológico de várias doenças do trato digestivo superior como gastrite, úlcera péptica e câncer gástrico. A expressão de fatores de virulência pela bactéria, principalmente o gene *cagA* contribui para uma maior patogenicidade da bactéria na mucosa gástrica. **Objetivos:** estudar a mucosa do antro gástrico de pacientes infectados pelo *H. pylori* e comparar com a história clínica, antecedentes clínicos e cirúrgicos, doenças concomitantes, dados do exame de endoscopia digestiva alta, do exame anatomopatológico e analisar a expressão dos fatores de virulência *cagA*, sítios de fosforilação CagA EPIYA, *vacA*, *iceA1*, *iceA2* e *babA2*, e sua influência na expressão do *TLR-4*, *IL-8*, *CCL-2* e *CCR-2* nos indivíduos com gastrite ativa e *H. pylori* positivo. **Material e Métodos:** foram avaliados 126 pacientes submetidos ao exame de endoscopia digestiva alta (EDA) com queixas clínicas do trato digestivo superior. Para esta avaliação, antes do exame de EDA foi feito um questionário clínico e durante o exame endoscópico, realizaram-se biópsias múltiplas do esôfago, corpo e antro gástrico e teste rápido da urease. O material obtido foi encaminhado ao laboratório de patologia para exame anatomopatológico (EAP) e parte do material procedente do antro gástrico foi identificada a positividade do *H. pylori* através da expressão do gene 16S *rRNA*. Destes, 38 (30,1%) pacientes apresentaram *H. pylori* positivo, distribuídos da seguinte forma: 32 (84,2%) com gastrite ativa e 6 (15,8%) sem gastrite ativa. Foi pesquisado nessas amostras com *H. pylori* positivo a expressão de *cagA*, sítios de fosforilação CagA EPIYA, *vacAm1*, *vacAm2*, *vacAs1*, *vacAs2*, *iceA1*, *iceA2*, *babA2*, *TLR-4*, *IL-8*, *CCL-2* e *CCR-2*, por meio da PCR. **Resultados:** Não encontramos nenhum dado clínico que pudesse estar relacionado à presença da infecção do *H. pylori* no estômago. Os achados endoscópicos que tiveram relevância com a presença da bactéria foi a gastrite tanto no antro como no corpo gástrico ( $p < 0,05$ ). No exame anatomopatológico (EAP) os pacientes que usaram Inibidores de Bomba de Prótons (IBP) apresentaram uma diminuição da positividade da bactéria no antro e no corpo gástrico ( $p < 0,05$ ). A presença da gastrite no corpo gástrico ou antro gástrico teve significância com a positividade da bactéria ( $p < 0,05$ ). Na gastrite ativa do antro gástrico, em 20 (95,2%) amostras o gene *cagA* se expressou; o genótipo CagA EPIYA ABC foi o mais frequente e estando positivo em 11 (28,9%) amostras; 12 (31,6%) o *vacAm1*; 16 (42,1%) o *vacAm2*; 16 (42,1%) o *vacAs1* e 12 (31,6%) o *vacAs2*; 11 (28,9%) *iceA1* e em 17 (44,7%) o *iceA2* e o gene *babA2* em 4 (10,5%). Havendo prevalência significativa desses fatores na forma ativa da

doença. A expressão de *IL-8* foi maior nos indivíduos *cagA* positivo; enquanto que a expressão de *CCR-2* foi maior nos indivíduos *H. pylori* positivo. **Conclusões:** Infecção por *H. pylori* não mostrou nenhum fator clínico preditivo da sua presença. Na EDA destacou-se a presença da gastrite no antro como dado de provável infecção da bactéria. O uso de IBPs deverá ser suspenso por pelo menos duas semanas antes da EDA para evitarmos falsos negativos da presença do *H. pylori* no estômago. O EAP mostrou-se necessário para classificar as diferentes gastrites e/ou alterações histopatológicas provocadas pela bactéria. O estudo da presença do gene *cagA* e os sítios de fosforização CagA EPIYA são importantes, porém ainda estão aquém dos exames de rotina na prática diária. Indivíduos *H. pylori* e *cagA* positivos apresentam maior expressão de *IL-8* e *CCR-2* na mucosa do antro gástrico, sugerindo assim, que estas moléculas podem estar associadas a exacerbação da resposta imune e agravamento das lesões no antro gástrico.

**Palavras-chave:** *Helicobacter pylori*, gastrites, *cagA*, CagA EPIYA, *vacA*, *iceA baba2*, *TLR-4*, *IL-8*, *IL-8*, *CCL-2* e *CCR-2*.

***ABSTRACT***

---

## ABSTRACT

**Introduction:** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is an important etiologic agent of several diseases of the upper digestive tract such as gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. The expression of virulence factors by the bacterium, especially the *cagA* gene contributes to a greater pathogenicity of the bacterium in the gastric mucosa. **Objectives:** to study the gastric antrum mucosa of patients infected with *H. pylori* and to compare with the clinical history, clinical and surgical history, concomitant diseases, data from the examination of upper digestive endoscopy, anatomopathological examination and analyze the expression of virulence factors *cagA*, sites of phosphorylation CagA EPIYA, *vacA*, *iceA1*, *iceA2* e *babA 2*, and its influence on the expression of *TLR-4*, *IL-8*, *CCL-2* and *CCR-2* in individuals with active gastritis and *H. pylori* positive. **Material and Methods:** Were evaluated 126 patients submitted to the examination of upper digestive endoscopy (UDE) with clinical complaints of the upper digestive tract. For this evaluation, before the UDE examination, a clinical questionnaire was made and during the endoscopic examination, multiple biopsies of the esophagus, gastric body and antrum and rapid urease test were performed. The material obtained was sent to the pathology laboratory for anatomopathological examination (APE) and part of the material from the gastric antrum was identified the positivity of *H. pylori* through the expression of the 16S *rRNA* gene. Of these, 38 (30.1%) patients presented *H. pylori* positive, distributed as follows: 32 (84.2%) with active gastritis and 6 (15.8%) without active gastritis. It has been researched these samples with positive *H. pylori* the expression of *cagA*, the phosphorylation sites CagA EPIYA, *vacAm1*, *vacAm2*, *vacAs*, *vacAs2*, *iceA1*, *iceA2*, *bab2*, *TLR-4*, *IL-8*, *CCL-2* and *CCR-2*, by PCR. **Results:** We did not find any clinical data that could be related to the presence of *H. pylori* infection in the stomach. Endoscopic findings that have relevance to the presence of bacteria was gastritis in both antrum and in the gastric corpus ( $p < 0.05$ ). Patients who used Proton Pump Inhibitors (PPI) showed a decrease in the positivity of the bacteria in the antrum and in the gastric body ( $p < 0.05$ ). The presence of gastritis in the gastric body or gastric antrum had significance with the positivity of the bacterium ( $p < 0.05$ ). In active gastric antrum gastritis, in 20 (95.2%) samples the *cagA* gene was expressed; the genotype CagA EPIYA ABC was the most frequent and positive in 11 (28.9%) samples; 12 (31.6%) the *vacAm1*; 16 (42.1%) the *vacAm2*; 16 (42.1%) the *vacAs1* and 12 (31.6%) the *vacAs2*; 11

(28.9%) *iceA1* and 17 (44.7%) *iceA2* and the *babA2* gene in 4 (10.5%). There is a significant prevalence of these factors in the active form of the disease. *IL-8* expression was higher in *cagA* positive individuals; while *CCR-2* expression was higher in *H. pylori* positive individuals. **Conclusions:** *H. pylori* infection showed no clinical factor predictive of their presence. In the UDE, the presence of gastritis in the antrum was highlighted as a probable infection of the bacterium. The use of PPIs should be discontinued for at least two weeks prior to UDE to avoid false negatives of the presence of *H. pylori* in the stomach. The APE was necessary to classify the different gastritis and/or histopathological alterations caused by the bacterium. The study of the presence of the *cagA* gene and the CagA EPIYA phosphorylation sites are important, but it is still short of routine exams in daily practice. Individuals positive *H. pylori* and positive *cagA* present higher *IL-8* and *CCR-2* expression in the antral mucosa, thus suggesting that these molecules may be associated with exacerbation of the immune response and aggravation of lesions in the gastric antrum.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, gastritis, *cagA*, CagA EPIYA, *vacA*, *iceA*, *babA2*, *TLR-4*, *IL-8*, *CCR-2* and *CCR-2*.

## ***LISTA DE FIGURAS***

---



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>H. pylori</i> .....	30
Figura 2 – Arquitetura do gene <i>vacA</i> .....	33
Figura 3- <i>H. pylori</i> e seus fatores de virulência.....	35
Figura 4 - Sítios de fosforilação <i>CagA</i> EPIYA .....	36
Figura 5 – <i>H. pylori</i> : infecção e patogênese com os fatores de virulência .....	38
Figura 6 - Metodologia utilizada .....	48
Figura 7 – Esôfago normal .....	50
Figura 8- Esofagite erosiva grau B .....	51
Figura 9 - Estômago normal .....	52
Figura 10 - Gastrite erosiva antral .....	53
Figura 11 - Gastrite enantematosa de fundo gástrico .....	53
Figura 12 - Gastrite nodular.....	54
Figura 13 - Escala analógica visual proposta pela reunião de Houston de 1994.....	56
Figura 14 - Gastrite crônica sem atividade inflamatória: infiltrado linfoplasmocitário sem polimorfonucleares (HE - 400x).....	56
Figura 15- Gastrite crônica intensa; presença de folículo linfóide (HE - 40x).....	57
Figura 16 - Foco com atividade inflamatória: neutrófilos permeando .....	57
Figura 17 - Gastrite com atrofia glandular discreta substituída por metaplasia intestinal completa (células caliciformes e enterócitos absorventes) sem displasia (HE – 400x) .....	58
Figura 18 - Resultado do teste da urease .....	59
Figura 19 - Kit teste da urease - RNA laboratórios .....	60
Figura 20 - Numerosos bacilos compatíveis com <i>H. pylori</i> no interior de fovéolas (Warthin Starry – 1000x). Seta na cor vermelha .....	61
Figura 21 - Metodologia da eletroforese de amostras representativas dos diferentes sítios EPIYA da proteína <i>CagA</i> observados em pacientes <i>H. pylori</i> -positivos. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de bases; Colunas de 1 a 5: sítios EPIYA .....	64
Figura 22 - Frequência da densidade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico.....	78
Figura 23 - Sítios <i>CagA</i> EPIYA pesquisados no antro gástrico .....	91
Figura 24- Expressão de <i>mRNA</i> para <i>TLR-4</i> por positividade para 16S.....	95
Figura 25 - Expressão de <i>mRNA</i> para <i>TLR-4</i> por positividade para <i>cagA</i> .....	96
Figura 26 - Expressão de <i>mRNA</i> para <i>TLR-4</i> por positividade para <i>vacAm</i> .....	96
Figura 27 - Expressão de <i>mRNA</i> para <i>TLR-4</i> por positividade para <i>vacAs</i> .....	97
Figura 28 - Expressão de <i>mRNA</i> para <i>TLR-4</i> por positividade para <i>iceA</i> .....	97

Figura 29 - Expressão de mRNA para <i>TLR-4</i> por positividade para <i>babA2</i> .....	98
Figura 30 - Expressão de mRNA para <i>IL-8</i> por positividade para <i>cagA</i> .....	99
Figura 31 - Expressão de mRNA para <i>IL-8</i> por positividade para 16S .....	99
Figura 32 - Expressão de mRNA para <i>IL-8</i> por positividade para <i>vacAm</i> .....	100
Figura 33 - Expressão de mRNA para <i>IL-8</i> por positividade para <i>vacAs</i> .....	100
Figura 34 - Expressão de mRNA para <i>IL-8</i> por positividade para <i>iceA</i> .....	101
Figura 35 - Expressão de mRNA para <i>IL-8</i> por positividade para <i>babA2</i> .....	101
Figura 36 - Expressão de mRNA para <i>CCL-2</i> por positividade para 16S.....	102
Figura 37 - Expressão de mRNA para <i>CCL-2</i> por positividade para <i>CagA</i> .....	103
Figura 38 - Expressão de mRNA para <i>CCL-2</i> por positividade para <i>vacAm</i> .....	103
Figura 39 - Expressão de mRNA para <i>CCL-2</i> por positividade para <i>vacAs</i> .....	104
Figura 40 - Expressão de mRNA para <i>CCL-2</i> por positividade para <i>iceA</i> .....	104
Figura 41 - Expressão de mRNA para <i>CCL-2</i> por positividade para <i>babA2</i> .....	105
Figura 42 - Expressão de mRNA para <i>CCR-2</i> por positividade para 16S.....	106
Figura 43 - Expressão de mRNA para <i>CCR-2</i> por positividade para <i>cagA</i> .....	107
Figura 44 - Expressão de mRNA para <i>CCR-2</i> por positividade para <i>vacAm</i> .....	107
Figura 45 - Expressão de mRNA para <i>CCR-2</i> por positividade para <i>vacAs</i> .....	108
Figura 46 - Expressão de mRNA para <i>CCR-2</i> por positividade para <i>iceA</i> .....	108
Figura 47 - Expressão de mRNA para <i>CCR-2</i> por positividade para <i>babA2</i> .....	109

## ***LISTA DE TABELAS***

---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers e condições de amplificação da PCR para os fatores de virulência .....	65
Tabela 2 - Comparação de dados clínicos com a presença do <i>H. pylori</i> pesquisado .....	72
Tabela 3 – Usaram IBP e positividade do <i>H. pylori</i> no corpo gástrico .....	73
Tabela 4 – Usaram IBP e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico .....	74
Tabela 5 – Esofagite de refluxo (EDA) pela classificação de Los Angeles (LA) e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP .....	75
Tabela 6 – Corpo gástrico normal e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP .....	76
Tabela 7 – Gastrite de corpo gástrico e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP .....	76
Tabela 8 – Antro gástrico normal e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado...	77
Tabela 9 – Classificação da gastrite de antro gástrico e positividade do <i>H. pylori</i> no antro....	77
Tabela 10 - Comparação de positividade do teste da urease realizado no antro gástrico.....	78
Tabela 11 – Corpo gástrico normal (EAP) e a densidade do <i>H. pylori</i> no corpo.....	80
Tabela 12 - Gastrite ativa no corpo gástrico (Classificação no EAP) e a densidade do <i>H. pylori</i> no corpo gástrico pesquisado (EAP) .....	80
Tabela 13 - Gastrite crônica no corpo gástrico (Classificação no EAP) e a densidade do <i>H. pylori</i> no corpo gástrico pesquisado (EAP).....	81
Tabela 14 - Antro gástrico normal (EAP) e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico.....	82
Tabela 15 - Gastrite ativa no antro gástrico (Classificação no EAP) e densidade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP.....	83
Tabela 16 - Gastrite crônica no antro gástrico (Classificação no EAP) e densidade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP .....	84
Tabela 17 - Distribuição do CagA EPYIA nas amostras com o gene 16s <i>rRNA</i> positivo.....	85
Tabela 18 - Expressão do gene <i>vacAm</i> nas amostras com o gene 16S <i>rRNA</i> positivo .....	86
Tabela 19 - Expressão do gene <i>vacAs</i> nas amostras com o gene 16S <i>rRNA</i> positivo.....	86
Tabela 20 - Expressão do gen <i>iceA</i> nas amostras com o gene 16S <i>rRNA</i> positivo. ....	87
Tabela 21 - Expressão do gene <i>babA2</i> nas amostras com gene 16S <i>rRNA</i> positivo. ....	87
Tabela 22 - Distribuição das amostras com gastrite ativa e não ativa no antro.....	88
Tabela 23 - Distribuição das amostras com gastrite ativa e não ativa no antro gástrico em ....	89

Tabela 24 - Distribuição das amostras com gastrite ativa e não ativa no antro gástrico em ....	90
Tabela 25 - Distribuição das amostras com gastrite ativa e não ativa no antro gástrico em ....	92
Tabela 26 - Distribuição das amostras com gastrite ativa e não ativa no antro gástrico em relação ao gene <i>vacAs</i> e seus alelos <i>vacAs1</i> e <i>vacAs2</i> .....	93
Tabela 27 - Distribuição das amostras com gastrite ativa e não ativa no antro gástrico em relação ao gene <i>iceA</i> e suas variantes <i>iceA1</i> e <i>iceA2</i> .....	93
Tabela 28 - Distribuição das amostras com gastrite ativa e não ativa no antro gástrico em relação ao gene <i>babA2</i> .....	94

## ***LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS***

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala: Alanina

AGS: Linhagem de Células do Epitélio Gástrico

*babA*: fator de aderência *babA* (*blood group antigen binding adhesin*)

*babA2*: gene *babA2*

*cagA*: citotoxina associada ao gene *cagA* (*citotoxin antigen associated*)

*cagA*: gene *cagA*

CagA: citotoxin antigen associated

*cagPAI*: ilha de patogenicidade associada ao gene *cag*

COX-2: Ciclo-oxigenase-2

°C: graus Celsius

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CCL-2: Quimocitocina CCL

CCR-2: Receptor da Quimiocitocina CCL-2

CXCL9: Quimiocina CXCL9

CXCL11: Quimiocina CXCL11

EAP: Exame Anatopatológico

EDA: Endoscopia Digestiva Alta

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DRGE: Doença do Refluxo Gastroesofágico

EPIYA: Glutamine-Proline-Isoleucine-Tyrosine-Alanine (Glu-Pro-Ile-Tir-Ala)

ER: Esofagite de Refluxo

*et al*: e colaboradores

Glu: Ácido Glutâmico

GM-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

H<sup>+</sup>: Íon Hidrogênio (bomba de prótons)

*H. pylori: Helicobacter pylori*

IBP: Inibidor de Bomba de Prótons

*iceA: induced by contact with epithelium*

*iceA: gene iceA*

IL: Interleucina

*IL-8: Interleucina 8*

*IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 $\beta$*

Ile: Isoleucina

MALT: Tecidos Linfoides Associados às Mucosas (*Mucosa-associated lymphoid tissue*)

MD-2: Ligante Intracitoplasmático de *TLR-4*

MG: Minas Gerais

$\mu$ L: microlitro

$\mu$ m: micromêtro

mg: miligrama

mL: mililitro

*mRNA: Ácido Ribonucleico mensageiro*

*oipA: Outher Inflammatory protein gene*

pb: pares de bases

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pH: Potencial Hidrogeniônico

PAI: Ilha de Patogenicidade



Pro: Prolina

RNA: Ácido Ribonucleico

*rRNA*: Ácido Ribonucleico Ribossômico

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TRL-4: Receptor Tipo Toll 4

Tyr: Tirosina

U: Unidades

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

UNIUBE: Universidade de Uberaba

*vacA*: *vacuolating cytotoxin gene*

*vacAm*: alelo “m” do gene *vacA*

*vacAs*: alelo “s” do gene *vacA*

vias NF- $\kappa$ B: Fator Nuclear Kappa B

## ***SUMÁRIO***

---

## SUMÁRIO

RESUMO.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	29
1.1 Revisão da literatura .....	29
1.2 Fatores de Virulência envolvidos na Patogenicidade do <i>H. pylori</i> .....	32
1.2.1 <i>vacA</i> .....	33
1.2.2 <i>cagA</i> e <i>cagPAI</i> .....	34
1.2.3 Fatores de Aderência .....	37
1.2.3.1 <i>iceA</i> .....	37
1.2.3.2 <i>babA</i> .....	38
1.3 Expressão Gênica <i>TLR-4</i> , <i>IL-8</i> , <i>CCL-2</i> e <i>CCR-2</i> .....	39
2 HIPÓTESE .....	42
3 OBJETIVOS .....	44
3.1 Objetivo geral .....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Pacientes e amostras biológicas.....	46
4.2 Distribuição dos pacientes .....	47
4.3 Critérios de exclusão do estudo .....	49
4.4 Metodologia da Endoscopia Digestiva Alta (EDA) .....	49
4.5 Metodologia do Exame Anatomopatológico (EAP).....	55
4.6 Metodologia do diagnóstico da infecção pelo <i>H. pylori</i> .....	59
4.6.1 Teste rápido da urease .....	59
4.6.2 Pesquisa de <i>H. pylori</i> no EAP .....	60
4.6.3 Extração do DNA e Amplificação do gene 16S <i>rRNA</i> .....	62
4.7 Metodologia para a pesquisa dos fatores de virulência: genes <i>cagA</i> , <i>CagA</i> EPYIA, <i>vacA</i> ( <i>m e s</i> ), <i>iceA</i> , <i>babA2</i> .....	62
4.8 Metodologia da Expressão dos Genes <i>TLR-4</i> , <i>IL-8</i> , <i>CCL-2</i> e <i>CCR-2</i> .....	66

4.8.1	Extração de RNA.....	66
4.8.2	Confecção de cDNA.....	66
4.8.3	Reações de PCR em tempo real.....	67
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
6	RESULTADOS .....	71
6.1	Dados clínicos da amostra (N=126) .....	71
6.2	Dados clínicos da amostra em relação à positividade do <i>H. pylori</i> no antro e corpo gástrico pesquisado através do EAP (N=126) .....	71
6.3	Resultados da EDA em relação à positividade do <i>H. pylori</i> no antro e corpo gástrico pesquisado através do EAP (N=126).....	74
6.4	Resultados no EAP em relação à positividade do <i>H. pylori</i> no antro e corpo gástrico (N=126). .....	79
6.4.1	Esôfago (EAP).....	79
6.4.2	Corpo gástrico (EAP.....	79
6.4.3	Antro gástrico (EAP) .....	82
6.5	Análise dos fatores de virulência do <i>H. pylori</i> nas amostras com o gene 16S <i>rRNA</i> positivas no antro gástrico (N=38) .....	84
6.6	Distribuição dos genes 16S <i>rRNA</i> , <i>cagA</i> , Sítios de fosforilação CagA EPYIA, genes <i>vacM</i> , <i>vacS</i> , <i>iceA</i> e <i>babA2</i> no antro gástrico dos indivíduos com gastrite ativa e sem gastrite ativa classificada no EAP e 16S <i>rRNA</i> positivo (N=38).....	88
6.7	Expressão gênica do <i>TLR-4</i> , <i>IL-8</i> , <i>CCL-2</i> e <i>CCR-2</i> em relação à positividade para os genes 16S <i>mRNA</i> , <i>cagA</i> , <i>vacAm</i> , <i>vacAs</i> , <i>iceA</i> , e <i>babA2</i> no antro gástrico. ....	95
6.7.1	Expressão gênica do <i>TLR-4</i> em relação à positividade para os genes 16S <i>mRNA</i> , <i>cagA</i> , <i>vacAm</i> , <i>vacAs</i> , <i>iceA</i> , e <i>babA2</i> no antro gástrico.....	95
6.7.2	Expressão gênica da <i>IL-8</i> em relação à positividade para os genes 16S <i>mRNA</i> , <i>cagA</i> , <i>vacAm</i> , <i>vacAs</i> , <i>iceA</i> , e <i>babA2</i> no antro gástrico.....	98
6.7.3	Expressão gênica do <i>CCL-2</i> em relação à positividade para os genes 16S <i>mRNA</i> , <i>cagA</i> , <i>vacAm</i> , <i>vacAs</i> , <i>iceA</i> , e <i>babA2</i> no antro gástrico.....	102
6.7.4	Expressão gênica do <i>CCR-2</i> em relação à positividade para os genes 16S <i>mRNA</i> , <i>cagA</i> , <i>vacAm</i> , <i>vacAs</i> , <i>iceA</i> , e <i>babA2</i> no antro gástrico.....	105

7 DISCUSSÃO .....	111
8 CONCLUSÕES .....	118
9 REFERÊNCIAS .....	120
10 ANEXOS .....	130
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	130
Autorização.....	132
Questionário Médico para Pesquisa Clínica .....	133
Exame de Endoscopia Digestiva Alta .....	135
Exame Anatomopatológico .....	136
DADOS DO PARECER.....	138

## ***INTRODUÇÃO***

---

## 1 INTRODUÇÃO

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria gram-negativa, espiralada, altamente móvel, encontrada na superfície luminal do epitélio gástrico e foi isolada pela primeira vez em 1983 por Warren e Marshall (WARREN; MARSHALL, 1983).

A bactéria foi classificada inicialmente como pertencente ao gênero *Campylobacter*, que é composto por microrganismos gram-negativos em forma de bastão curvado, oxidase e catalase positivas, que se locomovem por meio de flagelos polares. Com isto, foram inicialmente chamados de “gastric *Campylobacter* like organism”, e posteriormente recebendo denominações de *Campylobacter pyloridis*, *Campylobacter pyloricus* e *Campylobacter pylori* (GOODWIN et al., 1985).

Estudos ultraestruturais e de análise da sequência de ácidos nucléicos realizados em 1989 fizeram com que a bactéria passasse a receber a denominação *Helicobacter* (forma helicoidal), diferenciando do gênero anteriormente enquadrado como *Campylobacter* (bastão curvado). A espécie, por ser mais encontrada na mucosa do antro gástrico, próxima ao piloro, ficou sendo chamada de *Helicobacter pylori* (GOODWIN, 1989).

### 1.1 Revisão da literatura

Provavelmente, o *H. pylori* é a infecção bacteriana crônica mais comum nos seres humanos e pode ser encontrada em quase metade da população mundial. A presença da bactéria na mucosa gástrica está associada com gastrite crônica ativa, e em doenças gástricas mais graves, incluindo a gastrite crônica atrófica (um dos precursores do carcinoma gástrico), úlcera péptica e linfoma gástrico de Tecidos Linfoides Associados às Mucosas (MALT) (COVER; BLASER, 1996).

A Organização Mundial de Saúde estabeleceu, em 1994, ser a bactéria um fator essencial na patogênese do carcinoma gástrico, isto é, agente carcinogênico tipo I (LI et al., 2016; UEMURA et al., 2001; WEN; MOSS, 2009).

A bactéria apresenta de 3 a 5µm de comprimento e de 0,5 a 1µm de largura. Usualmente tem um formato espiralado, porém pode aparecer como um bastão, enquanto que

raramente formas cocoides também podem surgir (KUSTERS; VAN VLIET; KUIPERS, 2006).

*H. pylori* apresenta de 2 a 6 flagelos unipolares de aproximadamente 3µm de comprimento, com um bulbo em seu final. Estas estruturas fazem com que ela tenha motilidade e movimentos rápidos em soluções viscosas como o muco que recobre as células epiteliais (O'TOOLE; LANE; PORWOLLIK, 2000). Figura 1

Figura 1 – *H. pylori*



Fonte: World Health Organisation (WHO)

A bactéria pode sobreviver em ambiente ácido do estômago particularmente devido a sua alta produção de urease, que converte a ureia presente no suco gástrico em amônia alcalina e dióxido de carbono (MARSHALL, B. J. et al., 1990).

*H. pylori* induz inflamação crônica da mucosa subjacente e a infecção é geralmente contraída nos primeiros anos de vida e tende a persistir indefinidamente, a menos que seja tratada (EVERHART, 2000).

A transmissão da bactéria pode ocorrer de diferentes formas: de pessoa para pessoa, oral-oral (ALLAKER et al., 2002), fecal-oral (GRUBEL et al., 1997) e gástrica-oral (NGUYEN, T. N.; BARKUN; FALLONE, 1999). A cavidade bucal pode ser importante no processo de transmissão da bactéria ou na reinfecção do estômago após ter sido realizado o tratamento de erradicação (DOWSETT; KOWOLIK, 2003).



A prevalência da infecção por *H. pylori* aumenta com a idade avançada e com um menor nível socioeconômico durante a infância, variando consideravelmente em torno do mundo (WOODWARD, M.; MORRISON, C.; MCCOLL, K., 2000). Uma vez sendo mais prevalente em grupos etários mais velhos faz pensar em piores condições de vida das crianças em décadas anteriores, e pelo menos 50% da população do mundo tem infecção pelo *H. pylori* (EVERHART, 2000; SHI et al., 2008). A prevalência da bactéria no Brasil, foi estimada em torno de quase 70%, aumentando com a idade, independe do sexo, e sendo mais baixa na população branca. Não foi observada relação entre infecção e cigarro, drogas e álcool. Uma relação positiva foi observada com o uso de água potável ou não, independente se atualmente ou durante a infância. Ausência de condições sanitárias em casa durante a infância mostrou uma maior taxa de infecção pela bactéria, assim como uma menor renda familiar e menor nível de escolaridade demonstraram uma positividade para a infecção. Uma maior associação também foi observada em ambientes com maior aglomeração. Em alguns países subdesenvolvidos a infecção pode chegar a 90%, sendo uma das infecções crônicas mais importante da espécie humana. Dentro de um mesmo país, a prevalência pode variar entre as populações urbanas de maior desenvolvimento e as populações rurais. (ZATERKA et al., 2007).

A gastrite é o processo básico que resulta da agressão do *H. pylori* no estômago com seus mecanismos imunológicos celulares e humorais. Obviamente a extensão e a distribuição desta gastrite é que determina o resultado clínico e com isto três fenótipos gástricos são identificados. O fenótipo mais comum é uma gastrite simples e benigna, caracterizada por uma pangastrite leve e com um mínimo de perturbação de secreção de ácido gástrico. Este fenótipo é comumente observado em indivíduos que são assintomáticos e que de um modo geral não desenvolvem doenças gastrintestinais severas. O segundo fenótipo é chamado como úlcero duodenal e é encontrado por até 15% dos indivíduos infectados, particularmente em países ocidentais onde estes tipos de úlceras são mais comuns. Neste fenótipo a gastrite tem um padrão antral e a produção de ácido clorídrico pelo corpo é mantida e sendo produzida em maior quantidade, pois o corpo gástrico é preservado. Uma maior quantidade de úlceras duodenais pode estar presente. O terceiro e mais grave fenótipo é o “fenótipo de câncer gástrico” caracterizado pela presença de gastrite predominante no corpo e atrofia gástrica multifocal com hipo ou acloridria. Estas anormalidades afetam 1% dos indivíduos infectados que desenvolvem inflamação crônica induzida pela infecção e assim aumenta o risco de câncer gástrico. Este fenótipo é mais prevalente em regiões da Ásia, onde este tipo de câncer é mais comum (AMIEVA; EL-OMAR, 2008; TSUKAMOTO et al., 2017)

A infecção pelo *H. pylori* é um cofator no desenvolvimento de três importantes doenças do trato gastrointestinal superior: úlceras duodenais e gástricas (reportada a desenvolver-se em torno de 1 a 10% dos pacientes infectados), câncer gástrico (em 0,1 a 3%) e linfoma tipo MALT (em <0,01%). O risco destas doenças em pacientes infectados varia amplamente entre as populações. Sabe-se também que, a grande maioria dos pacientes com infecção por *H. pylori* permanecerá assintomática e conseqüentemente não terá nenhuma complicação e nem manifestação clínica (MCCOLL, 2010).

Um grande número de estudos foi feito para avaliar a relação entre a infecção pelo *H. pylori* e Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE), porém esta ainda permanece indefinida (PANDOLFINO; HOWDEN; KAHRILAS, 2004).

Foram estabelecidas indicações para o diagnóstico e tratamento do *H. pylori* conforme enunciadas a seguir (CHEY; WONG; PRACTICE PARAMETERS COMMITTEE OF THE AMERICAN COLLEGE OF, 2007):

Estabelecidas:

- Doença ulcerosa péptica ativa (úlceras gástrica ou duodenal)
- História confirmada de doença ulcerosa péptica (não previamente tratados para *H. pylori*)
- Linfoma gástrico tipo MALT (baixo grau)
- Após ressecção endoscópica de câncer gástrico precoce
- Dispepsia não investigada (dependendo da prevalência de *H. pylori*)

Controversas:

- Dispepsia não ulcerosa
- DRGE
- Pessoas usando anti-inflamatórios não esteroides
- Anemia por deficiência de ferro inexplicada
- Populações com maior risco de câncer gástrico

## **1.2 Fatores de Virulência envolvidos na Patogenicidade do *H. pylori***

Muitos são os fatores de virulência envolvidos na patogenicidade do *H. pylori*, incluindo várias enzimas (urease, catalase, lipase, fosfolipase e protease) (RADOSZ-KOMONIEWSKA et al., 2005). A mais importante destas enzimas é a urease, que é essencial para a sobrevivência da bactéria em meio extremamente ácido, como a cavidade gástrica e

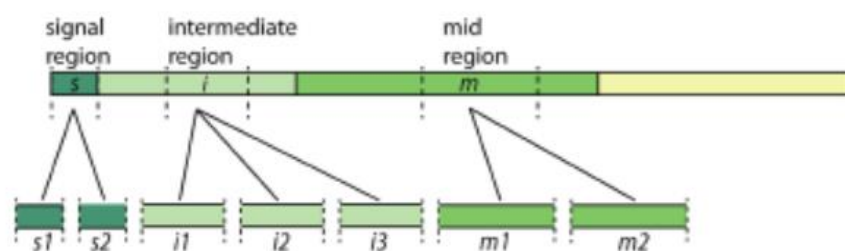
assim facilitando a colonização na mucosa gástrica. Como já citado, a urease catalisa a degradação da ureia em amônia e dióxido de carbono, o que torna o meio mais alcalino e assim, permitindo a sobrevivência do microrganismo (MCGEE; MOBLEY, 1999).

### 1.2.1 *vacA*

*H. pylori* produz a citotoxina vacuolizante (VacA-*vacuolating cytotoxin A*) e a citotoxina associada ao gene A (*CagA*) que são fatores de virulência e que têm muitos efeitos sobre a célula do epitélio gástrico (JONES; WHITMIRE; MERRELL, 2010)

A citotoxina vacuolizadora (VacA), que é codificada pelo gene *vacA*, está presente em todas as cepas de *H. pylori*. A atividade citotóxica de *vacA* varia de acordo com a sua estrutura genética. Algumas linhagens possuem a forma mais danosa e apresentam a variação *s* e *m* (MARSHALL, B., 2002; RADOSZ-KOMONIEWSKA et al., 2005). A região *s*, que codifica o peptídeo sinal, está localizada na extremidade da cadeia 5' e possui dois alelos, *s1* ou *s2*, sendo que para o alelo *s1* existem três subtipos: *s1a*, *s1b* e *s1c*. A região média (*m*) possui os alelos *m1* ou *m2*. A combinação em mosaico dos alelos da região *s* com os alelos da região *m* determina a produção da citotoxina, responsável pelo grau de virulência da bactéria. As cepas portadoras do genótipo *vacA s1m1* produzem grande quantidade de citotoxina, enquanto as cepas *s1m2* produzem quantidade moderada e as cepas *s2m2*, pouca ou nenhuma citotoxina. As cepas *vacA* do tipo *s1a* parecem ser mais patogênicas que as *s1b*, *s1c* ou *s2*, sendo mais relacionadas à úlcera péptica e câncer gástrico. As cepas do tipo *m1* estão associadas a maior risco de danos às células epiteliais do que as do tipo *m2* (ATHERTON et al., 1999; PALFRAMAN; KWOK; GABRIEL, 2012). Figura 2.

Figura 2 – Arquitetura do gene *vacA*



Fonte: PALFRAMAN et al, 2012

### 1.2.2 *cagA* e *cagPAI*

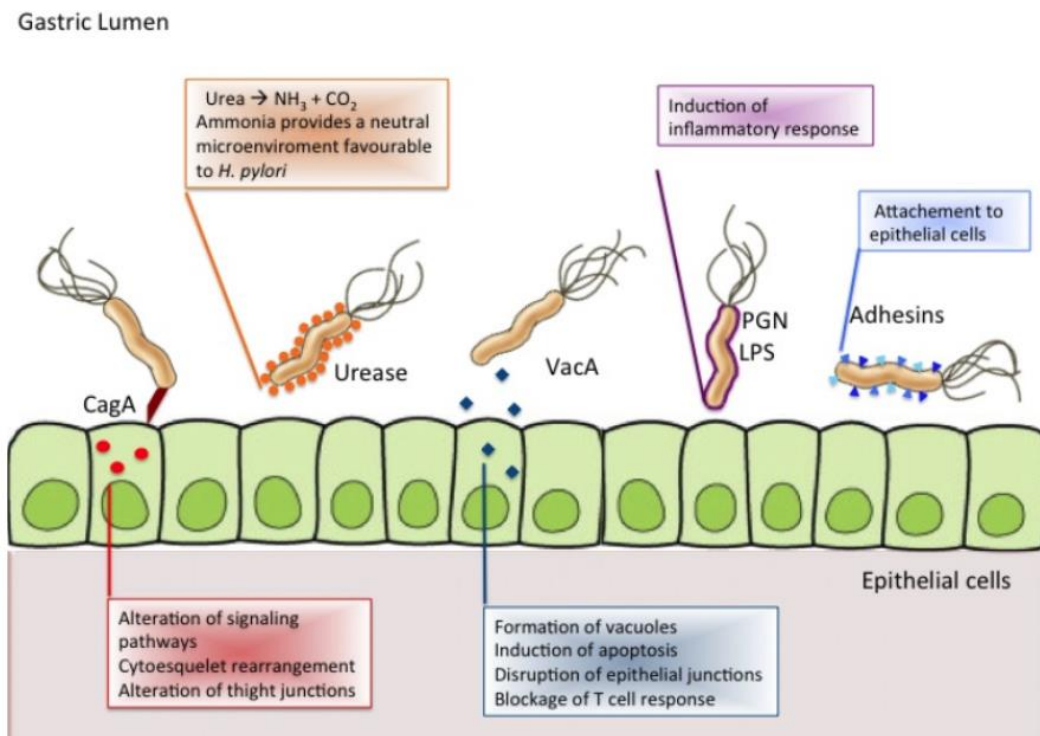
O gene *cagA* está associado à citotoxina CagA, que foi descrito em 1989 (COVER; DOOLEY; BLASER, 1990) e atualmente é considerado um importante marcador de cepas que conferem risco aumentado para doença péptica ulcerosa (CRABTREE et al., 1991) e carcinoma gástrico (SONG et al., 2013).

As cepas de *H. pylori cagA* positivas se associam a inflamação mais severa que a provocada pelas cepas *cagA* negativas (KHAMRI et al., 2010).

Nos países ocidentais aproximadamente 30 a 40% das cepas da bactéria não possuem este gene, enquanto nos países do leste asiático praticamente todas as cepas são *cagA* positivas (HATAKEYAMA, 2009). As infecções com as cepas *cagA* positivas têm sido associadas com graus mais elevados de inflamação da mucosa gástrica, daí parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento do câncer gástrico, tanto do tipo difuso quanto do intestinal (PARSONNET et al., 1997; WANG et al., 2007).

O gene *cagA* caracteriza a chamada “ilha de patogenicidade” PAI (CENSINI et al., 1996; YAMAOKA, 2012). Com isto, a presença da *cagPAI* (*cytotoxin associated gene pathogenicity island*) e de algumas citotoxinas são consideradas como os principais fatores de agressividade bacteriana. A presença do gene *cagA*, como descrito acima, é observada somente nas amostras mais virulentas do *H. pylori* (RADOSZ-KOMONIEWSKA et al., 2005).

A *cagPAI* contém aproximadamente 31 genes, incluído o *cagA*, e codifica um sistema de secreção bacteriano tipo IV (CENSINI et al., 1996) que por sua vez “injeta” a citotoxina CagA e, possivelmente, outras proteínas bacterianas nas células hospedeiras (ASAHI et al., 2000; KHAMRI et al., 2010; TEGTMEYER; WESSLER; BACKERT, 2011) Além do gene *cagA*, que é o fator de virulência mais estudado, outros genes que não fazem parte deste estudo, formam a ilha *cagPAI*: *cagE*, *cagG*, *virB11* e *virD4*. Já a proteína CagA translocada localiza-se então na parte interna da membrana plasmática, onde sofre fosforilação em resíduos de tirosina através de uma das enzimas da família quinase (HATAKEYAMA, 2009) (Figura 3).

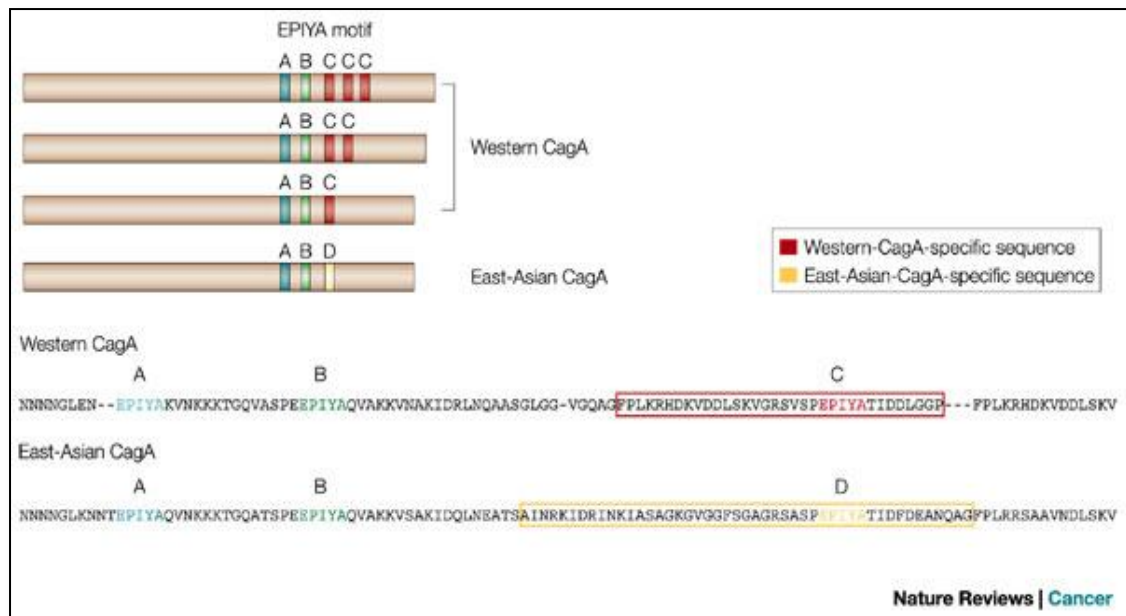
Figura 3- *H. pylori* e seus fatores de virulência

Fonte: MORALES-GUERRERO et al. 2013

As diferenças quanto ao potencial patogênico do gene *cagA* podem ser devido a variações na sua estrutura gênica. A estrutura do gene *cagA* apresenta uma região 5' altamente conservada, mas com uma região 3' com número variável de sequências repetitivas, sendo subtipado de acordo com seu tamanho. A proteína CagA possui uma sequência repetida de 5 aminoácidos (ácido glutâmico-prolina-isoleucina-tirosina-alanina), que constituem sítios de fosforilação na proteína CagA e assim denominados de EPIYA (NGUYEN, L. T. et al., 2009). Devido à frequente recombinação homóloga na região 3', como citado, do gene *cag*, a região de repetição da EPIYA-CagA é altamente divergente entre as espécies de *H. pylori* CagA positivas, com isto surgindo diferentes combinações e fazendo com que o domínio EPIYA seja dividido em quatro extensões com base na sequência de aminoácidos que compõe cada um deles. São assim denominadas: EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C e EPIYA-D. De acordo com a combinação destes domínios, as cepas produtoras de CagA foram divididas em dois grupos, sendo que as amostras de *H. pylori* presentes nos países ocidentais possuem os domínios EPIYA-A e EPIYA-B seguidos de uma a cinco repetições do EPIYA-C, e as amostras do Leste Asiático, apresentam os domínios EPIYA-A e EPIYA-B seguidos do EPIYA-D (HATAKEYAMA, 2006).

Pacientes infectados por amostras de *H. pylori cagA* positivos que possuem número aumentado do sítio EPIYA-C têm apresentado fenômenos celulares que predispõem à oncogênese gástrica (BATISTA et al., 2011; NAITO et al., 2006) (Figura 4).

Figura 4 - Sítios de fosforilação CagA EPIYA



Fonte: BATISTA et al., 2011

### 1.2.3 Fatores de Aderência

*H. pylori* possui um tropismo pela mucosa do estômago, aderindo à célula epitelial e, muitas vezes, penetrando entre elas, facilitando para que os produtos tóxicos produzidos pela bactéria sejam liberados nas proximidades da célula epitelial. Faz a estimulação da produção de citocinas pela célula epitelial, além de facilitar o acesso da bactéria aos nutrientes (MAEDA; MENTIS, 2007)

Os fatores de aderência constituem uma das características da bactéria que auxiliam no estabelecimento da colonização persistente no epitélio gástrico e contribuem para sua patogenicidade quando permitem o contato entre a bactéria e o epitélio e ainda facilitam a liberação de fatores de virulência como CagA e VacA. A bactéria mantém-se no estômago causando inflamação na mucosa gástrica com a interação direta com o hospedeiro, assim essa aderência é fundamental para o estabelecimento e manutenção da infecção (PRINZ et al., 2001).

#### 1.2.3.1 *iceA*

O gene *iceA* foi identificado por ser transcricionalmente super-regulado quando em contato com o epitélio e por essa razão denominado *iceA* (*induced by contact with epithelium gene*). O gene *iceA* possui dois alelos distintos: *iceA1* e *iceA2* com diferentes distribuições geográficas e manifestações clínicas. Em alguns locais do mundo o gene *iceA1* está mais relacionado a úlcera duodenal e o *iceA2* a câncer gástrico e em outros locais já acontece o contrário (CANER et al., 2007; GATTI et al., 2006).

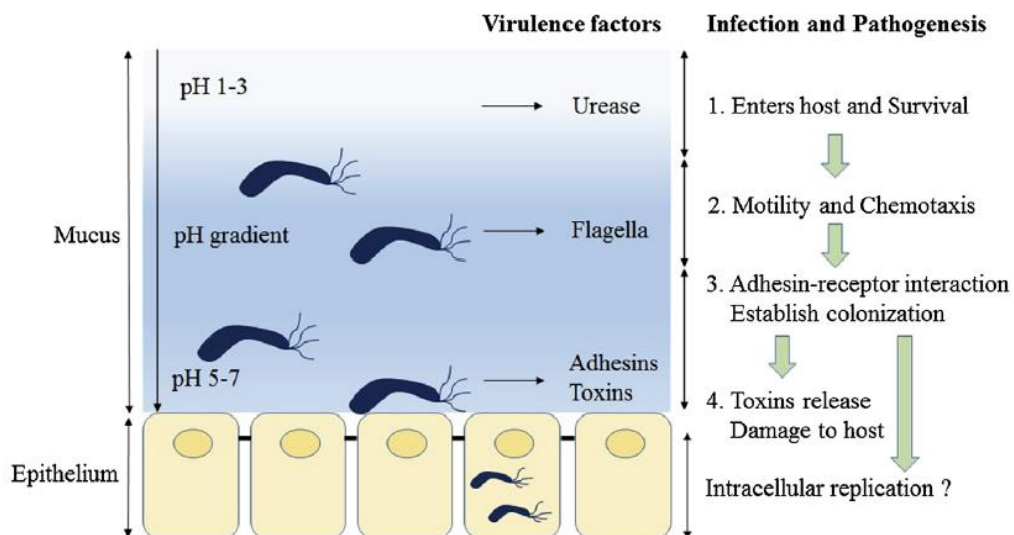
O gene *iceA* foi identificado no *H. pylori* isolado de pacientes com úlcera péptica e gastrite (YAKOOB et al., 2015) A expressão de *iceA1* foi identificada do contato entre *H. pylori* e células epiteliais humanas. O genótipo *iceA1* foi associado com maior expressão da *IL-8* na mucosa e inflamação antral aguda (GERHARD et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que a aderência a células epiteliais *in vitro* estimulam a sua transcrição. Vários estudos sugerem uma associação de uma variante do *iceA1* com úlcera péptica. Por outro lado, o *iceA2* não tem homologia com outros genes conhecidos e a função do *iceA2* permanece vaga apesar deste alelo, também estar associado com gastrite assintomática e dispepsia não ulcerativa (AMJAD; OSMAN; RAZAK; KASSIAN; DIN; ABDULLAH, 2010)

### 1.2.3.2 *babA*

O fator de aderência *babA* (*blood group antigen adhesin gene*), ligado ao grupo sanguíneo Lewis-b é um dos fatores de aderência mais estudados. Embora tenham sido identificados três alelos do gene *bab*: *bab A1*, *bab A2* e *bab B*, apenas o produto do alelo *babA2* é capaz de ligar-se ao antígeno Lewis-b. No ano de 1999, foi demonstrado uma associação entre o alelo *babA2* e a presença de úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico. Estudos posteriores confirmaram estas afirmações (GATTI et al., 2006; GERHARD et al., 1999; KAO; SHEU; WU, 2016).

Outros fatores de virulência têm sido estudados, porém ainda necessitando de mais estudos para ver a relação dos mesmos às evoluções clínicas (SUERBAUM; MICHETTI, 2002). São também investigados o gene *oipA* (HOCKER; HOHENBERGER, 2003) e outros (MAEDA; MENTIS, 2007). Figura 5.

Figura 5 – *H. pylori*: infecção e patogênese com os fatores de virulência



Fonte: KAO et al, 2016



### 1.3 Expressão Gênica *TLR-4*, *IL-8*, *CCL-2* e *CCR-2*

*H. pylori* é reconhecido pelo sistema imunológico inato através dos receptores *toll-like* (TLR) que identificam a sua estrutura molecular. O estímulo dos receptores TLR faz com que uma verdadeira cascata inflamatória seja desencadeada (BLASER; ATHERTON, 2004).

A presença do *H. pylori* no estômago dá início a uma resposta inflamatória inespecífica e daí levando a uma produção de citocinas e quimiocinas pelas células da mucosa gástrica. Estas células reconhecem a presença da bactéria e com isto respondem através dos receptores TLR, como já citado acima (SMITH et al., 2003). Os TLR são moléculas da superfície celular que participam do reconhecimento de padrões de moléculas de patógenos pelo sistema imune inato.

Como *H. pylori* raramente invade a mucosa gástrica, a resposta do hospedeiro é desencadeada inicialmente pela adesão da bactéria às células epiteliais da mucosa gástrica, causando inflamação com recrutamento inicialmente de neutrófilos, seguidos por linfócitos T e B, plasmócitos e macrófagos (SUERBAUM; MICHETTI, 2002)

Na infecção pelo *H. pylori*, o reconhecimento dos lipopolissacarídeos bacterianos pelos receptores *toll-like* 4 (*TLR-4*) da mucosa gástrica desencadeia a transdução de complexas vias de sinalização intracelular como a ativação da MAP Quinase (*Mitogen Activated Protein Kinases*), indução da fosfolipase C específica de fosfoinosítídeo, proteína quinase C e fosfatidilinositol 3-quinase, favorecem alterações na síntese dos mediadores pró-inflamatórias óxido nítrico e prostaglandina E2, e citocinas (MENG et al., 2015; SLOMIANY; SLOMIANY, 2017).

Estudos demonstram na infecção por *H. pylori* níveis elevados de IL-17 e bem como as transcrições de RNA da IL-17 na mucosa gástrica e células mononucleares da lâmina própria. Diante disto, a erradicação do *H. pylori* diminui a expressão da IL-17. A neutralização da IL-17 em culturas celulares que resultou em uma diminuição significativa da secreção de *IL-8*. Como as células da mucosa gástrica e células mononucleares da lâmina própria expressam receptores de IL-17, a IL-17 atua sobre essas células para liberar a *IL-8*. O aumento dos níveis de IL-17 e *IL-8* foram detectados em tecidos da mucosa antral procedentes de úlcera gástrica e em pacientes *H. pylori* positivos não ulcerosos. No local da úlcera, a IL-17 mostrou uma forte associação com o número de infiltração de células mononucleares e neutrófilos. A mucosa gástrica é um local bem ativo para a síntese de IL-17

e *IL-8* em pacientes infectados com *H. pylori* e com úlcera gástrica. A *IL-17* em conjunto com a *IL-8* parece estar envolvida na indução de úlcera gástrica, pois a *IL-8* contribui para o recrutamento de neutrófilos para o local da úlcera (MIZUNO et al., 2005).

Os lipopolissacarídeos da parede bacteriana também estimulam diferentes células (ex.: monócitos e polimorfonucleares) a secretarem um potente fator para quimiotaxia de neutrófilos, ativação de peptídeos, angiogênese na neoplasia gástrica. É a principal citocina sintetizada pelos linfócitos na resposta inflamatória contra *H. pylori* (FAZELI et al., 2016; ISHIHARA et al., 2004; PAPADAKOS et al., 2013).

A família de citocinas *IL-17* realiza numerosas funções de regulação imunológica relacionadas à resposta pró-inflamatória (KABIR, 2011). Já foi demonstrado que as células T podem produzir altos níveis tanto de *IL-17* em resposta a *H. pylori* desde tenra idade e que a *IL-1 $\beta$*  tem papel crucial na promoção de respostas Th17 (BHUIYAN et al., 2014). A *IL-17* induz a produção de peptídeos antimicrobianos (beta-defensina 2 e proteínas S100), citocinas (*IL-6*, estimulação de colônias de granulócitos), fator (G-CSF), fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF), quimiocinas (*CXCL1*, *CXCL-5*, *CXCL-8 (IL-8)*, *CXCL-10*, *CCL-2*, *CCL-20*) e metaloproteinases de matriz (*MMP1*, *MMP3* e *MMP13*). O aumento da produção de quimiocinas pode causar inflamação associada à infiltração de neutrófilos. Sabe-se que após infecção bacteriana, o eixo *IL-23/IL17* aumenta o recrutamento de neutrófilos no local da infecção (KABIR, 2011).

A proteína quimiotática de monócitos-1 (*CCL-2*), quimiocina responsável pelo recrutamento de mononucleares, e o C-C chemokine receptor-2 (*CCR-2*) também apresentam sua expressão elevada, já que ambos atuam no recrutamento e ativação de neutrófilos, células dendríticas e linfócitos na mucosa gástrica (FUTAGAMI et al., 2006; SEO et al., 2004; SUN et al., 2017).

***HIPÓTESE***

---

## **2 HIPÓTESE**

Pacientes com a infecção por *H. pylori* produzem uma resposta imune com um perfil pró-inflamatório mais intenso de acordo com o tipo da cepa bacteriana encontrada, de seus fatores de virulência e de citocinas e genes envolvidos

## ***OBJETIVOS***

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Estudar a presença de infecção por *H. pylori* na mucosa gástrica comparando a história clínica, antecedentes clínicos, doenças concomitantes, dados no exame de endoscopia digestiva alta (EDA), do exame anatomopatológico (EAP), microbiologia e resposta imune da bactéria.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Detectar a presença do *H. pylori* em pacientes com sintomas digestivos altos
- Identificar as alterações endoscópicas na mucosa gástrica de pacientes *H. pylori* positivos
- Avaliar as alterações histopatológicas da mucosa gástrica em biópsias do estômago de pacientes *H. pylori* positivos.
- Avaliar a presença do gene *cagA*, nas amostras da mucosa gástrica de pacientes *H. pylori* positivos
- Detectar presença dos diferentes genótipos que podem ocorrer na região variável 3' do gene *cagA* (que contém as sequências EPIYA) nas amostras de *H. pylori cagA* positivas
- Detectar presença dos diferentes genótipos que acompanham o gene *vacA* (*m* e *s*) e seus subtipos (*1* e *2*).
- Detectar presença do gene *iceA* e seus alelos *iceA1* e *iceA2*.
- Detectar presença do gene *babA2*
- Estudar a expressão gênica do *TLR-4*, *IL-8*, *CCL-2* e *CCR-2* em relação à positividade para os genes 16S *rRNA*, *cagA*, *vacAm*, *vacAs*, *iceA1* e *iceA2* e *babA2*

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade de Uberaba (UNIUBE) sob o parecer número 350.874 de 06/08/2013 e com a anuência da Diretoria de Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

### 4.1 Pacientes e amostras biológicas

Foram selecionados 126 pacientes que apresentavam sintomas do trato digestivo superior e com indicação clínica de exame de EDA, no período de agosto de 2013 a novembro de 2013.

Os pacientes foram distribuídos de forma aleatória independente de já terem sido ou não tratados anteriormente de doença digestiva alta. Os pacientes que estavam usando medicamentos que poderiam interferir na positividade da pesquisa da bactéria como Inibidores de bomba de prótons (IBP), bloqueadores da histamina (bloqueadores H<sub>2</sub>), antibióticos, e corticosteroides, foram orientados a suspender a medicação com pelo menos duas a quatro semanas de antecedência à realização do exame de EDA na dependência do tipo de medicação que estava usando.

Não foram levados em consideração o sexo, a idade, a cor, a profissão, a raça e o peso para a escolha dos pacientes para a realização da EDA.

Só fizeram parte do presente estudo os pacientes que concordaram em participar do mesmo, lendo e assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os pacientes estudados foram recrutados no Ambulatório Maria da Glória na UFTM e na clínica particular do Dr. Emerson A. Wood da Silva, situada em Uberaba-MG.

Antes de serem submetidos ao exame de EDA, os pacientes responderam a um questionário clínico detalhado ao pesquisador responsável. O motivo deste questionário se deveu ao fato de correlacionar sintomatologia, antecedentes clínicos e cirúrgicos e doenças concomitantes com a presença da infecção pelo *H. pylori* e assim obter algum preditivo clínico desta infecção.



Os pacientes que realizaram EDA na UFTM tiveram os fragmentos de biópsias encaminhados para o Laboratório de Patologia da UFTM e uma outra parte deste material coletado foi levado para o Laboratório de Imunologia/Microbiologia da UFTM.

Já os pacientes procedentes da clínica particular do Dr. Emerson A. Wood da Silva, que concordaram em participar o presente estudo, foram encaminhados para exame de EDA a ser realizada com médico participante desta pesquisa clínica. As biópsias obtidas durante a EDA, foram encaminhadas para estudo em Laboratórios de Anatomia Patológica também participantes do trabalho em questão. Como nos pacientes anteriormente citados, outra parte do material coletado foi encaminhada ao Laboratório de Imunologia/Microbiologia da UFTM.

A seleção dos casos ocorreu a partir da análise de planilha eletrônica montada no Software Excel® (Microsoft Corporation®, USA). Esta planilha foi constituída de informações inseridas conforme questionário feito pelos pesquisadores responsáveis.

A confidencialidade das informações dos pacientes foi garantida pela codificação alfa numérica da identificação do paciente em planilha eletrônica e com direito de saída.

#### **4.2 Distribuição dos pacientes**

Participaram do presente estudo um total de 126 pacientes com sintomas do trato digestivo superior e que foram submetidos ao exame de EDA.

Durante o exame de EDA, todos os pacientes foram submetidos a biópsias da mucosa distal do esôfago, do corpo e do antro gástrico, conforme padronização na literatura e estabelecida pela Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva Alta (SOBED).

O número de biópsias ficou na dependência das alterações encontradas durante o exame de endoscopia, porém não menos que quatro fragmentos de cada local (esôfago distal, corpo e antro gástrico).

Fragmentos procedentes das biópsias do terço distal do esôfago, corpo e antro gástrico foram colocados separadamente em frascos com formol tamponado a 4% para a realização do exame anatomopatológico comum de rotina.

Um fragmento a mais da mucosa do antro gástrico foi retirado para execução da pesquisa do *H. pylori* pelo teste rápido da urease imediatamente após o exame de EDA.

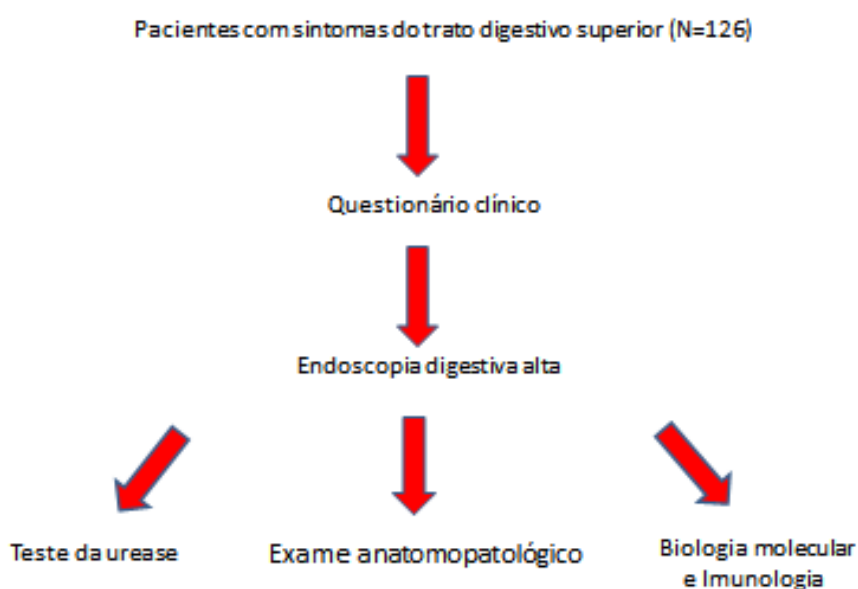
Os 126 pacientes foram distribuídos em grupos diferentes na dependência da positividade do *H. pylori* no corpo e no antro gástrico e assim comparados com o grupo que não apresentou a positividade para a bactéria através dos seguintes meios diagnósticos realizados: teste rápido da urease no antro gástrico, exame anatomopatológico para investigar a presença do *H. pylori* no corpo e no antro gástrico e a extração do DNA da bactéria com amplificação do gene 16S *rRNA* no antro gástrico.

Estudos de biologia molecular foram feitos nos fragmentos do antro gástrico para realizar a amplificação do gene *cagA* e da região 3' variável do gene *cagA*, estudo dos sítios de fosforilação *CagA* EPIYA, *vacA* (*m* e *s*), *iceA* (1 e 2) e *babA2*.

Ainda no antro foi realizado estudo imunológico para a expressão gênica do *TLR-4*, *CCL-2* e *CCR-2*.

Para os estudos da biologia molecular e imunologia, no momento do exame de EDA fragmentos do antro gástrico foram colocados, a fresco, em frasco contendo *RNAlater*® (Life Technologies Corporation®, USA) para conservação e congelamento. Figura 6.

Figura 6 - Metodologia utilizada



### **4.3 Critérios de exclusão do estudo**

Foram excluídos deste estudo os pacientes com:

- 1) Não concordância em participar
- 2) Cirurgia prévia do trato digestivo superior
- 3) Grávidas
- 4) Pacientes com presença de comorbidades graves como neoplasias, doenças do colágeno e distúrbios de coagulação.
- 5) Pacientes fazendo uso de antibióticos, anti-inflamatórios, corticosteroides e/ou outros medicamentos que o médico pesquisador no momento do questionário clínico achou oportuno a exclusão do estudo em questão.
- 6) Pacientes que no momento do exame de endoscopia, a critério do médico pesquisador, não apresentavam condições físicas ou mentais de participação do estudo.

### **4.4 Metodologia da Endoscopia Digestiva Alta (EDA)**

Os exames endoscópicos foram realizados segundo a técnica convencional com aparelhos videoendoscópios (Olympus® GIF Q150, Tóquio, Japão) por médicos experientes e seguindo uma sistemática preconizada pela SOBED e com padronização dos diagnósticos e locais das biópsias.

Os pacientes se apresentavam em jejum de doze horas. Inicialmente recebiam anestesia tópica da orofaringe com aplicações de *spray* de xilocaína a 10% e administrada solução IV, contendo midazolam (de 2,5 a 5,0mg) e meperidina (de 30 a 50mg), para fins de sedação.

Os possíveis diagnósticos endoscópicos adotados foram: esôfago normal, esofagite erosiva, úlcera esofágica, hérnia do hiato esofágico, esôfago de Barrett, hiato esofágico alargado, estômago normal, gastrite erosiva, gastrite enantematosa, úlcera gástrica (ativa ou cicatrizada), duodenite, úlcera duodenal (ativa ou cicatrizada), duodeno normal. Na parte de anexos encontra-se o protocolo do exame endoscópico usado no estudo.

O esôfago foi considerado normal à endoscopia quando, além de ausentes as alterações descritas acima, seu revestimento mucoso mostrava-se liso, de coloração róseo-nacarada, com fina trama vascular em paliçada passível de ser distinguida por transparência (MALUF FILHO et al.,1999) (Figura 7)

Figura 7 – Esôfago normal



Fonte: arquivo pessoal

A esofagite erosiva de refluxo foi considerada como o aspecto anormal da mucosa esofágica com soluções de continuidade superficiais (erosões) de forma arredondada ou linear, desnudadas ou revestidas de exsudato de fibrina, ou ainda semelhantes a aftas, isoladas ou confluentes. Consideraram-se ulcerações esofágicas as soluções de continuidade mais profundas da mucosa. Para a classificação da gravidade endoscópica da esofagite de refluxo utilizou-se aquela proposta pela Classificação de Los Angeles:

GRAU A: uma (ou mais) solução de continuidade da mucosa confinada às pregas mucosas, não maiores que 5mm cada;

GRAU B: pelo menos uma solução de continuidade da mucosa com mais de 5mm de comprimento, confinada às pregas mucosas e não contíguas entre o topo de duas pregas (Figura 8);

Figura 8- Esofagite erosiva grau B



Fonte: arquivo pessoal

GRAU C: pelo menos uma solução de continuidade da mucosa contígua entre o topo de duas (ou mais) pregas mucosas, mas não circunferencial (ocupa menos que 75% da circunferência do esôfago);

GRAU D: uma ou mais solução de continuidade da mucosa circunferencial (ocupa no mínimo 75% da circunferência do esôfago).

Obs.: As complicações (estenose, Barrett) são apresentadas à parte e podem ou não ser acompanhadas pelos vários graus de esofagite.

O estômago foi considerado normal, quando apresentava coloração uniformemente rósea, com superfície lisa e íntegra e pregas gástricas tortuosas e de distribuição regular no corpo gástrico, as quais desaparecem no antro (Figura 9).

Figura 9 - Estômago normal



Fonte: arquivo pessoal

Gastrite erosiva foi caracterizada por erosões, rupturas superficiais da mucosa gástrica representadas como lesões planas ou levemente deprimidas, esbranquiçadas, com halo avermelhado, tipo aftas; ou como pápulas avermelhadas com depressão central; ou ainda como pontos avermelhados lembrando petéquias, podendo ter exsudato esbranquiçado aderido ou friabilidade ao toque do endoscópio ou da pinça de biopsia (Figura 10).

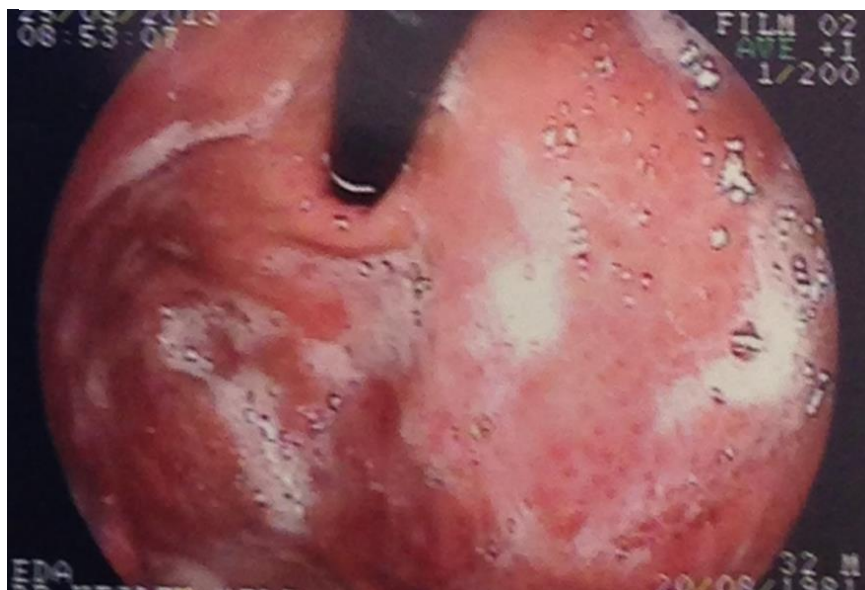
Figura 10 - Gastrite erosiva antral



Fonte: arquivo pessoal

Gastrite enantematosa foi caracterizada por vermelhidão da mucosa sem erosão, podendo ser focal ou comprometer áreas extensas da mucosa gástrica (Figura 11).

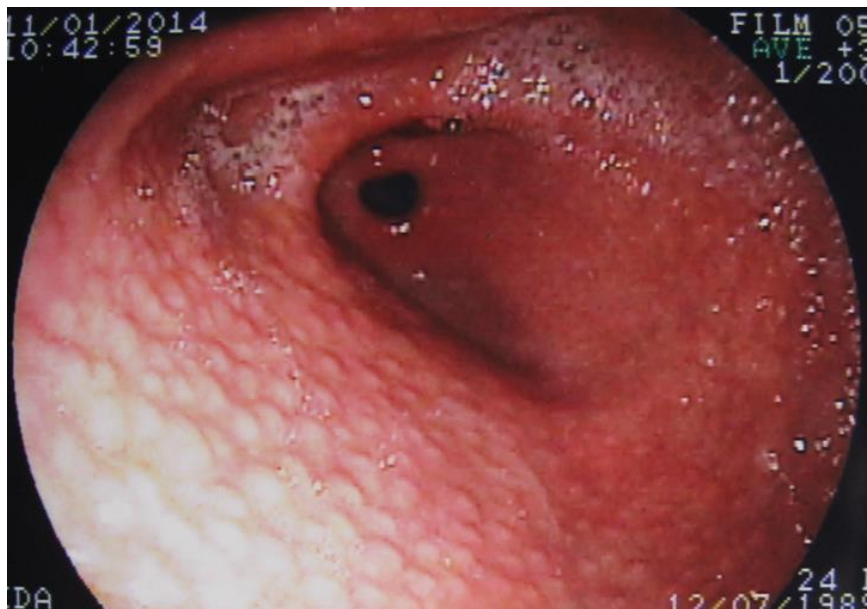
Figura 11 - Gastrite enantematosa de fundo gástrico



Fonte: arquivo pessoal

Gastrite nodular foi considerada quando nodulações surgem na mucosa do estômago, e este tipo de gastrite na maioria das vezes está relacionado com a presença de infecção pelo *H. pylori* (Figura 12).

Figura 12 - Gastrite nodular



Fonte: arquivo pessoal

Considerou-se úlcera ativa a quebra da integridade da mucosa em área circunscrita, em geral arredondada ou ovalada ou, ainda, fusiforme ou em forma de estrela, mais profunda que as erosões, atingindo a camada muscular da mucosa. Úlcera cicatrizada foi caracterizada pela presença de cicatriz linear branca ou vermelha na mucosa.

O duodeno foi considerado normal quando não apresentava deformidade no bulbo e a superfície da mucosa era lisa, íntegra, de coloração rósea. Duodenite erosiva e úlcera duodenal foram consideradas as alterações da mucosa duodenal semelhantes às descritas para a gastrite erosiva e para a úlcera gástrica.



#### 4.5 Metodologia do Exame Anatomopatológico (EAP)

Após a coleta por biópsia, os fragmentos esofágicos e gástricos foram colocados em formol tamponado a 4% e enviados ao Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas da UFTM ou para outros laboratórios participantes do trabalho para serem processados. Os médicos patologistas participantes sempre foram os mesmos.

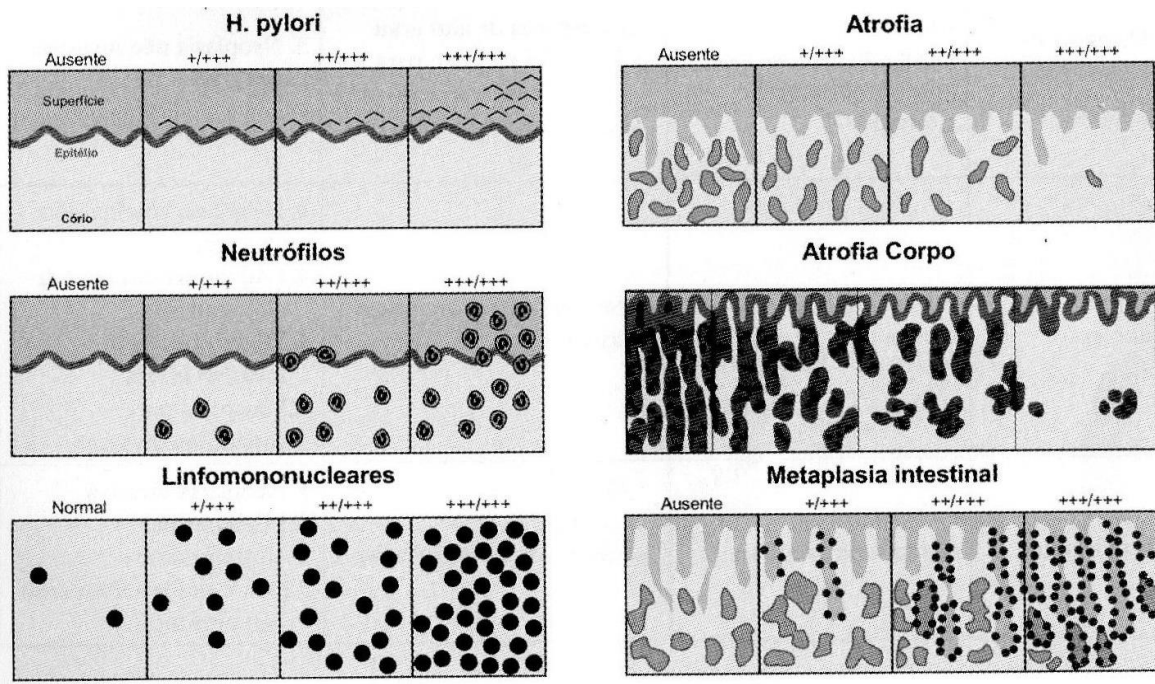
Os fragmentos fixados em formol foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e a seguir incluídos em parafina. Cortes histológicos de 5µm de espessura foram obtidos e corados pela técnica de hematoxilina-eosina para estudo histopatológico.

Os achados histopatológicos na mucosa gástrica foram analisados de acordo com os seguintes parâmetros já padronizados:

- a) Exocitose de eosinófilos no epitélio escamoso;
- b) Exocitose de neutrófilos no epitélio escamoso;
- c) Aumento de mononucleares intra-epiteliais (acima de 10 células mononucleares/campo de grande aumento – objetiva de 40x) e espongirose (edema intercelular);
- d) Hiperplasia da camada basal (mais de 15% da espessura do epitélio);
- e) Superficialização de alças capilares (projeção no terço superior do epitélio, ou seja, alongamento de papilas);
- f) Epitélio colunar com metaplasia intestinal.

Cortes histológicos das biópsias gástricas também foram corados pela técnica Warthin Starry, para facilitar a pesquisa de *H. pylori*, além dos cortes corados pelo método de hematoxilina-eosina (DIXON et al., 1996).

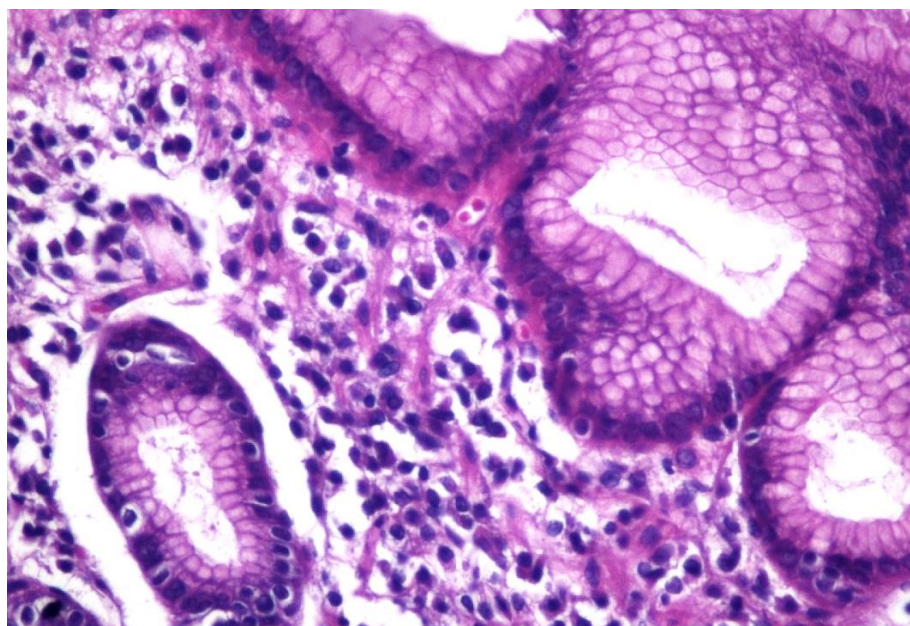
Os achados histológicos da mucosa gástrica foram interpretados de acordo com a classificação de Sidney, com as modificações/graduação propostas pela reunião de Houston (DIXON et al., 1996), utilizando-se a escala analógica visual do referido artigo, que também é recomendada pelo Manual de Padronização de Laudos Histopatológicos da Sociedade Brasileira de Patologia (BACCHI et al., 2005), conforme ilustrada na figura 13 e descritos a seguir:



a) Ausência de gastrite - nenhuma alteração do epitélio superficial ou glandular, com raros mononucleares na lâmina própria (grau 0);

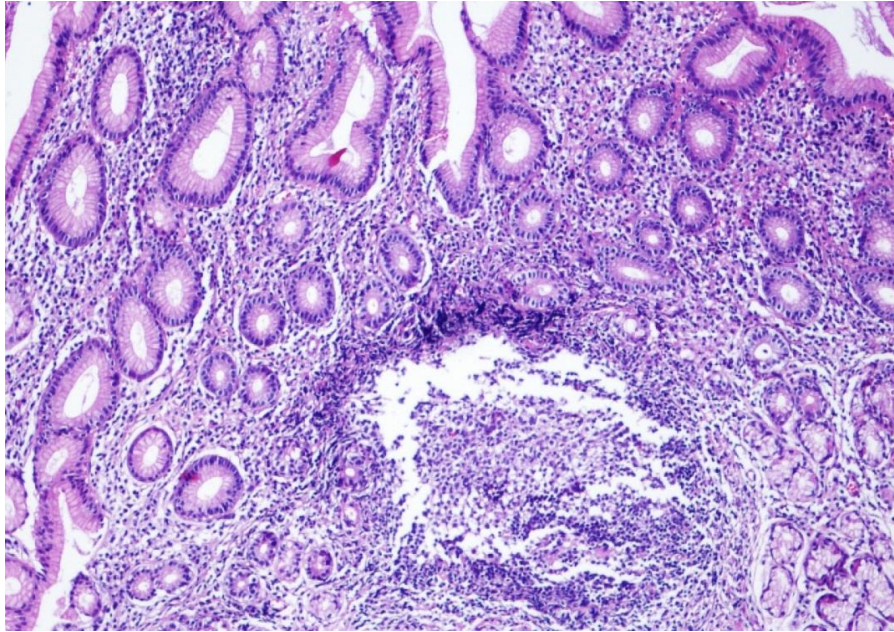
b) Intensidade da gastrite com base na análise semi-quantitativa de mononucleares na lâmina própria e/ou no epitélio superficial ou glandular, graduada em leve (grau I), moderada (grau II) ou intensa (grau III); (Figura 14)

Figura 14 - Gastrite crônica sem atividade inflamatória: infiltrado linfoplasmocitário sem polimorfonucleares (HE - 400x)



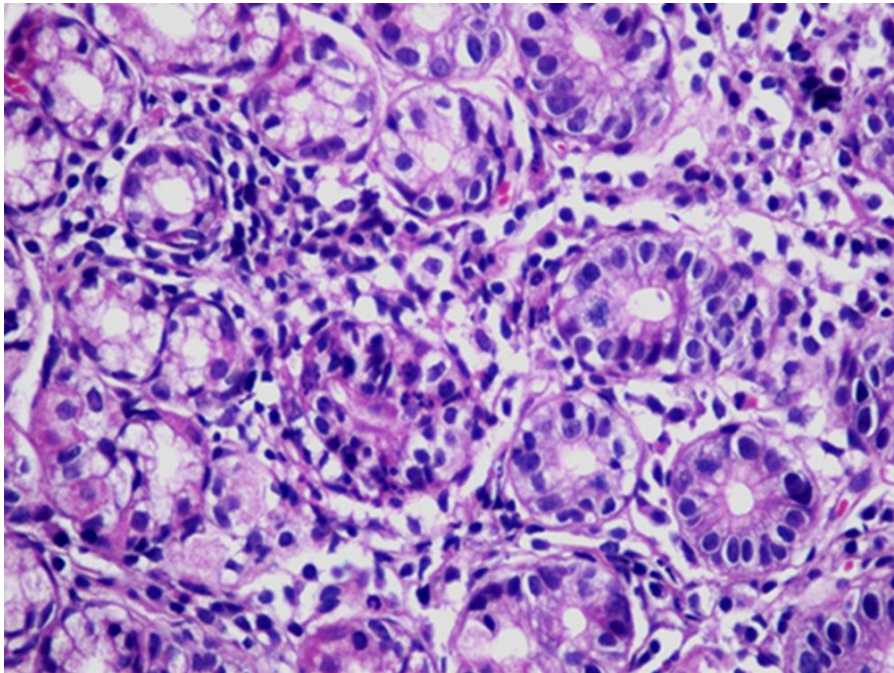
c) Intensidade da atividade inflamatória com base na presença de polimorfonucleares na lâmina própria e/ou no epitélio superficial ou glandular, graduada em leve (grau I), moderada (grau II) ou intensa (grau III) (Figuras 15 e 16);

Figura 15- Gastrite crônica intensa; presença de folículo linfóide (HE - 40x)



Fonte: Laboratório de Patologia - UFTM

Figura 16 - Foco com atividade inflamatória: neutrófilos permeando o epitélio foveolar (HE - 400x)

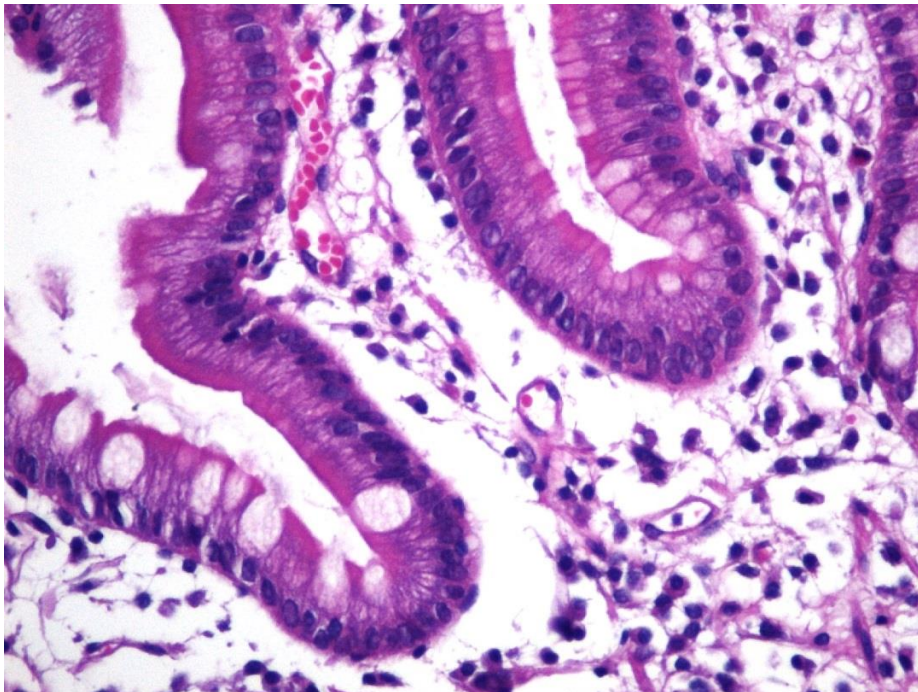


Fonte: Laboratório de Patologia - UFTM

d) Presença de atrofia gástrica de acordo com a diminuição do número de corpos glandulares, graduada em leve (grau I), moderada (grau II), intensa (grau III);

e) Presença de metaplasia intestinal (Figura 17) de acordo com a presença de epitélio com características morfológicas do epitélio intestinal, classificada em completa (tipo I) ou incompleta (tipos II ou III), de acordo com a presença ou não de enterócitos absorventes e, a seguir graduada, segundo a extensão em graus I, II ou III (DIXON et al, 1996).

Figura 17 - Gastrite com atrofia glandular discreta (grau I ou focal) substituída por metaplasia intestinal completa (células caliciformes e enterócitos absorventes) sem displasia (HE – 400x)



Fonte: Laboratório de Patologia - UFTM

#### 4.6 Metodologia do diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*

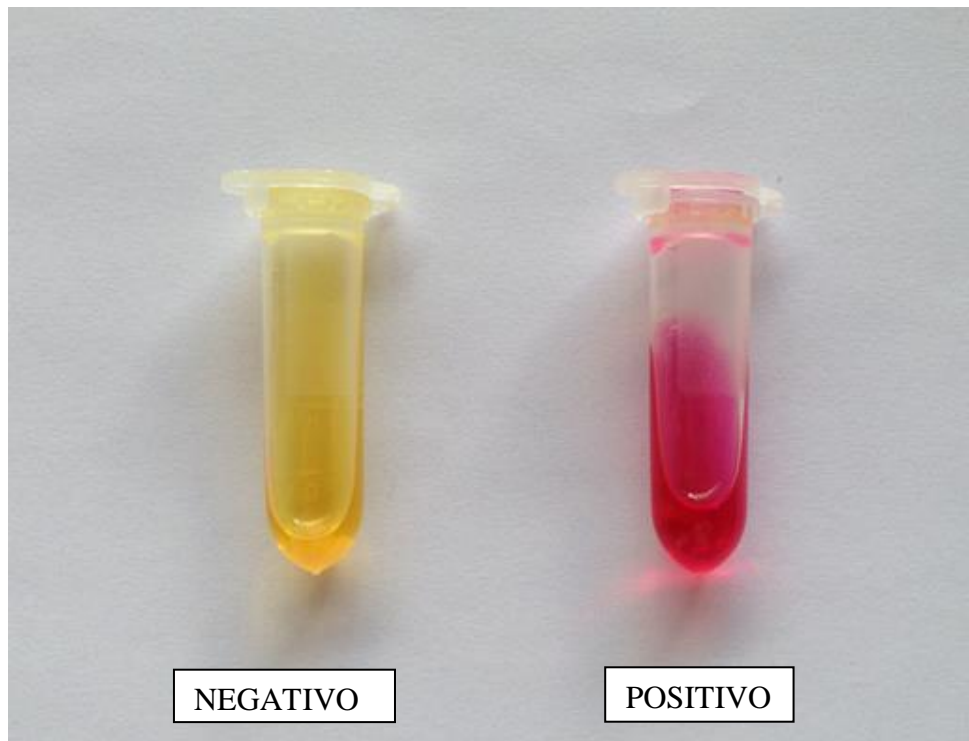
Foram utilizados diferentes métodos de diagnóstico e comprovação da infecção do *H. pylori* pelo fato da existência de casos de falsos negativos devido a vários fatores como escassez de bactérias e/ou uso prévio de bloqueadores H<sup>+</sup>.

##### 4.6.1 Teste rápido da urease

O teste rápido da urease é o método mais simples, menos dispendioso e que fornece resultado dentro de minutos e até 2 horas, dependendo da quantidade de bactérias presentes na mucosa.

Este teste é baseado na principal característica bioquímica da bactéria, que é a produção da enzima urease, que hidrolisa a ureia em gás carbônico e amônia. Desta forma, um fragmento de biópsia da mucosa do estômago é colocado em um meio contendo ureia e um indicador de pH. Caso a urease esteja presente, a ureia é convertida em amônia o que gera um aumento do pH e conseqüentemente uma mudança na coloração do meio, passando da cor âmbar para rósea (Figura 18).

Figura 18 - Resultado do teste da urease



Fonte: arquivo pessoal

Para esta pesquisa foi utilizado o kit “UREASE-*H. pylori*” do laboratório RNA com os seguintes dados: Lote 321, Fabricação. 09/07/2013 e Validade 09/01/2014 (Figura 19).

Figura 19 - Kit teste da urease - RNA laboratórios



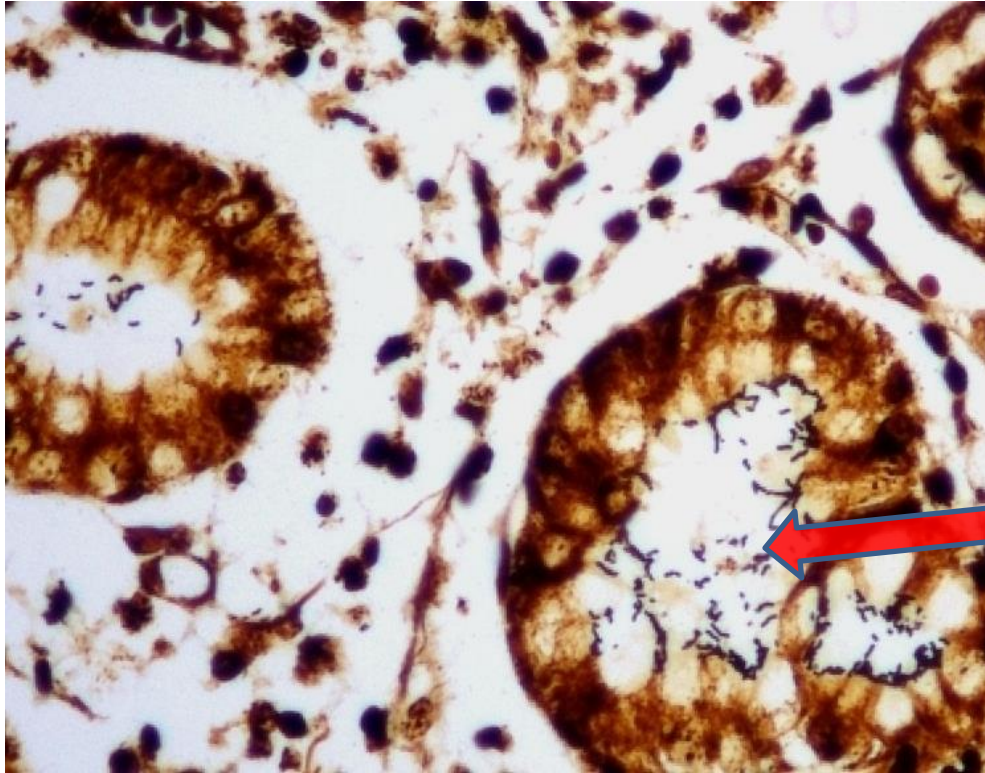
Fonte: arquivo pessoal

#### 4.6.2 Pesquisa de *H. pylori* no EAP

Os fragmentos fixados em formol a 4% foram desidratados em álcool e xilol e a seguir incluídos em parafina. Cortes de 5µm de espessura foram obtidos e corados pelo método Warthin Starry à base de prata para a pesquisa de *H. pylori* (DIXON et al., 1996).

A quantificação da densidade bacilar foi feita baseando-se em uma graduação de acordo com a quantidade de bacilos observados e assim classificando-se os achados em ausentes, positivo escasso (+/+++), moderado (++/+++) e intenso (+++/+++) (Figura 20).

Figura 20 - Numerosos bacilos compatíveis com *H. pylori* no interior de fovéolas (Warthin Starry – 1000x). Seta na cor vermelha



Fonte: Labaratorio de Patologia - UFTM

### **4.6.3 Extração do DNA e Amplificação do gene 16S *rRNA***

#### **4.6.3.1 Extração do DNA do *H. pylori***

A extração do DNA foi realizada a partir das amostras de tecido colhida por biópsia da região do antro gástrico utilizando-se o kit “QIAamp DNA miniKit” (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, foi adicionado 20µl de solução de proteinase K (20 mg/ml) em tubos contendo o fragmento de mucosa gástrica e homogeneizado em vórtex. A essa solução, foram acrescentados 200µl do tampão de lise (Buffer AL) fornecido pelo fabricante, homogeneizado em vórtex, centrifugado e incubado a 56°C por 10min. A seguir, 200µl de etanol foram adicionados e essa mistura colocada na coluna fornecida pelo kit QIAamp e centrifugada a 6000 giros por 1min. A coluna foi colocada em outro microtubo coletor de 2ml, e o filtrado do tubo anterior descartado. O material da coluna foi lavado duas vezes (250µl cada) com o primeiro tampão (Buffer AW1) e duas com o segundo tampão de lavagem (Buffer AW2) fornecida pelo kit. Finalmente, o DNA foi eluído com 100µl de tampão AE fornecido pelo kit.

#### **4.6.3.2 Amplificação do gene 16S *rRNA* para pesquisa do *H. pylori***

Realizada por meio da extração do DNA com amplificação do gene 16S rRNA, por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos (RILEY et al., 1996). As amostras que apresentaram 364pb foram consideradas *H. pylori* positivas e foram posteriormente incluídas na análise da expressão dos genes *cagA*, sítios de fosforilação CagA EPIYA, *vacA* (*m e s*), *iceA* (1 e 2) e *babA2* (Tabela 1).

### **4.7 Metodologia para a pesquisa dos fatores de virulência: genes *cagA*, CagA EPIYA, *vacA* (*m e s*), *iceA*, *babA2***

Todos os 126 pacientes inicialmente incluídos no estudo foram submetidos à detecção do gene 16S *rRNA* para o diagnóstico da infecção por *H. pylori*. Destes, 38 eram *H. pylori*-positivos e foram submetidos à pesquisa dos fatores de virulência da bactéria.



#### 4.7.1 – Ampliação dos genes *vacA*, *iceA* e *babA2*

As amostras *H. pylori*-positivas foram submetidas à detecção das regiões média (“m”) e sinal (“s”) do gene *vacA* utilizando os primers descritos por ATHERTON *et al.* (1995). As amostras foram classificadas como tipo s1 ou s2 e tipo m1 ou m2. Os subtipos do gene *iceA* e o gene *babA2* foram detectados de acordo com os primers descritos em 1998 (VAN DOORN *et al.*, 1998) e em 1999 (GERHARD *et al.*, 1999).

Finalmente, para cada amostra foi preparado um “mix” de PCR contendo aproximadamente 50 ng de DNA, acrescido de 1% de solução de tampão da enzima Taq DNA polimerase (KCl 50 mM e Tris-HCL 10 mM), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de cada desoxinucleotídeo, 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Promega, Madison, Estados Unidos), e 10 pmol de cada primer, em um volume total de solução de 20 µL. Os pares de primers utilizados e as condições de PCR estão na Tabela 1.

#### 4.7.2 - Amplificação do gene *cagA* e da região 3’ variável do gene *cagA*

O fragmento de 340 pb do gene *cagA* foi amplificado com primers descritos em 1994 (KELLY *et al.*, 1994). Todas as amostras *cagA* positivas foram submetidas à amplificação da região 3’ variável do gene *cagA* (que contém as sequências EPIYA) utilizando os primers descritos por YAMAOKA *et al.* (1996). Foi preparado um “mix” de PCR contendo 1% da solução tampão da enzima Taq DNA polimerase (KCl 50 mM and Tris-HCL 10 mM), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de cada desoxinucleotídeo, 1,0 U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, Estados Unidos), 10 pmol de cada primer e 2 µL de DNA, em um volume total de solução de 20 µL. A reação produziu produtos de 500 pb a 850 pb de acordo com o número de repetições de EPIYA-C. A infecção mista também foi detectada por esta metodologia. As condições de PCR estão descritas na Tabela 1.

O termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) foi utilizado para amplificação de todas as reações. Os produtos obtidos foram corados com brometo de etídeo e visualizados em gel de agarose 1,5% em um transluminador de luz ultravioleta conforme descreve a Figura 21.

Figura 21 - Metodologia da eletroforese de amostras representativas dos diferentes sítios EPIYA da proteína *CagA* observados em pacientes *H. pylori*-positivos. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de bases; Colunas de 1 a 5: sítios EPIYA

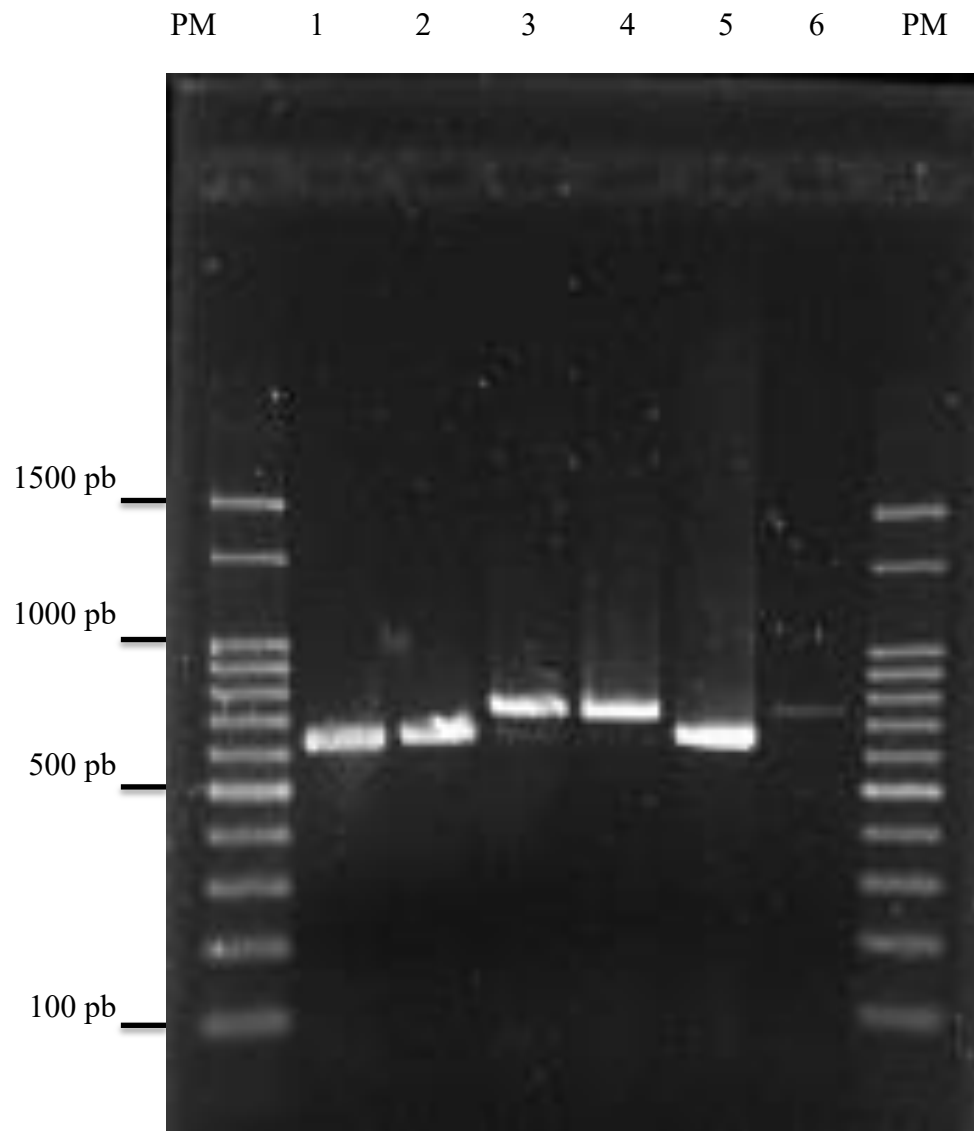


Tabela 1 – Primers e condições de amplificação da PCR para os fatores de virulência

Gene	Sequência do primer (5' to 3')	Temperatura, tempo e ciclos para PCR	Tamanho (pb) dos produtos
16S <i>rRNA</i>	H276F: TATGACGGGTATCCGGC	94°C, 5 min; 34 ciclos (94°C, 2 s, 53°C, 2s, 72°C, 30s) e 72°C, 15 min	364
	H676R: ATTCCACCTACCTCTCCCA		
<i>cagA</i>	CAGF: GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG	95°C, 5 min; 38 ciclos (94°C, 1min, 55°C, 1 min, 72°C, 2 min) e 72°C, 7 min	340
	CAGR: CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA		
CagA EPYIA	CAGF1: ACCCTAGTCGGTAATGGGTTA	95°C, 5 min; 35 ciclos (95°C, 1 min, 50°C, 1 min, 72°C, 1 min) e 72°C, 7 min	500 a 800
	CAGR1: GTAATTGTVTAGTTTCGC		
<i>vacS</i>	VA1F: ATGGAAATACAACAAACACAC	95°C, 5 min, 34 ciclos (95°C, 1 min, 52°C, 1 min, 72°C, 1 min) e 72°C, 15 min	259 (s1) 286 (s2)
	VA1R: CTGCTTGAATGCGCCAAAC		
<i>vacM</i>	VA4F: GAGCCCCAGGAAACATTG	95°C, 1min 30s, 34 ciclos (95°C, 30s, 56°C, 1 min, 72°C, 1min 30s) e 72°C, 5 min	630 (m1) 352 (m2)
	VA4R: CATAACTAGCGCCTTGAC		
	VA7F: GTAATGTGGTTTCAACACC		
	VA7R: TAATGAGATCTTGAGCGCT		
<i>babA2</i>	Baba2F: AATCCAAAAAGGAGAAAAAGTATGAA	94 °C, 5min, 30 ciclos (94 °C, 1 min, 55 °C, 1 min, 72 °C, 1 min) e 72 °C, 10 min	832
	Baba2R: TGTTAGTGATTTTCGGTGTAGGACA		
<i>iceA2</i>	IceA1F: GTGTTTTTAACCAAAGTATC	94°C, 9 min, 40 ciclos (95°C, 30s, 50°C, 45s, 72°C, 45s) e 72°C, 5 min	247 (A1) 124, 229 ou 334 (A2)
	IceA1R: CTATAGCCASTYTCTTTGCA		
	IceA2F: GTTGGGTATATCACAATTTAT		
	IceA2R: TTRCCCTATTTTCTAGTAGGT		

## **4.8 Metodologia da Expressão dos Genes *TLR-4*, *IL-8*, *CCL-2* e *CCR-2***

### **4.8.1 Extração de RNA**

Um fragmento de mucosa do antro gástrico que foi obtido durante o exame de endoscopia digestiva alta e foi destinado à extração de RNA.

A extração do RNA total foi realizada utilizando-se kit de extração de RNA (RNA SV Total RNA Isolation System, Promega - EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os fragmentos de tecidos, armazenados em nitrogênio, foram processados por maceração mecânica. Os fragmentos resultantes deste procedimento foram transferidos para tubo eppendorf contendo tampão de lise, e misturados por inversão; foi então adicionado 350µl de tampão de diluição. As amostras foram aquecidas em banho-maria a 70°C por 3 minutos e centrifugadas a 10 minutos a 13000xg à 4°C. Após esta centrifugação o sobrenadante foi transferido para novos tubos eppendorfs e adicionado 200µl de etanol a 95%. O material foi transferido para um conjunto de separação do kit, contendo uma membrana de separação, sendo posteriormente centrifugado por 1 minuto a 13000xg à 4°C.; o RNA foi lavado, por 1 minuto, por centrifugação (13000xg à 4°C) em 600µl de tampão apropriado. A presença de DNA contaminante foi eliminada com tratamento com DNase por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esta incubação foi adicionado 200µl de DNase stop e centrifugado por 1 minuto a 13000xg à 4°C. O material foi novamente lavado por 2 vezes (1 minuto a 13000xg à 4°C). Esta membrana separadora contendo o RNA foi transferida para outro tubo e adicionado 30µl de água livre de nucleasse, e centrifugado por 1 minuto a 13000xg à 4°C. Após estes procedimentos, o RNA obtido foi eluído em 30µl de água deionizada e livre de RNase, para quantificação e confecção de DNA complementar (cDNA).

### **4.8.2 Confecção de cDNA**

O cDNA foi confeccionado a partir de 1 µg de RNA, 0,5 µg de Oligo dT (Promega - EUA) e água ultra pura (Milli-Q) autoclavada. Esse material foi levado ao termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc - EUA) para um ciclo de 5 minutos a 70°C. Após resfriamento imediato, foram adicionados dNTP (2,5mM), transcriptase reversa M-MLV RT (Improm II, Promega - EUA) e tampão para reação M-MLV-5x Buffer (Promega - EUA). Essa reação foi levada ao termociclador para mais um ciclo de 1 hora à 42°C, seguido de 3 minutos a 10°C.

No final, foram adicionados ao cDNA confeccionado 75µl de água ultra pura autoclavada, sendo estas amostras congeladas em seguida a -20°C, até o momento de uso.

O cDNA foi utilizado para quantificação dos produtos de interesse por PCR em tempo real.

#### **4.8.3 Reações de PCR em tempo real**

A expressão quantitativa de *mRNA* dos genes *TLR-4*, *CCL-2* e *CCR-2* foram analisadas por reações de PCR em tempo real, nas amostras de cDNA de fragmento do corpo gástrico. Foi utilizado o sistema SYBR Green no aparelho GeneAmp 7500 (Applied Biosystems – USA). Primers adequados para tais reações conforme lista abaixo, foram criados a partir do programa OligoPerfect™ Designer (Invitrogen - USA). O sistema SYBR Green realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras (ABI Prism Software - EUA) através de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos, como a β-actina, uma proteína constitutiva presente no citoesqueleto de diversos tipos celulares. O cDNA sintetizado a partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com reagente FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche, Suíça) como determinado pelo fabricante, sendo que para cada amostra utilizou-se 6,5µl do mix SYBR Green, 0,5µl do primer sense e anti-sense, 2,5µl do cDNA e 5µl de água estéril. A reação básica de amplificação compreendeu 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*cycle threshold* – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atingiu um dado limiar. Foi utilizado o método C<sub>T</sub> comparativo (ΔΔC<sub>T</sub>), por meio de fórmulas aritméticas para alcançar o resultado da quantificação relativa de *mRNA*, de acordo com boletim publicado da Applied Biosystems (Manual do Usuário N° 2: Quantificação Relativa de Expressão Gênica - PN 4303859 - EUA).

## ***ANÁLISE ESTATÍSTICA***

---

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando os softwares Statview® (Abacus concept, EUA) e IBM SPSS Statistics® (IBM Corporation®) (Versão 23).

As variáveis contínuas foram submetidas a testes de Normalidade e variância (Kolmogorov-Smirnov).

A associação de cada variável com a presença da infecção do *H. pylori* e seus fatores de virulência foi verificada pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ )

Foram aplicados testes paramétricos para os níveis relativos de *mRNA*.

Para a análise da expressão de *TLR-4*, *IL-8*, *CCL-2* e *CCR-2*, e os fatores de virulência foram utilizados os testes Mann-Whitney (T) e Kruskal-Wallis (H) seguidos pelo pós-teste de Dunn para comparação entre 3 ou mais grupos.

Os dados foram expressos em mediana com valores mínimo e máximo e percentis.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a rejeição da hipótese foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## ***RESULTADOS***

---



## 6 RESULTADOS

### 6.1 Dados clínicos da amostra (N=126)

Os 126 pacientes do presente estudo tinham idade entre 18 e 87 anos, com média de  $44,9 \pm 15,5$  anos, sendo que 84 (66,7%) pacientes eram do sexo feminino e 42 (33,3%) pacientes eram do sexo masculino.

A média do IMC da amostra foi de  $26,8 \pm 6,1$  kg/m<sup>2</sup>. A cor de pele predominante foi a branca em 106 (84,1%) dos pacientes. Cento e quatro (82,5%) pacientes negavam o tabagismo e 22 (17,5 %) eram fumantes.

### 6.2 Dados clínicos da amostra em relação à positividade do *H. pylori* no antro e corpo gástrico pesquisado através do EAP (N=126)

*H. pylori* esteve presente no antro gástrico através do EAP em 42 (33,3%) dos 126 pacientes estudados e já no corpo gástrico o mesmo foi positivo no EAP em 43 (34,1%) pacientes.

Dentre os 126 pacientes que foram submetidos ao questionário clínico (Tabela 2), não foi encontrada diferença significativa em relação aos dados clínicos com a presença do *H. pylori* no antro gástrico diagnosticado pelo EAP nos referidos pacientes.

Baseando-se somente na anamnese, e em situações clínicas frequentes como dor epigástrica, pirose, tabagismo, etilismo, obesidade, e diabetes dentre outras, não foi obtido uma prévia para o diagnóstico da bactéria. A dor epigástrica foi o sintoma mais frequente acometendo 105 (83,3%) pacientes, seguida pelo sintoma pirose que se manifestou em 86 (68,3%) pacientes. ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

Comparando os pacientes do sexo masculino e do sexo feminino com a presença do *H. pylori* no antro gástrico, houve uma maior prevalência da bactéria nos pacientes do sexo feminino, porém sem significância estatística. Dos 84 (66,7%) pacientes do sexo feminino, 28 (22,2%) apresentaram positividade para a presença da bactéria no antro gástrico enquanto que dos 42 (33,3%) dos pacientes do sexo masculino, 14 (11,1%) pacientes apresentaram positividade para a mesma no antro gástrico (Tabela 2).

Não houve diferença estatística significativa (teste do Qui-quadrado de Pearson) quando estudamos os pacientes que haviam feito tratamento anterior para DRGE. Dos 126

pacientes estudados, 48 (38,1%) pacientes haviam feito o tratamento para a DRGE e dentre eles 16 (12,7%) pacientes tiveram a bactéria presente no antro gástrico e 32 (25,4%) não tiveram a positividade para o *H. pylori*.

Tabela 2 - Comparação de dados clínicos com a presença do *H. pylori* pesquisado no antro gástrico através do EAP (N=126)

<b>Dados clínicos</b>	<b>Número</b>	<b><i>H. pylori</i> +</b>	<b><i>H. pylori</i> -</b>
Sexo masculino	42 (33,3%)	14 (11,1%)	28 (22,2%)
Sexo feminino	84 (66,7%)	28 (22,2%)	56 (44,4%)
Dor epigástrica	105 (83,3%)	35 (27,8%)	70 (55,6%)
Náuseas	56 (44,4%)	21 (16,7%)	35 (27,8%)
Pirose	86 (68,3%)	27 (21,4%)	59 (46,8%)
Disfagia	30 (23,8%)	15 (11,9%)	15 (11,9%)
Regurgitação	42 (33,3%)	17 (13,5%)	25 (19,9%)
Tabagismo	22 (17,5%)	6 (4,8%)	16 (12,7%)
Etilismo	50 (39,7%)	20 (15,9%)	30 (23,8%)
Obesidade	27 (21,4%)	13 (10,3%)	14 (11,1%)
Diabetes	12 (9,5%)	5 (4,0%)	7 (5,6%)
Tratamento anterior DRGE	48 (38,1%)	16 (12,7%)	32 (25,4%)
Tratamento anterior gastrite	37 (29,4%)	8 (6,3%)	29 (23,0%)
Tratamento anterior <i>H. pylori</i>	19 (15,1%)	3 (2,4%)	16 (12,7%)

p>0,05

Todos os pacientes que estavam em uso de IBP foram orientados a suspender a medicação por pelo menos duas semanas antes da realização do exame de EDA e estes mesmos pacientes quando comparados em relação à presença do *H. pylori* no corpo gástrico, mostraram uma diminuição significativa na positividade para o *H. pylori* nesta região do estômago (teste do Qui-quadrado de Pearson). Dos 51 (40,5%) pacientes que haviam usado IBP, apenas 13 (10,3%) pacientes tiveram a presença da bactéria no corpo gástrico enquanto que 38 (30,2%) pacientes não apresentaram positividade para a mesma no corpo gástrico (Tabela 3).

Tabela 3 –Usaram IBP e positividade do *H. pylori* no corpo gástrico

		<i>H. pylori</i> presente no corpo gástrico		Total
		Ausente	Presente	
Usaram IBP	Não	45 35,7%	30 23,8%	75 59,5%
	Sim	38 30,2%	13 10,3%	51 40,5%
Total		83 65,9%	43 34,1%	126 100,0%

p<0,05

Como já citado, todos os pacientes que usavam IBP foram orientados a suspender a medicação por pelo menos duas semanas antes da realização do exame de EDA e estes mesmos pacientes quando comparados em relação à presença do *H. pylori* no antro gástrico, o fato de terem usado IBP mostrou uma diminuição significativa na positividade para o *H. pylori* nesta região do estômago (teste do Qui-quadrado de Pearson). Dos 51 (40,5%) pacientes que haviam usado IBP, apenas 10 (7,9%) pacientes tiveram a presença da bactéria no antro gástrico enquanto que 41 (32,5%) pacientes não apresentaram positividade para a mesma no antro gástrico (Tabela 4).

Tabela 4 – Usaram IBP e positividade do *H. pylori* no antro gástrico

	<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total	
	Ausente	Presente		
Usaram IBP	Não	43 34,1%	32 25,4%	75 59,5%
	Sim	41 32,5%	10 7,9%	51 40,5%
Total	84 66,7%	42 33,3%	126 100,0%	

p<0,05

### 6.3 Resultados da EDA em relação à positividade do *H. pylori* no antro e corpo gástrico pesquisado através do EAP (N=126).

O teste da urease realizado em fragmentos de antro gástrico colhidos durante a EDA mostrou uma positividade em 24 (19,0%) pacientes, a pesquisa da bactéria no antro através do EAP foi positiva em 42 (33,3%) pacientes e a positividade do *H. pylori* no corpo gástrico, também pelo EAP foi de 43 (34,1%) pacientes.

Considerando-se a normalidade do esôfago e do duodeno como dados da EDA não houve diferença estatística significativa para a presença do *H. pylori* nestes achados (teste do Qui-quadrado de Pearson) ( $p>0,05$ ) Dos 61 (48,4%) pacientes com esôfago normal, 24 (19,0%) pacientes tinham a presença do *H. pylori* no antro gástrico e 37 (29,4%) pacientes não tinham. Os pacientes que apresentaram duodeno normal foram 112 (88,9%) e destes 37 (29,4%) pacientes tinham o *H. pylori* presente no antro gástrico e 75 (59,5%) pacientes não tinham em esta positividade.

A EDA mostrou alterações no corpo gástrico de 19 (15,1%) pacientes, porém no antro gástrico dos mesmos pacientes estudados, estas alterações endoscópicas foram mais frequentemente encontradas, isto é, em 50 (39,7%) pacientes.

A ausência da esofagite de refluxo diagnosticada durante o exame de EDA apresentou diferença significativa (teste do Qui-quadrado de Pearson) diante da ausência do *H. pylori* no antro gástrico ( $p < 0,05$ ), pois podemos observar que dos 97 (77,0%) pacientes que não apresentaram esofagite de refluxo pela EDA, 59 (46,8%) pacientes não tiveram positividade do *H. pylori* no antro gástrico. Também verificamos que 29 (23%) pacientes que tiveram esofagite de refluxo um total de 25 (19,8%) pacientes não tiveram a presença da bactéria no antro gástrico. (Tabela 5).

Tabela 5 – Esofagite de refluxo (EDA) pela classificação de Los Angeles (LA) e positividade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total
		Ausente	Presente	
Esofagite de refluxo (LA)	Grau A	18 14,3%	3 2,4%	21 16,7%
	Grau B	7 5,6%	1 0,8%	8 6,3%
	Ausente	59 46,8%	38 30,2%	97 77,0%
Total		84 66,7%	42 33,3%	126 100,0%

$p < 0,05$

A tabela 6 mostra que os pacientes que apresentaram corpo gástrico normal na EDA foram 107 (84,9%) e que dentre eles 78 (61,9%) pacientes não tiveram a positividade da bactéria no antro gástrico pelo EAP. Resultados estatisticamente significativos (teste do Qui-quadrado de Pearson) ( $p < 0,05$ ).

Tabela 6 – Corpo gástrico normal e positividade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total
		Ausente	Presente	
Corpo gástrico normal	Não	6 4,8%	13 10,3%	19 15,1%
	Sim	78 61,9%	29 23,0%	107 84,9%
Total		84 66,7%	42 33,3%	126 100,0%

p&lt;0,05

Dos 126 pacientes estudados, 111 (88,1%) apresentaram um corpo gástrico normal e, dentre eles, 81 (64,3%) pacientes não tiveram o *H. pylori* presente no antro gástrico. Já entre os 15 (11,9%) pacientes que apresentaram gastrite, 12 (9,5%) pacientes tiveram a bactéria diagnosticada no antro do estômago. Resultados com diferença estatística significativa (teste do Qui-quadrado de Pearson) (p<0,05) (Tabela 7).

Tabela 7 – Gastrite de corpo gástrico e positividade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total
		Ausente	Presente	
Gastrite de corpo gástrico- classificação	Enantematosa	3 2,4%	9 7,1%	12 9,5%
	Erosiva plana	0 0,0%	3 2,4%	3 2,4%
	Ausente	81 64,3%	30 23,8%	111 88,1%
Total		84 66,7%	42 33,3%	126 100,0%

p&lt;0.05

A tabela 8 mostra que os pacientes que apresentaram antro gástrico normal na EDA foram 50 (39,7%) e dentre eles, 40 (31,7%) pacientes não tiveram a positividade da bactéria no antro gástrico pelo EAP. Dados significativos (teste do Qui-quadrado de Pearson) ( $p < 0.05$ ).

Tabela 8 – Antro gástrico normal e positividade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total
		Ausente	Presente	
Antro gástrico normal	Não	44 34,9%	32 25,4%	76 60,3%
	Sim	40 31,7%	10 7,9%	50 39,7%
Total		84 66,7%	42 33,3%	126 100,0%

$p < 0.05$

Dentre os 126 pacientes estudados, 54 (42,9%) pacientes apresentaram um antro gástrico normal e, dentre eles, 42 (33,3%) pacientes não tiveram o *H. pylori* presente no antro gástrico. Já entre os 72 (57,14%) pacientes que apresentaram gastrite, 30 (23,8%) pacientes tiveram a bactéria diagnosticada no antro do estômago. Resultados com diferença estatística significativa (teste do Qui-quadrado de Pearson) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 9)..

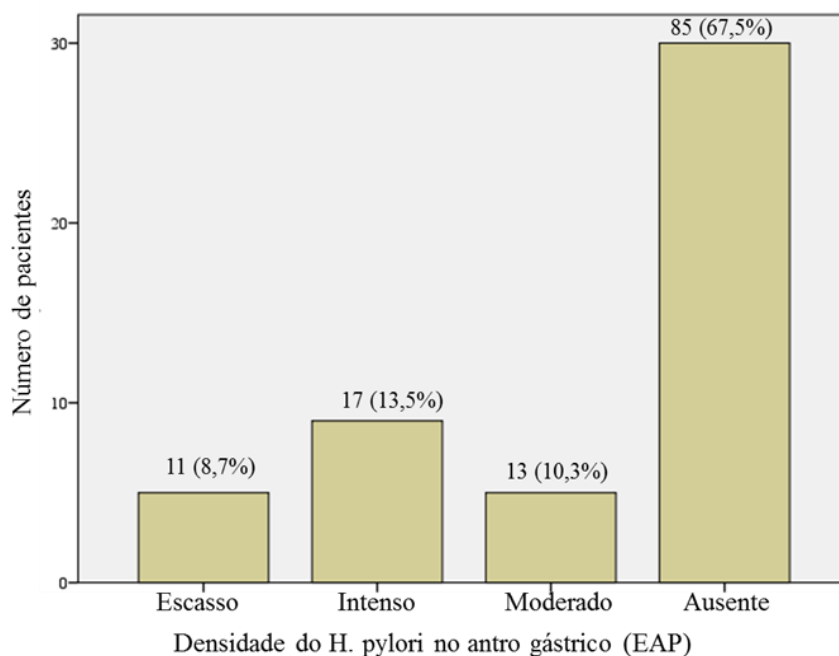
Tabela 9 – Classificação da gastrite de antro gástrico e positividade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total
		Ausente	Presente	
Gastrite de antro gástrico- classificação	Enantematosa	26 20,6%	13 10,3%	39 31,0%
	Erosiva elevada	4 3,2%	7 5,6%	11 8,7%
	Erosiva plana	12 9,5%	8 6,3%	20 15,9%
	Nodular	0 0,0%	2 1,6%	2 1,6%
	Gastrite Ausente	42 33,3%	12 9,5%	54 42,9%
Total		84 66,7%	42 33,3%	126 100,0%

$p < 0,05$

A figura 22 mostra a frequência da densidade do *H. pylori* no antro gástrico pelo EAP. Podemos observar que densidade intensa da bactéria foi a mais frequente atingindo 17 (13,5%) pacientes, seguida da densidade moderada com 13 (10,3%) pacientes e a escassa com 11 (8,7%) pacientes.

Figura 22 - Frequência da densidade do *H. pylori* no antro gástrico



A Tabela 10 mostra que houve diferença estatística significativa entre os dados obtidos com o teste da urease no antro gástrico e com a densidade do *H. pylori* no antro gástrico. Vinte e quatro (19,0%) pacientes com teste de urease positivo tiveram a positividade com a presença do *H. pylori* no antro gástrico (teste do Qui-quadrado de Pearson) ( $p < 0,05$ ).

Tabela 10 - Comparação de positividade do teste da urease realizado no antro gástrico

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)				Total
		Escasso	Intenso	Moderado	Ausente	
Teste da urease (antro gástrico)	Negativo	6 4,8%	8 6,3%	8 6,3%	80 63,5%	102 81,0%
	Positivo	5 4,0%	9 7,1%	5 4,0%	5 4,0%	24 19,0%
Total		11 8,7%	17 13,5%	13 10,3%	85 67,5%	126 100,0%

$p < 0,05$



#### **6.4 Resultados no EAP em relação à positividade do *H. pylori* no antro e corpo gástrico (N=126).**

A positividade do *H. pylori* no corpo gástrico através do EAP foi de 43 (34,1%) pacientes e o *H. pylori* foi positivo no antro gástrico também pesquisado através do EAP em 42 (33,3%) pacientes. Somente um (0,07%) paciente foi positivo no corpo gástrico e não se mostrou positivo no antro gástrico ( $p < 0,05$ ).

##### **6.4.1 Esôfago (EAP)**

Oitenta e três (65,9%) pacientes tiveram o esôfago dado como normal nas biópsias feitas durante o exame de endoscopia digestiva alta. Destes pacientes, 29 (23,0%) apresentaram a pesquisa do *H. pylori* positiva no antro gástrico através EAP e 54 (42,9%) pacientes tiveram negativa a presença da bactéria, o que não mostrou significância estatística ( $p > 0,05$ ) a relação do *H. pylori* no antro gástrico e a normalidade do esôfago.

O mesmo aconteceu com os pacientes que tiveram diagnóstico anatomopatológico de esofagite de refluxo, isto é: 28 (22,2%) pacientes com esofagite de refluxo sendo 6 (4,8%) pacientes com *H. pylori* presente no antro gástrico e 22 (17,5%) com a bactéria ausente. Não houve significância estatística pelo teste do Qui-quadrado de Pearson ( $p > 0,05$ ).

##### **6.4.2 Corpo gástrico (EAP)**

Na tabela 11 podemos observar que de todos os 59 (46,8%) pacientes que apresentaram um corpo do estômago normal ao EAP, somente 1 (0,08%) paciente teve a positividade para o *H. pylori* no corpo gástrico, enquanto que 67 (53,2%) pacientes tiveram alterações histopatológicas no corpo do estômago e que dentre eles, 41 (32,5%) pacientes apresentaram a positividade para a bactéria.

Ainda na Tabela 11, observa-se que a densidade de infecção mais encontrada do *H. pylori* em relação às alterações histológicas do corpo gástrico foi de forma “moderada”, atingindo 24 (19,0%) pacientes dos 67 (53,2%) pacientes.

Todos os dados observados na referida Tabela 11 tiveram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Tabela 11 – Corpo gástrico normal (EAP) e a densidade do *H. pylori* no corpo gástrico (pesquisado no EAP)

		<i>H. pylori</i> (corpo gástrico)				Total
		Escasso	Intenso	Moderado	Ausente	
Corpo gástrico normal (EAP)	Não	11 8,7%	6 4,8%	24 19,0%	26 20,0%	67 53,2%
	Sim	1 0,08%	0 0,0%	0 0,0%	58 46,0%	59 46,8%
Total		12 9,5%	6 4,8%	24 19,0%	84 66,7%	126 100,0%

$p < 0,05$

Na tabela 12, podemos observar que 29 (59,2%) pacientes não apresentaram gastrite ativa no corpo gástrico e dentre eles somente 1 (2,0%) apresentou a infecção pelo *H. pylori* (teste do Qui-quadrado de Pearson) ( $p < 0,05$ ). Daí a estreita relação entre ausência de gastrite ativa e ausência da bactéria.

Os pacientes que tiveram gastrite ativa presente foram 20 (40,8%) e o tipo de atividade mais encontrada foi a discreta com 14 (28,6%) pacientes e a densidade de infecção pelo *H. pylori* predominante foi a moderada com 7 (14,3%) pacientes infectados ( $p < 0,05$ )

Tabela 12 - Gastrite ativa no corpo gástrico (Classificação no EAP) e a densidade do *H. pylori* no corpo gástrico pesquisado (EAP)

		<i>H. pylori</i> (corpo gástrico)				Total
		Escasso	Intenso	Moderado	Ausente	
Gastrite ativa no corpo gástrico	Atividade discreta	7 5,6%	3 2,4%	14 11,1%	2 1,6%	26 20,6%
	Atividade intensa	0 0,0%	1 0,8%	0 0,0%	0 0,0%	1 0,8%
	Atividade moderada	4 3,2%	2 1,6%	8 6,3%	3 2,4%	17 13,5%
	Atividade ausente	1 0,8%	0 0,0%	2 1,6%	79 62,7%	82 65,1%
Total		12 9,5%	6 4,8%	24 19,0%	84 66,7%	126 100,0%

$p < 0,05$

Na tabela 13, podemos observar que 62 (49,29%) pacientes não apresentaram gastrite crônica no corpo gástrico e dentre eles nenhum apresentou a infecção pelo *H. pylori* ( $p < 0,05$ ).

Os pacientes que tiveram gastrite crônica presente foram 64 (50,71%) e o tipo de atividade mais encontrada foi a discreta com 48 (38,09%) pacientes, seguida pela moderada com 14 (11,11%) e a densidade de infecção pelo *H. pylori* predominante foi a moderada com 19 (15,07%) pacientes infectados ( $p < 0,05$ ) (teste do Qui-quadrado de Pearson).

Tabela 13 - Gastrite crônica no corpo gástrico (Classificação no EAP) e a densidade do *H. pylori* no corpo gástrico pesquisado (EAP)

	<i>H. pylori</i> (corpo gástrico)				Total	
	Escasso	Intenso	Moderado	Ausente		
Gastrite crônica no corpo gástrico (EAP)	Crônica discreta	7 5,6%	4 3,2%	19 15,1%	18 14,3%	48 38,1%
	Crônica intensa	0 0,0%	0 0,0%	1 0,8%	1 0,8%	2 1,6%
	Crônica moderada	5 4,0%	2 1,6%	4 3,2%	3 2,4%	14 11,1%
	Crônica ausente	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	62 49,2%	62 49,2%
		12	6	24	84	126
	Total	9,5%	4,8%	19,0%	66,7%	100,0%

$p < 0,05$

### 6.4.3 Antro gástrico (EAP)

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre antro gástrico normal ao EAP em relação à presença do *H. pylori* no antro gástrico, uma vez que, entre os 27 (21,4%) pacientes com antro gástrico normal no EAP nenhum evidenciou a presença do *H. pylori* no antro gástrico, enquanto que dos 99 (78,6%) pacientes com alterações histológicas no antro gástrico, 42 (33,3%) pacientes apresentaram positividade para a presença da bactéria no antro gástrico ( $p < 0,05$ ) (teste do Qui-quadrado de Pearson) (Tabela 14).

Tabela 14 - Antro gástrico normal (EAP) e positividade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total
		Ausente	Presente	
Antro gástrico normal	Não	57 45,2%	42 33,3%	99 78,6%
	Sim	27 21,4%	0 0,0%	27 21,4%
Total		84 66,7%	42 33,3%	126 100,0%

$p < 0,05$

Pode-se observar que 80 (63,5%) pacientes não apresentaram gastrite ativa no antro gástrico e dentre eles somente 4 (3,2%) apresentaram a infecção pelo *H. pylori* ( $p < 0,05$ ) (teste do Qui-quadrado de Pearson) (Tabela 15).

Quarenta e seis (36,5%) pacientes tiveram gastrite ativa no antro gástrico e o tipo de atividade mais encontrada foi a com atividade discreta em 19 (15,07%) pacientes, seguida pela intensa com 16 (12,69%) e por último a moderada em 11 (8,73%) pacientes. A densidade predominante de infecção pelo *H. pylori* foi a intensa em 17 (13,49%) pacientes, seguida da moderada com 13 (10,31%) pacientes e a escassa em 11 (8,73%) pacientes infectados ( $p < 0,05$ ).

Tabela 15 - Gastrite ativa no antro gástrico (Classificação no EAP) e densidade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)				Total
		Escasso	Intenso	Moderado	Ausente	
Gastrite ativa no antro gástrico	Atividade discreta	6 4,8%	2 1,6%	2 1,6%	9 7,1%	19 15,1%
	Atividade intensa	1 0,8%	11 8,7%	4 3,2%	0 0,0%	16 12,7%
	Atividade moderada	2 1,6%	4 3,2%	5 4,0%	0 0,0%	11 8,7%
	Atividade ausente	2 1,6%	0 0,0%	2 1,6%	76 60,3%	80 63,5%
Total		11 8,7%	17 13,5%	13 10,3%	85 67,5%	126 100,0%

p<0,05

Trinta e quatro (27,0%) pacientes não apresentaram gastrite crônica no antro gástrico e dentre eles nenhum apresentou a infecção pelo *H. pylori* (p<0,05) (Tabela 16).

Dos 92 (73,01%) pacientes que tiveram gastrite crônica a mais encontrada foi de forma discreta com 50 (39,68%) pacientes, seguida pela moderada com 27 (21,42%) e depois a crônica intensa em 15 (11,9%) pacientes. A densidade predominante de infecção pelo *H. pylori* foi a intensa em 17 (13,5%) pacientes, seguida da moderada com 13 (10,3%) pacientes e a escassa em 11 (8,7%) pacientes infectados (p<0,05) (teste do Qui-quadrado de Pearson)

Tabela 16 - Gastrite crônica no antro gástrico (Classificação no EAP) e densidade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)				Total
		Escasso	Intenso	Moderado	Ausente	
Gastrite crônica no antro gástrico	Crônica discreta	4 3,2%	0 0,0%	4 3,2%	42 33,3%	50 39,7%
	Crônica intensa	3 2,4%	9 7,1%	3 2,4%	0 0,0%	15 11,9%
	Crônica moderada	4 3,2%	8 6,3%	6 4,8%	9 7,1%	27 21,4%
	Crônica ausente	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	34 27,0%	34 27,0%
Total		11 8,7%	17 13,5%	13 10,3%	85 67,5%	126 100,0%

p<0,05

### 6.5 Análise dos fatores de virulência do *H. pylori* nas amostras com o gene 16S *rRNA* positivas no antro gástrico (N=38)

Nos 126 pacientes incluídos no estudo, onde foram realizados a história clínica completa, exames de endoscopia digestiva alta com biópsias e exames anatomopatológico, também realizou-se o estudo da biologia molecular, onde evidenciou-se a positividade do *H. pylori* através da expressão do gene 16S *rRNA* em 30,15% (38) das amostras analisadas.

Neste exame de biologia molecular, além da pesquisa de positividade do *H.pylori* como acima citado, foi avaliada a expressão dos seguintes fatores de virulência desta bactéria: gene *cagA* e seus sítios de fosforilação CagA EPYIA ABC, CagA EPYIA ABC+ABCC, CagA EPIYA ABCC, CagA EPIYA AB, CagA EPIA ABCCC, os genes *vacAm1*, *vacAm2*, *vacAs1*, *vacAs2* e *babA2* em todas as amostras com o gene 16S *rRNA* positivo.

O gene *cagA* foi expresso em 55,3% (21) das amostras analisadas, enquanto que os os genótipos da citotoxina CagA se expressaram da seguinte forma: CagA EPYIA ABC foi expresso em 28,9% (11), seguido pelo CagA Epyia ABC+ABCC expresso em 10,5% (4), CagA EPYIA ABCC expresso em 7,9% (3), CagA EPYIA AB expresso em 5,3% (2) e CagA EPYIA ABCCC expresso em 2,6% (1). Tabela 17.

Tabela 17 - Distribuição do CagA EPYIA nas amostras com o gene 16s *rRNA* positivo

		<u>gene 16S rRNA</u>
		Positivo
CagA EPYIA	AB	2 5,3%
	ABC	11 28,9%
	ABC + ABCC	4 10,5%
	ABCC	3 7,9%
	ABCCC	1 2,6%
	Negativo	17 44,7%
	Total	38 100,0%

Num total de 89,47% (34) amostras de gene 16S *rRNA* positivo o gene *vacAm* esteve presente. Na Tabela 18 podemos ver que a expressão dos seus alelos *vacAm1* foi identificada em 36,8% (14), enquanto que o *vacAm2* em 52,6% (20) das amostras.

Tabela 18 - Expressão do gene *vacAm* nas amostras com o gene 16S *rRNA* positivo

		<u>gene 16S rRNA</u>
		Positivo
	Negativo	4
		10,5%
<i>vacAm</i>	<i>vacAm1</i>	14
		36,8%
	<i>vacAm2</i>	20
		52,6%
Total		38
		100,0%

O *vacAs* foi expresso em 89,47% (34) das amostras, sendo que os seus alelos se distribuíram na seguinte forma: *vacAs1* presente em 50% (19) dos pacientes e o alelo *vacAs2* em 39,5% (15) dos pacientes. Podemos perceber que o mesmo teve uma prevalência bem elevada nas amostras onde o *H. pylori* estava presente. Tabela 19

Tabela 19 - Expressão do gene *vacAs* nas amostras com o gene 16S *rRNA* positivo

		<u>gene 16S rRNA</u>
		Positivo
	Negativo	4
		10,5%
<i>vacAs</i>	<i>vacAs1</i>	19
		50,0%
	<i>vacAs2</i>	15
		39,5%
Total		38
		100,0%



Na tabela 20, vemos que o gene *iceA* foi detectado em 89,4% (34) dos pacientes, sendo que o genótipo *iceA1* foi encontrado em 28,9% (11) dos pacientes e genótipo *iceA2* em 60,5% (23) das amostras com *H. pylori* positivo. Em quatro amostras não houve a expressão do gene *iceA*.

Tabela 20 - Expressão do gen *iceA* nas amostras com o gene 16S *rRNA* positivo.

		gene 16S rRNA
		Positivo
<i>iceA</i>	<i>iceA1</i>	11 28,9%
	<i>iceA2</i>	23 60,5%
	Negativo	4 10,5%
Total		38 100,0%

O gene *babA2* apresentou a menor expressão, alcançando 10,5% (4) entre as amostras analisadas conforme evidencia a Tabela 21.

Tabela 21 - Expressão do gene *babA2* nas amostras com gene 16S *rRNA* positivo.

		gene 16S rRNA
		Positivo
<i>babA2</i>	Negativo	34 89,5%
	Positivo	4 10,5%
Total		38 100,0%

**6.6 Distribuição dos genes 16S *rRNA*, *cagA*, Sítios de fosforilação CagA EPYIA, genes *vacM*, *vacS*, *iceA* e *babA2* no antro gástrico dos indivíduos com gastrite ativa e sem gastrite ativa classificada no EAP e 16S *rRNA* positivo (N=38).**

Utilizando a mesma metodologia anterior, nos 126 pacientes incluídos no estudo, onde foram realizados a história clínica completa, exames de endoscopia digestiva alta com biópsias e exames anatomopatológico, também realizou-se o estudo da biologia molecular, onde evidenciou-se a positividade do *H. pylori* através da expressão do gene 16S *rRNA* em 30,15% (38) das amostras analisadas e a seguir será descrita as comparações dos fatores de virulência do *H. pylori* com a presença da gastrite ativa ou não no antro gástrico do pacientes estudados.

O gene 16S *rRNA* foi expresso em 84,2% (32) das amostras com gastrite ativa no antro gástrico, já nos indivíduos sem gastrite ativa no antro gástrico o gene 16S *rRNA* esteve presente em 15,8% (6) das vezes. Tabela 22.

Tabela 22 - Distribuição das amostras com gastrite ativa e não ativa no antro gástrico em relação ao gene 16S *rRNA* positivo

		gene 16S <i>rRNA</i>
		Positivo
Gastrite ativa no antro gástrico	Não	6
	Sim	32
		84,2%
Total		38
		100,0%

A expressão do gene *cagA* foi identificada em 62,50% (20) das amostras com gastrite ativa. Sua distribuição apresentou prevalência de 95,2% (20) entre os indivíduos com gastrite ativa e apenas 4,8% (1) naqueles com a forma não ativa ( $\chi^2 = 36,754$ ;  $p < 0,0001$ ). Tabela 23

Tabela 23 - Distribuição das amostras com gastrite ativa e não ativa no antro gástrico em relação ao gene *cagA* positivo ou negativo

		Gastrite ativa no antro gástrico		Total
		Não	Sim	
<i>cagA</i>	Negativo	5 29,4%	12 70,6%	17 100,0%
	Positivo	1 4,8%	20 95,2%	21 100,0%
Total		6 15,8%	32 84,2%	38 100,0%

$p < 0,05$

Os sítios de fosforilação CagA EPYIA apresentaram em 52,6% (20) dos pacientes estudados com gastrite ativa no antro e em 2,6% (1) dos pacientes sem gastrite ativa no antro. A distribuição se fez da seguinte forma nos pacientes com gastrite ativa do antro: CagA EPYIA AB 5,3% (2), CagA EPYIA ABC 28,9% (11), CagA EPYIA ABC + ABCC 10,5% (4), CagA EPYIA ABCC 5,3% (2) e CagA EPYIA ABCCC 2,6% (1). Podemos também observar que a maioria dos pacientes sem gastrite ativa no antro 13,2% (5) não tiveram a presença dos sítios de fosforilação da bactéria presente e o genótipo CagA EPIYA mais frequente foi o CagA EPYIA ABC em 28,9% (11) conforme citado. ( $\chi^2 = 38,304$ ;  $p = 0,0008$ ). Tabela 24

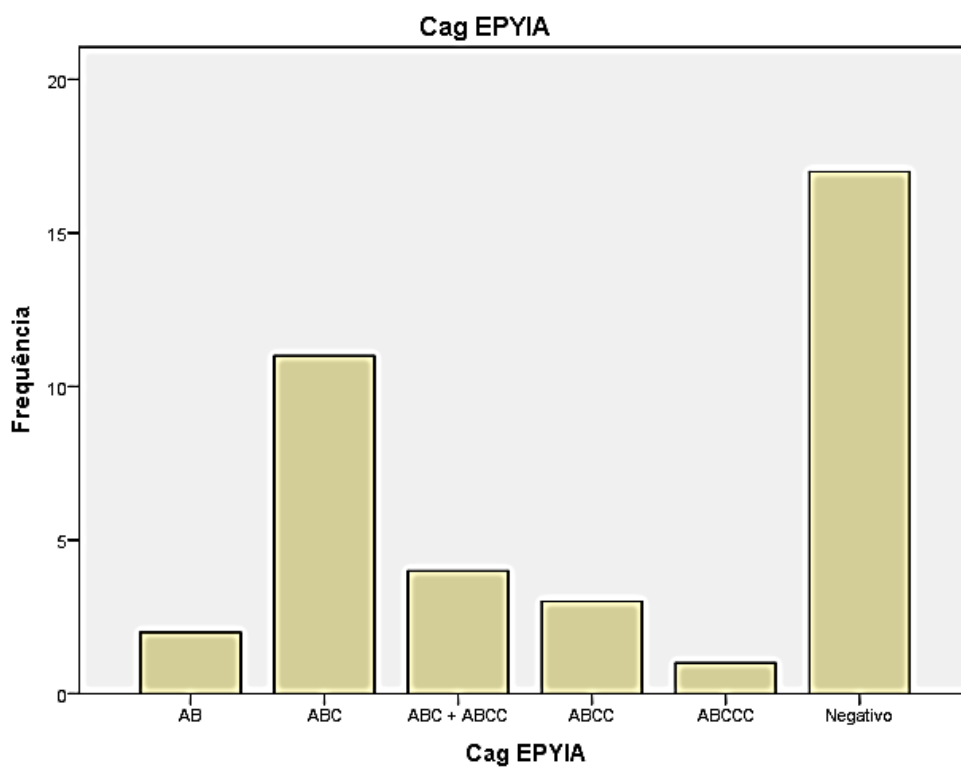
Tabela 24 - Distribuição das amostras com gastrite ativa e não ativa no antro gástrico em relação ao genótipo CagA EPYIA e suas variações

		Gastrite ativa no antro gástrico		Total
		Não	Sim	
CagA EPYIA	AB	0 0,0%	2 5,3%	2 5,3%
	ABC	0 0,0%	11 28,9%	11 28,9%
	ABC + ABCC	0 0,0%	4 10,5%	4 10,5%
	ABCC	1 2,6%	2 5,3%	3 7,9%
	ABCCC	0 0,0%	1 2,6%	1 2,6%
	Negativo	5 13,2%	12 31,6%	17 44,7%
	Total	6 15,8%	32 84,2%	38 100,0%

$p < 0,05$

A figura 23 nos mostra a distribuição dos sítios CagA EPIYA pesquisados no antro gástrico de pacientes com gastrite ativa e sem gastrite ativa. Neste gráfico pode-se observar que o tipo CagA EPIYA ABC foi o mais frequente atingindo 28,9% (11) pacientes, seguido pelos tipos CagA ABC+ABCC, ABCC, AB e o menos frequente CagA EPYIA ABCCC com 2,6% (1) paciente.

Figura 23 - Sítios CagA EPIYA pesquisados no antro gástrico



O gene *vacAm1* foi identificado em 36,8% (14) das amostras do antro gástrico; estando presente em 31,6% (12) dos indivíduos com gastrite ativa e em 5,3% (2) naqueles com gastrite não ativa. Já o gene *vacAm2* foi identificado em 52,6% (20) das amostras analisadas; sendo prevalente em 42,1% (16) dos indivíduos com gastrite ativa e em 10,5% (4) naqueles com gastrite não ativa ( $\chi^2 = 48,261$ ;  $p < 0,0001$ ). Tabela 25.

Tabela 25 - Distribuição das amostras com gastrite ativa e não ativa no antro gástrico em relação ao gene *vacAm* e seus alelos *vacAm1* e *vacAm2*

		Gastrite ativa no antro gástrico		Total
		Não	Sim	
	Negativo	0	4	4
		0,0%	10,5%	10,5%
<i>vacAm</i>	<i>vacAm1</i>	2	12	14
		5,3%	31,6%	36,8%
	<i>vacAm2</i>	4	16	20
		10,5%	42,1%	52,6%
Total		6	32	38
		15,8%	84,2%	100,0%

$p < 0,05$

Em relação ao gene *vacAs1*, ele foi encontrado em 50% (19) das amostras. Sua distribuição mostra-se prevalente entre os indivíduos com gastrite ativa, alcançando uma expressão de 42,1% (16), e apenas 7,9% (3) na forma não ativa. O gene *vacAs2* também estava presente 39,5% (15) das amostras, sendo que sua expressão alcançou 31,6% (12) entre os indivíduos com gastrite ativa e apenas 7,9% (3) na forma não ativa ( $\chi^2 = 48,286$ ;  $p < 0,0001$ ). Tabela 26..

Tabela 26 - Distribuição das amostras com gastrite ativa e não ativa no antro gástrico em relação ao gene *vacAs* e seus alelos *vacAs1* e *vacAs2*

		Gastrite ativa no antro gástrico		Total
		Não	Sim	
<i>vacAs</i>	Negativo	0 0,0%	4 10,5%	4 10,5%
	<i>vacAs1</i>	3 7,9%	16 42,1%	19 50,0%
	<i>vacAs2</i>	3 7,9%	12 31,6%	15 39,5%
	Total	6 15,8%	32 84,2%	38 100,0%

p<0,05

A expressão do gene *iceA* foi observada em 73,7% (28) das amostras analisadas com gastrite ativa do antro gástrico, distribuídos da seguinte forma: gene *iceA1* expressou em 28,9% (11) das amostras de antro gástrico com gastrite ativa e o gene *iceA2* em 44,7 (17) destes pacientes com a gastrite aguda no antro. Nos indivíduos sem gastrite ativa do antro e *H. pylori* presente, a expressão do gen *iceA2* também esteve presente em 15,8% (6) deles. Estes dados estão descritos na Tabela 27 ( $\chi^2 = 50,166$ ;  $p < 0,0001$ ).

Tabela 27 - Distribuição das amostras com gastrite ativa e não ativa no antro gástrico em relação ao gene *iceA* e suas variantes *iceA1* e *iceA2*

		Gastrite ativa no antro gástrico		Total
		Não	Sim	
<i>iceA</i>	<i>iceA1</i>	0 0,0%	11 28,9%	11 28,9%
	<i>iceA2</i>	6 15,8%	17 44,7%	23 60,5%
	Negativo	0 0,0%	4 10,5%	4 10,5%
	Total	6 15,8%	32 84,2%	38 100,0%

p< 0,05

A tabela 28 mostra que dentre os 38 pacientes estudados com a bactéria presente no antro gástrico, o gene *babA2* foi expresso em apenas 10,5% (4) das amostras; ressalta-se que sua distribuição foi presente somente em 7,9% (3) dos casos com gastrite ativa e presente em 2,6% (1) dos pacientes sem gastrite ativa no antro. Não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2 = 6,963$ ;  $p = 0,0731$ ).

Tabela 28 - Distribuição das amostras com gastrite ativa e não ativa no antro gástrico em relação ao gene *babA2*

		Gastrite ativa no antro gástrico		Total
		Não	Sim	
<i>babA2</i>	Negativo	5 13,2%	29 76,3%	34 89,5%
	Positivo	1 2,6%	3 7,9%	4 10,5%
Total		6 15,8%	32 84,2%	38 100,0%

$p > 0,05$



**6.7 Expressão gênica do *TLR-4*, *IL-8*, *CCL-2* e *CCR-2* em relação à positividade para os genes 16S *mRNA*, *cagA*, *vacAm*, *vacAs*, *iceA*, e *babA2* no antro gástrico.**

**6.7.1 Expressão gênica do *TLR-4* em relação à positividade para os genes 16S *mRNA*, *cagA*, *vacAm*, *vacAs*, *iceA*, e *babA2* no antro gástrico.**

Em todas as figuras descritas neste tópico, foram utilizados os seguintes testes estatísticos: testes Mann-Whitney (T) e Kruskal-Wallis (H) seguidos pelo pós-teste de Dunn para comparação entre 3 ou mais grupos.

A expressão do receptor *TLR-4* nas amostras positivas para os genes 16S (T = 392,500;  $p = 0,7249$ ), *cagA* (T = 273,000;  $p = 0,9004$ ), *vacAm1* e *vacAm2* (H = 0,208;  $p = 0,9011$ ), *vacAs1* e *vacAs2* (H = 0,018;  $p = 0,9910$ ), *iceA1* e *iceA2* (H = 2,541;  $p = 0,2806$ ), e *babA2* (T = 13,500;  $p = 0,3186$ ) não apresentaram diferença significativa entre os indivíduos estudados.. Figuras 24, 25, 26, 27, 25 e 28.

Figura 24- Expressão de *mRNA* para *TLR-4* por positividade para 16S

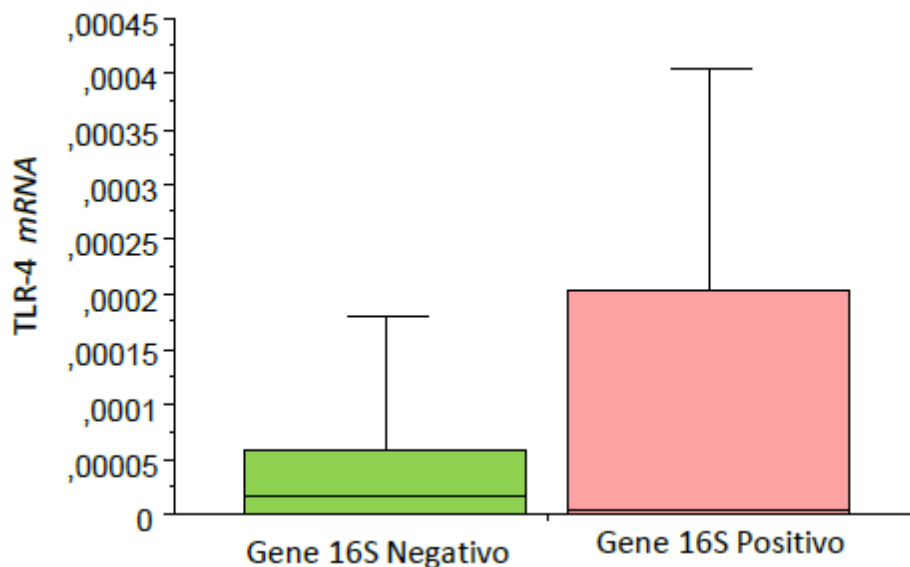


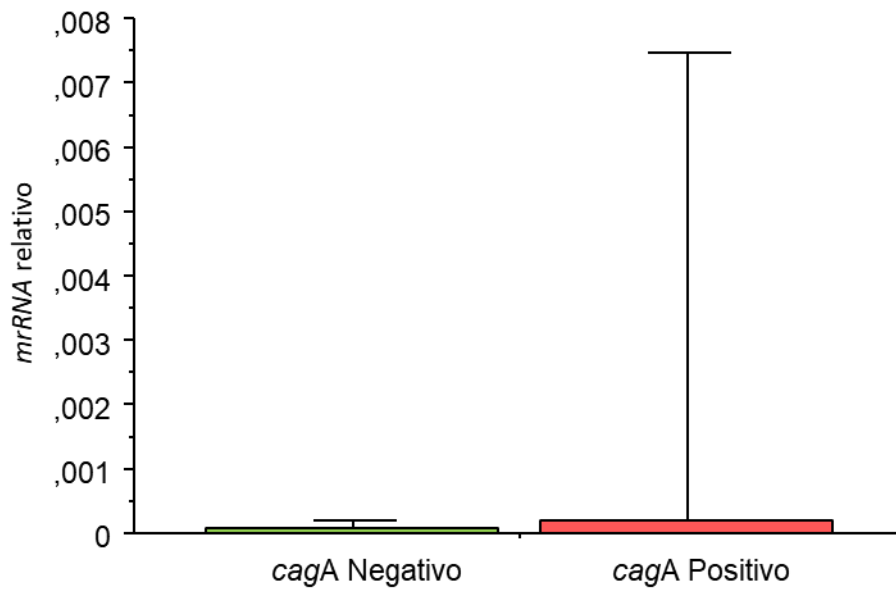
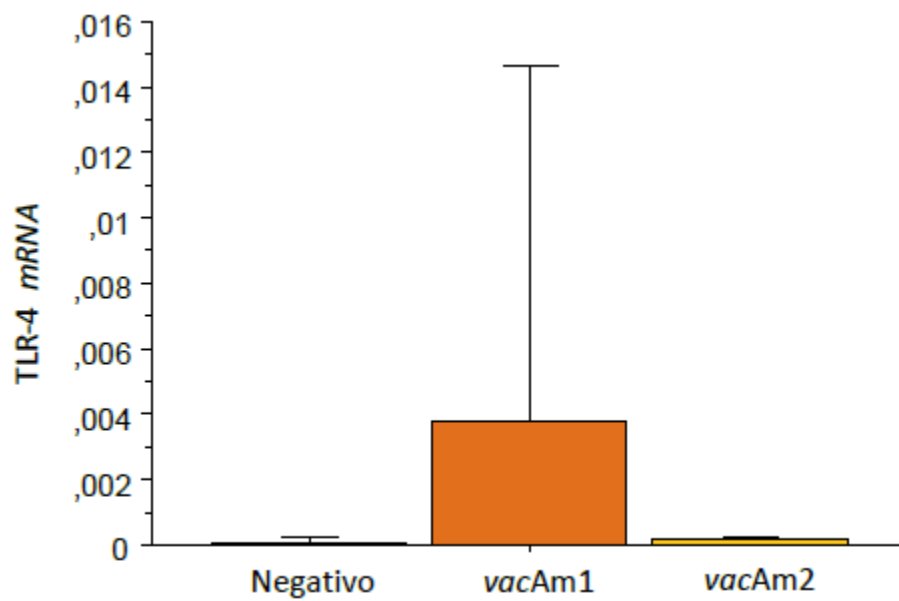
Figura 25 - Expressão de *mRNA* para *TLR-4* por positividade para *cagA*Figura 26 - Expressão de *mRNA* para *TLR-4* por positividade para *vacAm*

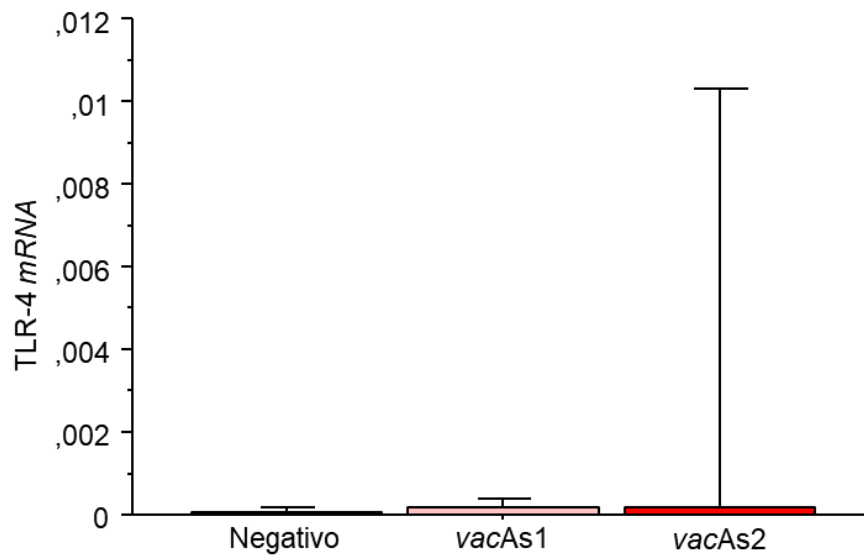
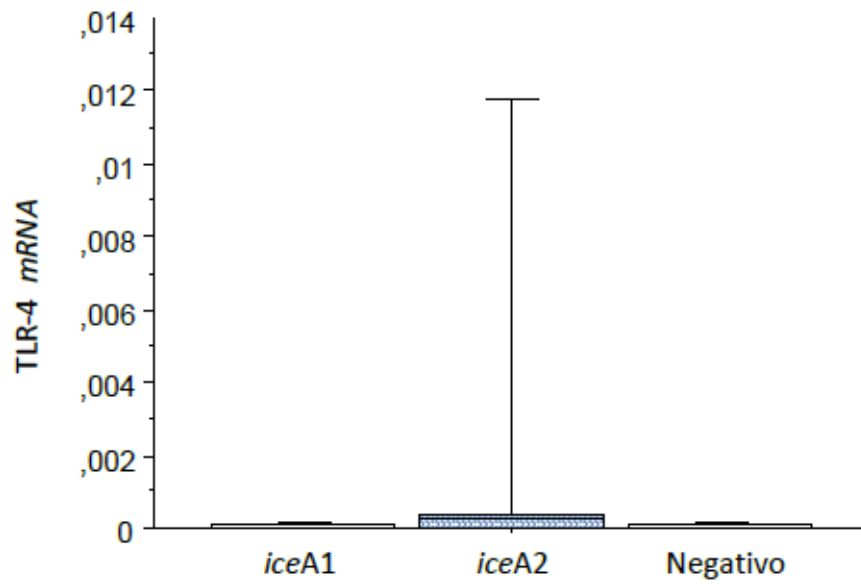
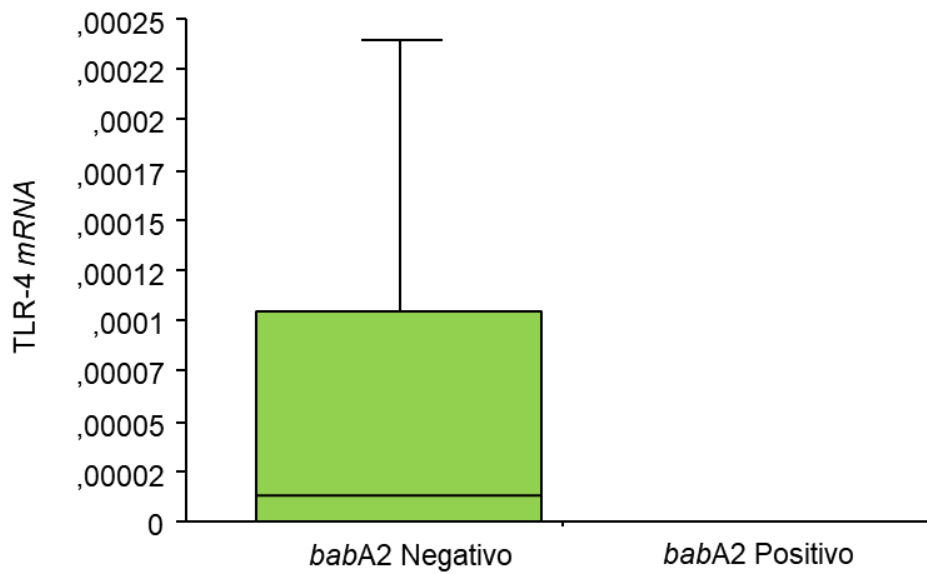
Figura 27 - Expressão de mRNA para *TLR-4* por positividade para *vacAs*Figura 28 - Expressão de mRNA para *TLR-4* por positividade para *iceA*

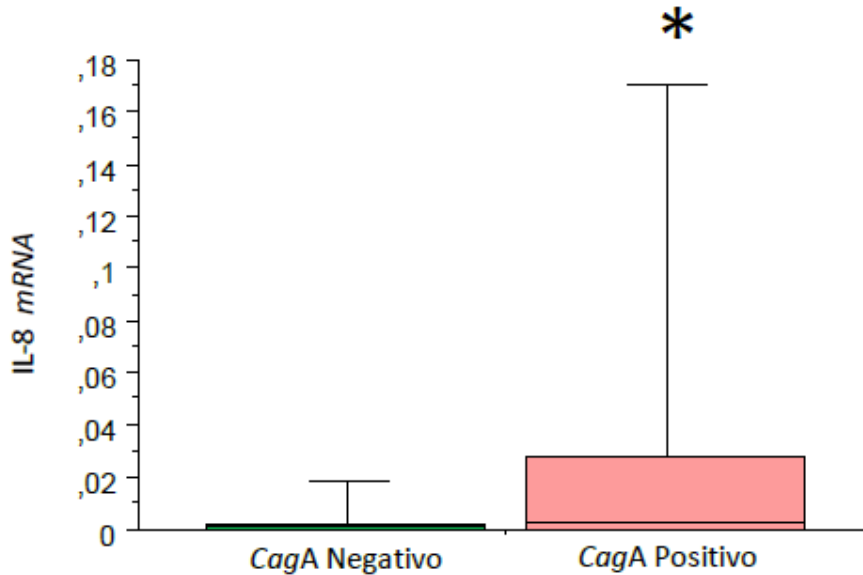
Figura 29 - Expressão de mRNA para *TLR-4* por positividade para *babA2*

### 6.7.2 Expressão gênica da *IL-8* em relação à positividade para os genes 16S *mRNA*, *cagA*, *vacAm*, *vacAs*, *iceA*, e *babA2* no antro gástrico.

Em todas as figuras descritas neste tópico, foram utilizados os seguintes testes estatísticos: testes Mann-Whitney (T) e Kruskal-Wallis (H) seguidos pelo pós-teste de Dunn para comparação entre 3 ou mais grupos.

A expressão da citocina *IL-8* foi significativamente maior nas amostras dos indivíduos *cagA* positivo, quando comparado as *cagA* negativas ( $T = 173,000$ ;  $p = 0,0488$ ). Figura 30.

Figura 30 - Expressão de mRNA para *IL-8* por positividade para *cagA*



Entretanto, a expressão de *IL-8* não apresentou diferença significativa nas amostras positivas para os genes 16S ( $T = 353,000$ ;  $p = 0,4211$ ), *vacAm1* e *vacAm2* ( $H = 3,458$ ;  $p = 0,1775$ ), *vacAs1* e *vacAs2* ( $H = 1,730$ ;  $p = 0,5014$ ), *iceA1* e *iceA2* ( $H = 1,125$ ;  $p = 0,5697$ ), e *babA* ( $T = 20,000$ ;  $p = 0,3186$ ) não apresentaram diferença significativa entre os indivíduos estudados. Figuras 31, 32, 33, 34 e 35.

Figura 31 - Expressão de mRNA para *IL-8* por positividade para 16S

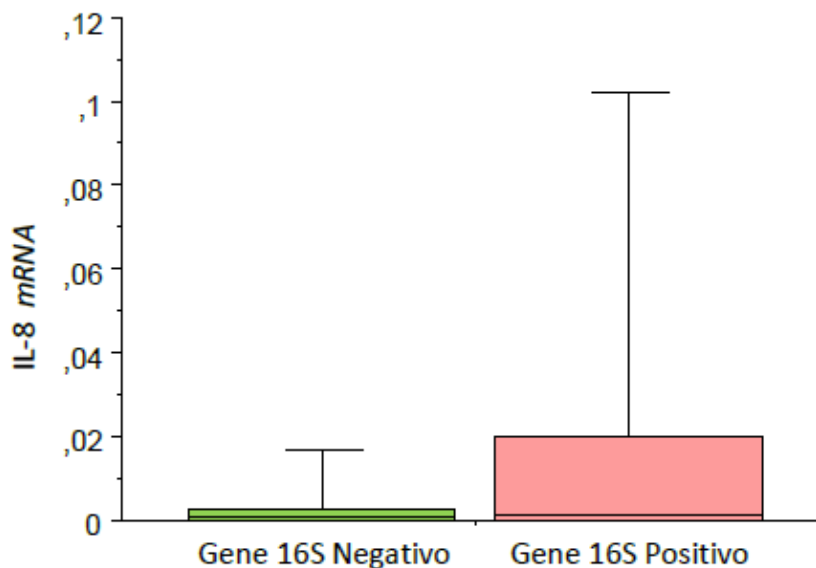


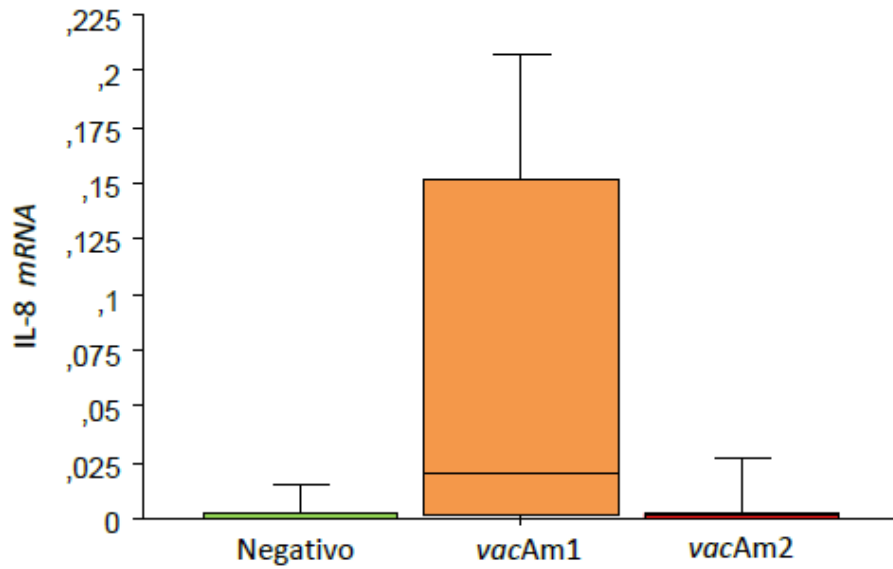
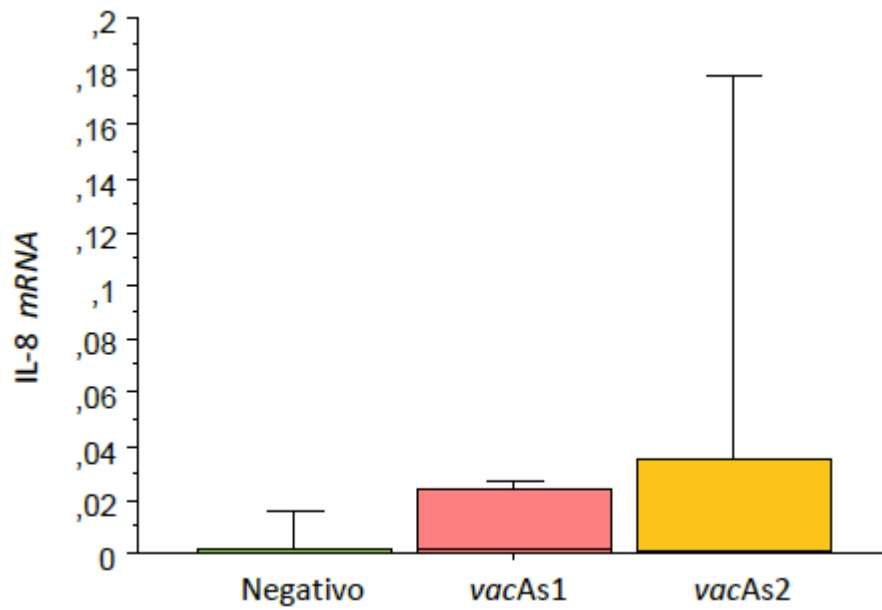
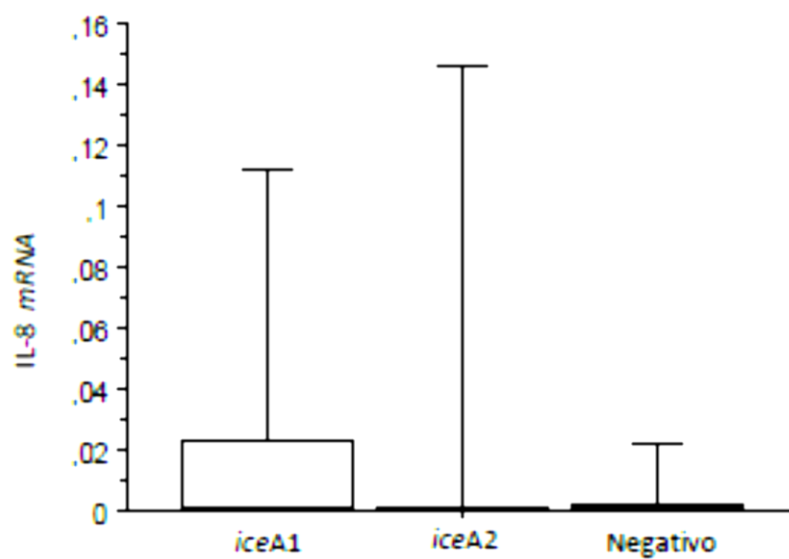
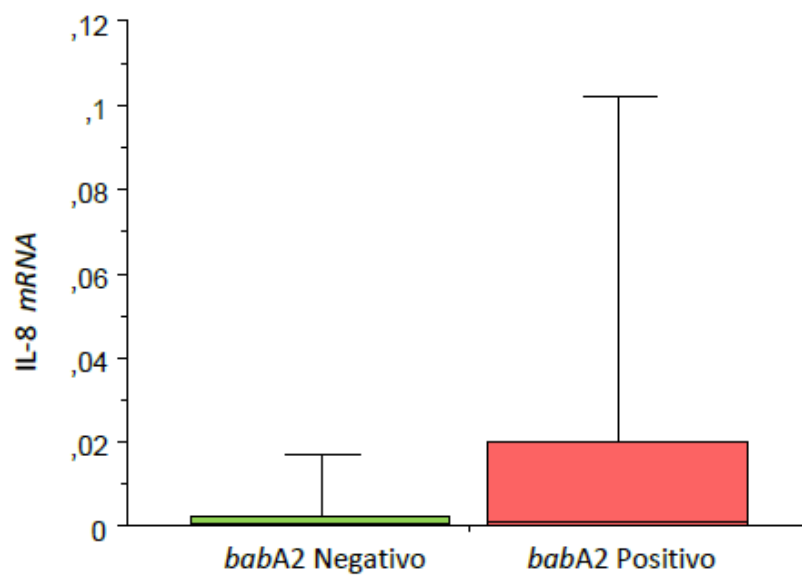
Figura 32 - Expressão de mRNA para *IL-8* por positividade para *vacAm*Figura 33 - Expressão de mRNA para *IL-8* por positividade para *vacAs*

Figura 34 - Expressão de mRNA para *IL-8* por positividade para *iceA*Figura 35 - Expressão de mRNA para *IL-8* por positividade para *babA2*

### 6.7.3 Expressão gênica do *CCL-2* em relação à positividade para os genes 16S *mRNA*, *cagA*, *vacAm*, *vacAs*, *iceA*, e *babA2* no antro gástrico.

Em todas as figuras descritas neste tópico, foram utilizados os seguintes testes estatísticos: testes Mann-Whitney (T) e Kruskal-Wallis (H) seguidos pelo pós-teste de Dunn para comparação entre 3 ou mais grupos.

A expressão da quimiocina *CCL-2* nas amostras positivas para os genes 16S (T = 440,500;  $p = 0,6430$ ), *cagA* (T = 260,500;  $p = 0,5565$ ), *vacAm1* e *vacAm2* (H = 0,066;  $p = 0,9678$ ), *vacAS1* e *vacAS2* (H = 0,255;  $p = 0,8805$ ), *iceA1* e *iceA2* (H = 0,483;  $p = 0,72853$ ), e *babA* (T = 11,000;  $p = 0,2482$ ) também não apresentaram diferença significativa entre os indivíduos estudados. Figuras 36, 37, 38, 39, 40 e 41.

Figura 36 - Expressão de *mRNA* para *CCL-2* por positividade para 16S

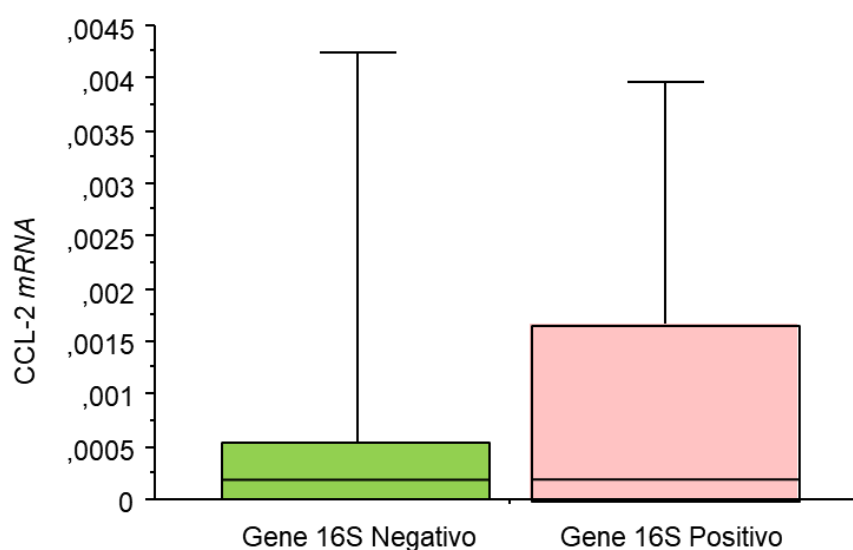




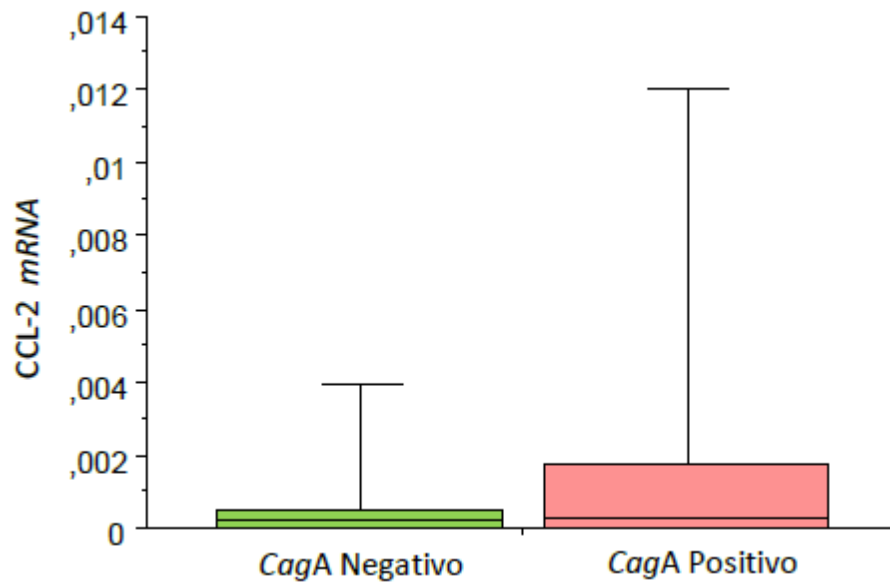
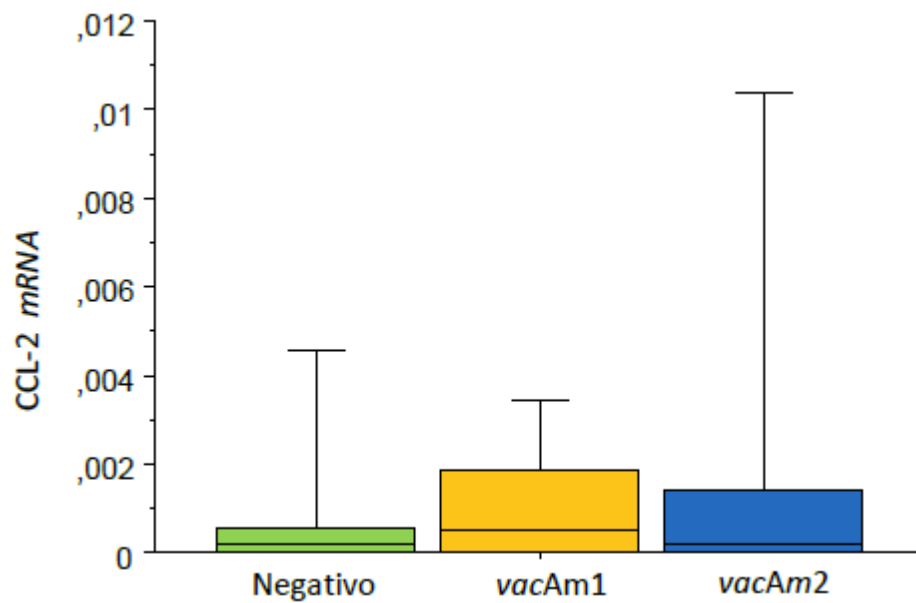
Figura 37 - Expressão de *mRNA* para *CCL-2* por positividade para *CagA*Figura 38 - Expressão de *mRNA* para *CCL-2* por positividade para *vacAm*

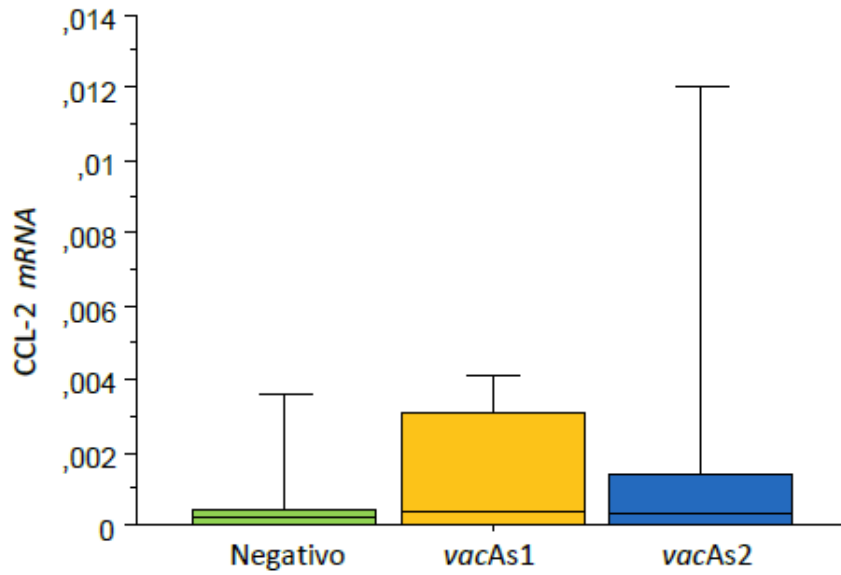
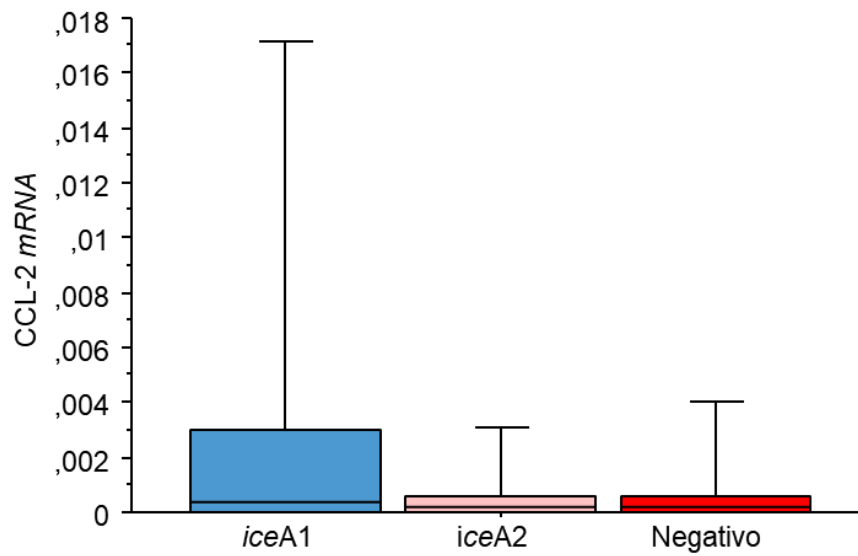
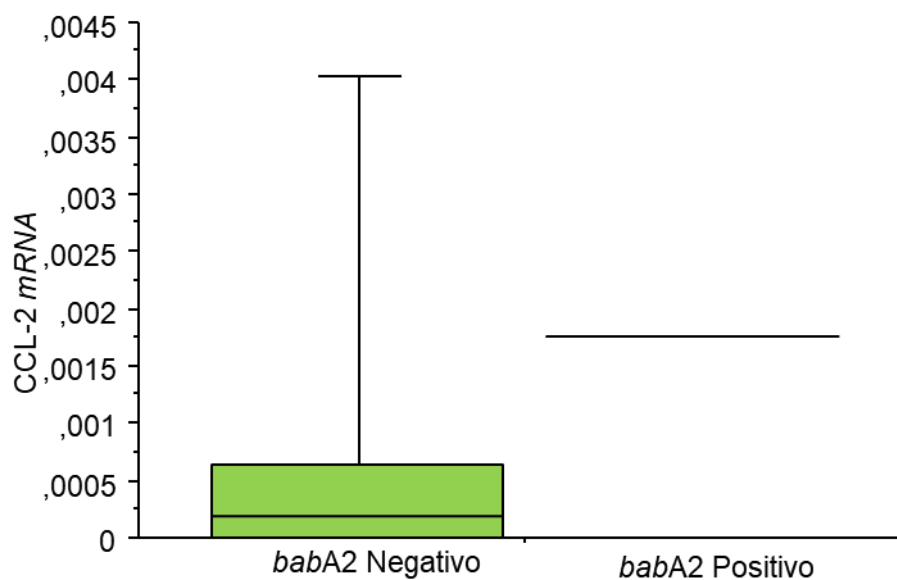
Figura 39 - Expressão de *mRNA* para *CCL-2* por positividade para *vacAs*Figura 40 - Expressão de *mRNA* para *CCL-2* por positividade para *iceA*

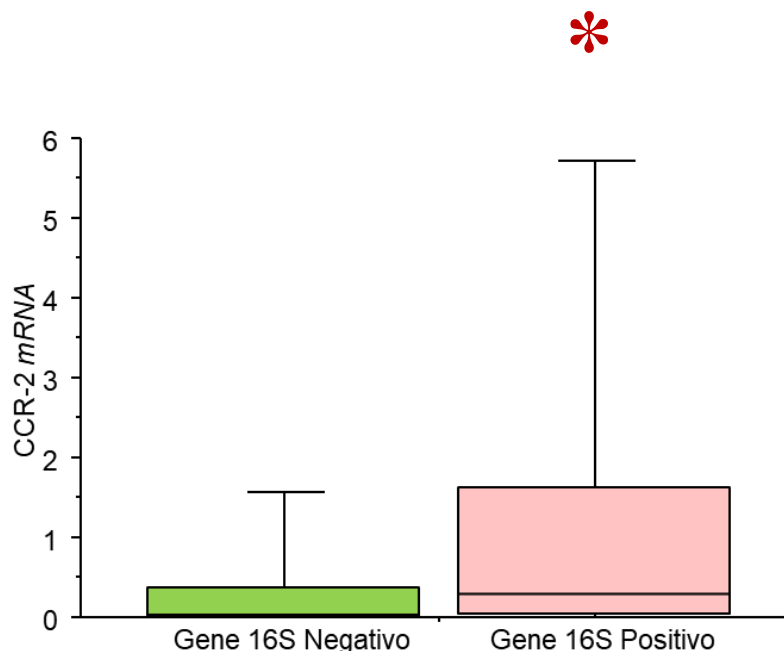
Figura 41 - Expressão de *mRNA* para *CCL-2* por positividade para *babA2*

#### 6.7.4 Expressão gênica do *CCR-2* em relação à positividade para os genes 16S *mRNA*, *cagA*, *vacAm*, *vacAs*, *iceA*, e *babA2* no antro gástrico.

Em todas as figuras descritas neste tópico, foram utilizados os seguintes testes estatísticos: testes Mann-Whitney (T) e Kruskal-Wallis (H) seguidos pelo pós-teste de Dunn para comparação entre 3 ou mais grupos.

A expressão do receptor *CCR-2* foi significativamente maior nas amostras dos indivíduos 16S positivo, quando comparado as 16S negativas ( $T = 304,500$ ;  $p = 0,0220$ ). Figura 42.

Figura 42 - Expressão de *mRNA* para *CCR-2* por positividade para 16S



Entretanto, a expressão de *CCR-2* não apresentou diferença significativa nas amostras positivas para os genes *cagA* ( $T = 193,500$ ;  $p = 0,0836$ ), *vacAm1* e *vacAm2* ( $H = 8,725$ ;  $p = 0,127$ ), *vacAS1* e *vacAS2* ( $H = 8,450$ ;  $p = 0,0146$ ), *iceA1* e *iceA2* ( $H = 3,953$ ;  $p = 0,1386$ ), e *babA* ( $T = 23,000$ ;  $p = 0,5807$ ) não apresentaram diferença significativa entre os indivíduos estudados. Em todas as figuras descritas a seguir foram utilizados os seguintes testes estatísticos: testes Mann-Whitney (T) e Kruskal-Wallis (H) seguidos pelo pós-teste de Dunn para comparação entre 3 ou mais grupos Figuras 43, 44, 45, 46 e 47

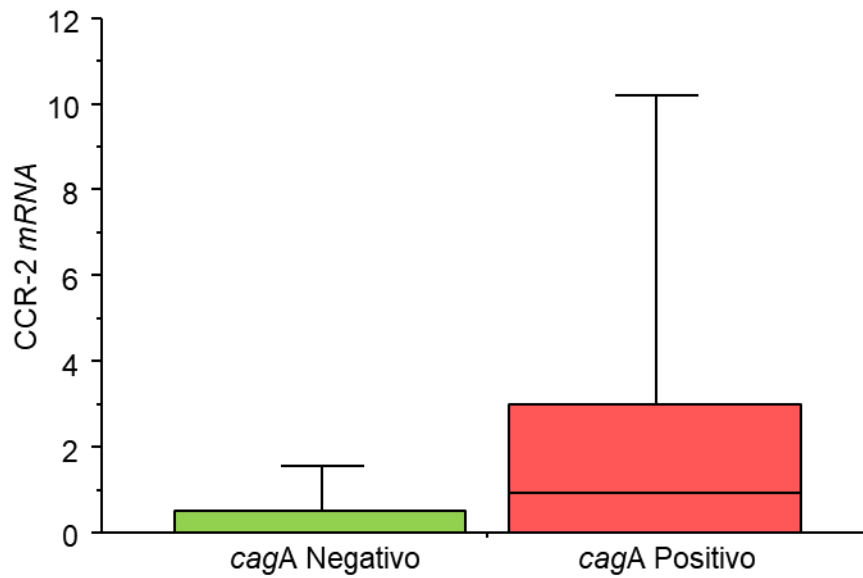
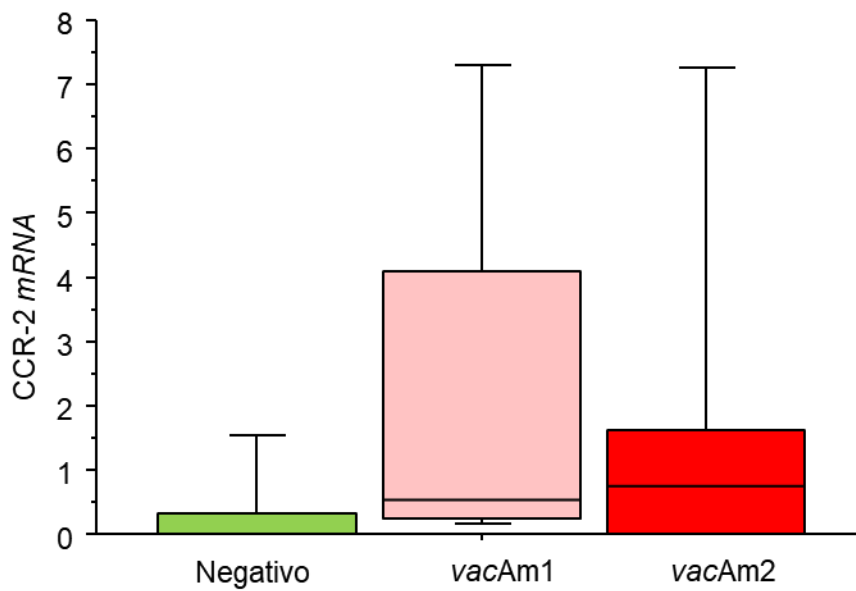
Figura 43 - Expressão de *mRNA* para *CCR-2* por positividade para *cagA*Figura 44 - Expressão de *mRNA* para *CCR-2* por positividade para *vacAm*

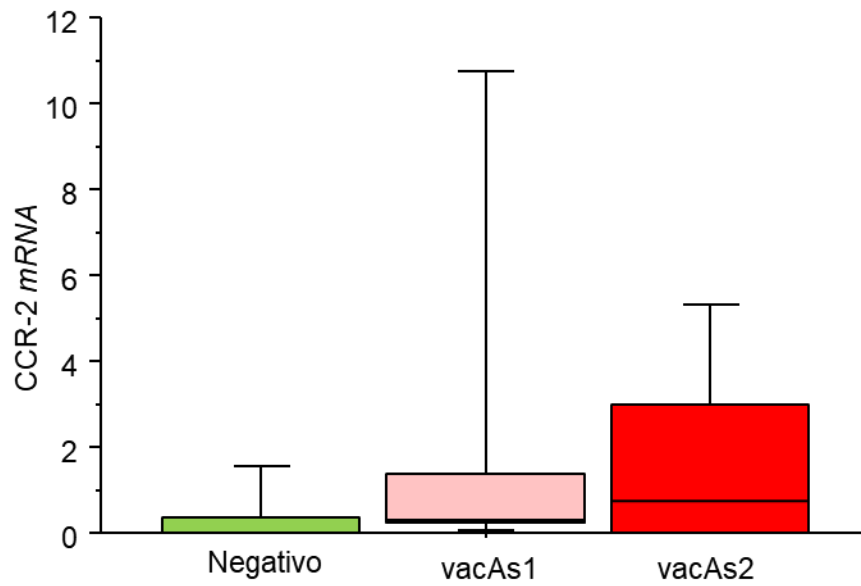
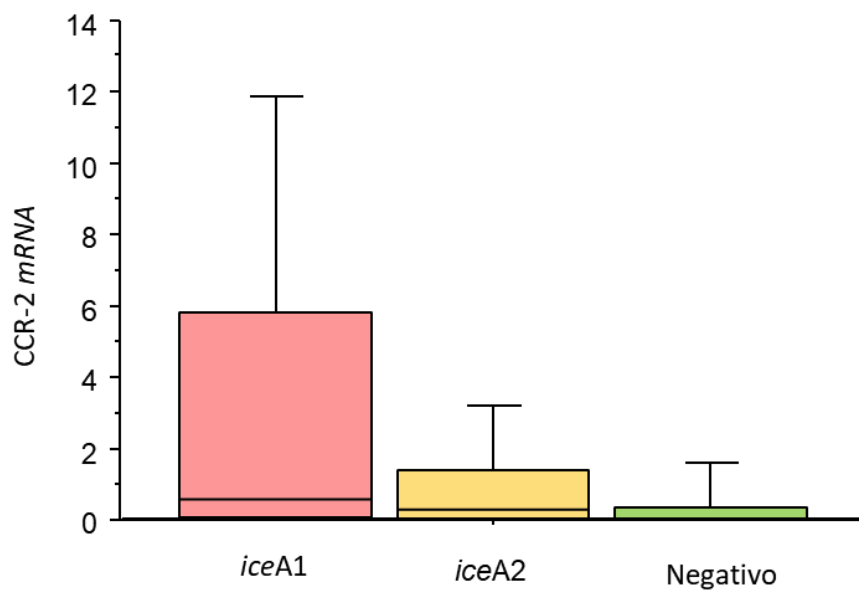
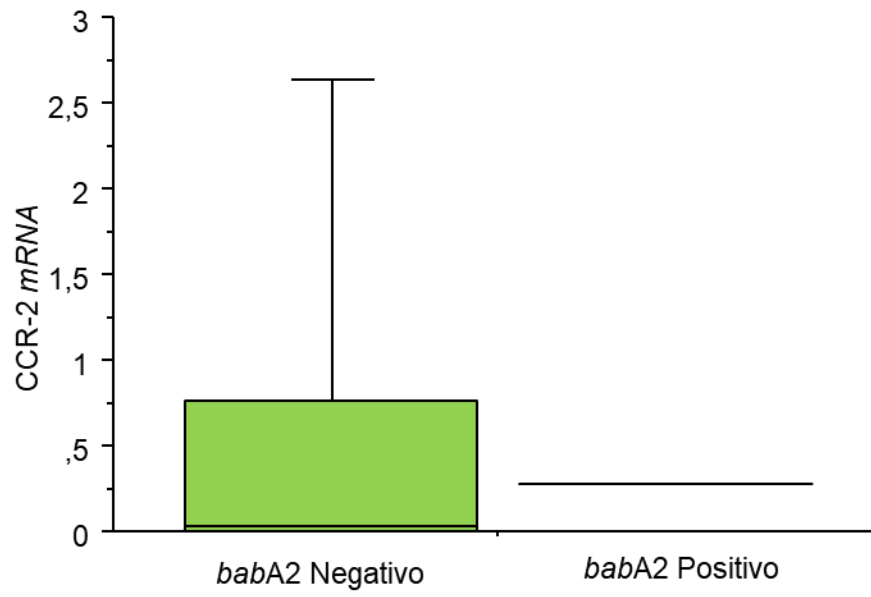
Figura 45 - Expressão de *mRNA* para *CCR-2* por positividade para *vacAs*Figura 46 - Expressão de *mRNA* para *CCR-2* por positividade para *iceA*

Figura 47 - Expressão de *mRNA* para *CCR-2* por positividade para *babA2*

***DISCUSSÃO***

---



## 7 DISCUSSÃO

*H. pylori* infecta atualmente aproximadamente metade da população mundial e esta bactéria é considerada como a principal causa de gastrite. A gastrite surge como uma resposta imune local contra a bactéria, porém a maioria dos pacientes se mostra assintomáticos, e isto foi bem evidenciado neste estudo, onde não conseguimos estabelecer nenhuma correspondência clínica como um dado preditivo para o diagnóstico do *H. pylori*, apesar de um minucioso questionário ter sido feito pelo médico entrevistador (HOOI et al., 2017).

Para a detecção do *H. pylori* nos 126 pacientes do presente estudo, foram utilizados três métodos diferentes: teste rápido da urease no antro gástrico realizado no momento do exame de endoscopia digestiva alta, exame anatomopatológico no corpo e antro gástrico para a pesquisa da bactéria e também realizou-se biologia molecular para pesquisa do gene 16S *rRNA*. Estas técnicas foram realizadas no intuito de evitar os chamados falsos-negativos, visto que não existe um único exame que seja considerado “ideal” para o diagnóstico de infecção pelo *H. pylori*. Desta forma, pode-se sugerir que neste estudo houve uma minimização nos pacientes *H. pylori* falsos negativos, o que o deixou bastante confiável (GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014).

Ainda com relação ao teste da urease, amplamente utilizados durante os exames de EDA é importante ressaltar que falsos negativos podem ser obtidos com este teste em razão da distribuição irregular da bactéria na mucosa gástrica, escassez da bactéria, devido ao uso recente de antimicrobianos ou inibidor de bomba protônica e até mesmo falsos positivos, se outros patógenos produtores de urease estiverem presentes na amostra coletada (BITTENCOURT et al., 2006).

Sabe-se que uma porcentagem de pacientes infectados pode evoluir para patologias mais graves no trato digestivo superior como a úlcera péptica, gastrite atrófica (precursora muitas vezes do câncer gástrico) e o linfoma tipo MALT, justificando assim a importância do diagnóstico correto, tipos de cepas bacterianas e o tratamento desta bactéria nos pacientes infectados (PEREIRA; MEDEIROS, 2014).

No Brasil a prevalência da infecção pelo *H. pylori* é bastante variada e depende muito da região pesquisada, sendo que, taxas mais elevadas são encontradas em regiões de nível socioeconômico mais baixo. Neste estudo foi evidenciada uma porcentagem para a presença da bactéria, através do EAP no antro gástrico, em 33,3 % dos pacientes examinados, isto é, 42 dos 126 estudados. Valor baixo para o Brasil, fato que pode ser explicado pela melhor

condição socioeconômica dos pacientes que foram procedentes da UFTM e de Clínica Particular (FRUGIS et al., 2016).

Baseando-se somente na anamnese, e em situações clínicas frequentes como dor epigástrica, pirose, tabagismo, etilismo, obesidade, e diabetes dentre outras, não foi obtido, neste estudo, uma prévia para o diagnóstico da bactéria. A dor epigástrica foi o sintoma mais frequente acometendo 105 (83,3%) pacientes, seguida pelo sintoma pirose que se manifestou em 86 (68,3%) pacientes, porém sem significância estatística. Não conseguimos estabelecer uma relação em o sexo masculino e feminino e a presença da bactéria no estômago.

Neste estudo concluímos que os pacientes que estavam fazendo uso de inibidores de bomba de prótons apresentaram uma negatividade maior para a presença da bactéria com importância estatística significativa, isto é, o uso de inibidores de bomba de prótons diminuiu a positividade da bactéria no estômago diagnosticado pelo EAP das biópsias do antro e corpo gástrico (MARSHALL, B.; TACHIBANA; LEVY, 1983).

O exame de endoscopia digestiva alta foi realizado em todos os 126 pacientes estudados e a conclusão do exame teve significância estatística diante da presença da bactéria no estômago. Dentre elas podemos citar o corpo e antro gástrico normal e ausência de *H. pylori* e a gastrite de corpo e antro gástrico e a presença da bactéria em cada região respectivamente.

Já se questionou no passado a associação da piora da esofagite de refluxo em alguns pacientes quando tratados da infecção pelo *H. pylori*. A explicação de tal fato se dá pela volta do aumento da secreção de ácido pelo estômago, e assim tornar o refluxo ácido gástrico para o esôfago mais agressivo, porém, no presente estudo esta associação não foi comprovada. A esofagite de refluxo esteve presente no exame de EDA em 29 (23%) pacientes e destes, um total de 25 (19,8%) não tiveram a presença da bactéria no antro gástrico. Já a normalidade do esôfago esteve em 97 (77,0%) pacientes e destes, 59 (46,8%) pacientes não tiveram a presença da bactéria diagnosticada (RIBEIRO et al., 2016).

No presente estudo, foram encontrados pacientes com gastrite crônica e sem evidência de infecção pelo *H. pylori*. De acordo com a literatura existem algumas explicações para este índice de negatividade, apesar de diferentes exames de detecção serem utilizados. Assim, o achado de gastrite crônica ativa sem a presença detectável de *H. pylori* parece estar em ascensão no ocidente e para isto são citados fatos que incluem antibioticoterapia para tratamento de outras infecções, uso generalizado de inibidores de bomba de prótons, amostragem inadequada da bactéria ou técnicas de colorações abaixo do ideal (GENTA; LASH, 2010; NORDENSTEDT et al., 2013).

A secreção gástrica é bastante influenciada pela infecção crônica do *H. pylori* e vai depender do grau e localização da gastrite e conseqüentemente com o tipo de doença no estômago. Sabe-se que em indivíduos com gastrite predominantemente antral pelo *H. pylori*, tem um aumento da secreção de ácido clorídrico e daí predispondo a formação de úlcera duodenal, enquanto que nos outros com gastrite predominantemente no corpo ou pangastrite, a secreção de ácido é diminuída, resultando em atrofia gástrica e assim estes indivíduos têm um risco aumentando de câncer gástrico (MCCOLL; EL-OMAR; GILLEN, 1998).

Quando nos exames anatomopatológicos dos pacientes estudados foi constatada a ausência de alterações no corpo do estômago, esta ausência de alterações mostrou uma relação direta com pacientes *H. pylori*-negativos. Foi observado que dos 59 (46,8%) pacientes que apresentaram o corpo do estômago normal ao exame anatomopatológico somente 1 (0,08%) paciente teve a positividade para o *H. pylori*. Quando a bactéria se mostrou presente no corpo gástrico, observou-se que a densidade de infecção mais encontrada do *H. pylori* em relação às alterações histopatológicas foi de forma “moderada”, atingindo 24 (19,0%) pacientes dos 67 (53,2%) pacientes com alterações histopatológicas no corpo gástrico. Já no antro gástrico, todos os 27 (21,4%) pacientes com antro gástrico normal tiveram a ausência da bactéria no mesmo. Dos 99 (79,6%) pacientes com alterações histopatológicas, 57 (45,2%) pacientes tiveram a presença da bactéria no mesmo (ÁLVARES et al., 2006).

Ainda nos exames anatomopatológicos realizados neste estudo, podemos observar que dos 126 pacientes estudados, 62 (49,2%) não apresentaram gastrite crônica no corpo gástrico e dentre eles nenhum apresentou a infecção pelo *H. pylori*, enquanto que os pacientes que tiveram gastrite crônica presente foram 64 (50,7%) e o tipo de atividade mais encontrada foi a discreta com 48 (38,09%) pacientes, e a densidade de infecção pelo *H. pylori* predominante foi a moderada com 24 (19,0%) pacientes infectados. Mostrando assim uma íntima relação da bactéria com a gastrite crônica do corpo gástrico (ÁLVARES et al., 2006).

A gastrite acometeu maior percentual de indivíduos com a forma ativa da doença. Seja no corpo ou antro gástrico, as lesões mostram-se associadas à presença da bactéria em mais de 70% dos casos. Análises de biópsias da mucosa gástrica relatam positividade para *H. pylori* em cerca de 60% dos indivíduos com gastrite crônica, sendo a frequência de colonização independente da região gástrica (AGBOR et al., 2018; CARRILHO et al., 2009).

Os pacientes estudados neste trabalho mostraram uma associação direta com a normalidade e ausência de infecção do *H. pylori* e associação de gastrite ativa tanto em corpo quanto em antro gástrico quando a bactéria está presente. Alguns fatores de virulência do *H. pylori* têm sido associados com diferentes doenças resultantes da infecção crônica da bactéria, conforme demonstrado neste estudo. Pesquisas têm demonstrado diferenças regionais na distribuição da presença do gene *cagA* em amostras de *H. pylori* e sua associação com o desenvolvimento de doenças gastrointestinais (MARTINS et al., 2005; ZHENG et al., 2000).

A prevalência de amostras *cagA*-positivas varia de uma região geográfica para outra. Em países orientais como China e Japão, praticamente todas as amostras de *H. pylori* são *cagA*-positivas enquanto que em países como Estados Unidos e Brasil, as amostras *cagA* tem sido mais frequentemente encontradas em pacientes com úlcera (ASHOUR et al., 2002). Outros estudos tem demonstrado alta positividade para o gene *cagA* em amostras de *H. pylori* obtidas de pacientes com gastrite, úlcera péptica e câncer gástrico (CAVALCANTE et al., 2012).

Interessante observar que uma baixa prevalência do gene *cagA* foi detectada em uma população do sudeste Asiático, onde apenas 39,5% dos pacientes com úlcera estavam infectados por amostras de *H. pylori cagA*-positivas e nenhuma associação com câncer gástrico e úlcera gástrica foi encontrada (AMJAD; OSMAN; RAZAK; KASSIAN; DIN; BIN ABDULLAH, 2010).

Neste estudo foi observada a prevalência do gênero feminino, de não tabagista e idade média de 44 anos. A literatura destaca achados semelhantes (CADAMURO et al., 2015; YAKUT et al., 2013), ressaltando maior incidência da infecção pelo *H. pylori* com a progressão da idade e menor nível socioeconômico (WOODWARD, M. ; MORRISON, C. ; MCCOLL, K., 2000).

A expressão gênica do *H. pylori* em mais de 30% dos casos com gastrite, também embasam os referidos achados, uma vez que se reconhece a infecção bacteriana como fator importante na etiopatogênese de diferentes afecções gástricas (AGBOR et al., 2018; MCCOLL, 2010). A presença do *cagA*, seus sítios de fosforilação *cagA* EPIYA, *vacAm2* e *vacAs1* em quase 56% dos indivíduos *H. pylori* positivo, seguido pelo *vacAm1* e *vacAs2* presente em cerca de 38% dos casos, demonstram a alta prevalência desses fatores de virulência associados aos diferentes graus de repercussão desta doença (ABU-TALEB et al., 20018; WANG et al., 2007).

Entre os indivíduos *H. pylori* positivos a maioria dos fatores de virulência mostram-se associados à gastrite ativa. Pesquisa relata expressão significativa de *cagA*, *vacAs1* e *babA2* na gastrite antral. Inflamação antral, maior densidade bacteriana e metaplasia, são relacionados aos alelos *cagA*, *vacAm1* e *s1* (ZAMBON et al., 2003). A literatura aponta entre 33-70% na expressão de *cagA* (ABU-TALEB et al., 20018; DABIRI et al., 2017; SHIOTA et al., 2014); 84% de *cagA* EPIYA ABCC (SHIOTA et al., 2014); 24-72% de *vacAm1*; 27-60% de *vacAm2*; 54-76% d; 23-35% de *vacAs2* e *vacAs1* (SEDAGHAT et al., 2014; SHIOTA et al., 2014); 26-48% de *iceA1* e 12-16% de *iceA2* (ABU-TALEB et al., 20018) na gastrite. Deste modo, nossos resultados mostram-se de acordo com os estudos.

A expressão do *TLR-4* não apresentou diferença em relação à presença dos diferentes fatores de virulência associados à *H. pylori*. A literatura demonstra que indivíduos *H. pylori* positivo apresentam maior expressão de *mRNA* do *TLR-4* e *MD-2* no antro gástrico, em relação aos *H. pylori* negativos (ISHIHARA et al., 2004). Entretanto, pesquisas apontam não haver diferenças da expressão do *mRNA* do *TLR-4* na gastrite crônica ou após a erradicação da bactéria (CADAMURO et al., 2015). A presença dos genótipos *cagA* (CADAMURO et al., 2015), *vacAs1*, *vacAs2*, *vacAm* (CADAMURO et al., 2015; GARZA-GONZALEZ et al., 2008) ou *babA2* também não alteraram a expressão do receptor na mucosa gástrica. Demonstrando que a expressão do *TLR-4* parece ser independente da infecção do *H. pylori*, assim como dos seus fatores de virulência.

Já a expressão de *IL-8* foi maior nos indivíduos com gastrite *cagA* positivos. Achados semelhantes são relatados em outros estudos (FAZELI et al., 2016; FERREIRA et al., 2016; KIM et al., 2006; PAPADAKOS et al., 2013). Células do epitélio gástrico infectadas com *H. pylori*, apontaram aumento significativo na indução da síntese de *IL-8* pelas cepas *CagA* EPIYA (ABCCC, ABCC e ABC) (FAZELI et al., 2016; PAPADAKOS et al., 2013); sendo a síntese de *IL-8* pela cepa ABCCC 50 vezes maior em relação as demais. Estes resultados apontam que fosforilação do *CagA*, tipo EPIYA-C favorece a secreção de *IL-8* pelas células epiteliais gástricas (PAPADAKOS et al., 2013).

A literatura também aponta significativa correlação entre os níveis aumentados de *IL-8*, *IL-1 $\beta$* , *COX-2* e a expressão não só de *cagA*, mas também de *vacAs1* (BARTCHEWSKY et al., 2009; SIDDIQUE et al., 2014) na gastrite crônica; em contrapartida, redução da síntese dessa citocina pela mucosa gástrica na expressão de *vacAs2* nos indivíduos com úlcera péptica (SIDDIQUE et al., 2014). O gene *iceA* parece contribuir para a patogenicidade do *H. pylori* por meio da secreção de *IL-8*, uma vez que a presença de mutações no gene reduziu a síntese dessa citocina pelas células epiteliais gástricas (MA et al., 2010). Ressalta-se ainda

que as cepas de *H. pylori iceA1* positivas foram significativamente associadas com o desenvolvimento de úlcera péptica e maior concentração de *IL-8* (PEEK et al., 1998). O gene *babA2*, por sua vez, parece não interferir no aumento da concentração de *IL-8* nesta infecção bacteriana (ISHIJIMA et al., 2011). Estes achados demonstram que a cepa de *H. pylori* parece definir o perfil da resposta inflamatória na gastrite e, conseqüentemente, o grau de acometimento da lesão gástrica nestes indivíduos.

A expressão da *CCL-2* não foi alterada pelos fatores de virulência avaliados neste estudo. A literatura aponta que infecção pelo *H. pylori* induz a síntese de diferentes quimiocinas pró-inflamatórias (ex.: *CCL2*, *CCL5*, *CXCL9* e *CXCL11*) pelas células do epitélio gástrico (NAGY et al., 2011; SEO et al., 2004). Pesquisa experimental realizada com a cepa HP 99 (isolada da mucosa gástrica antral de um indivíduo com úlcera duodenal e *cagA*, *vacA* s1, m2, *iceA1* positivos) destacou a maior expressão de mRNA e proteínas de *CCL-2* pelas células infectadas pelo *H. pylori*, associada a ativação das vias *NF-κB* e *AP-1*, e maior fosforilação de *ERK1/2*, *JNK2/1* e p38 (SEO et al., 2004). Entretanto, células da linhagem MKN28 infectadas com *H. pylori vacA* negativo, também apresentaram níveis de *CCL-2* e GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos) significativamente aumentados; enquanto aquelas *cagA* negativo não apresentaram diferença de concentração em relação às células infectadas com cepas wild-type (células tipo selvagem) (NAGY et al., 2011). Assim, a síntese de *CCL-2* mostra-se independente dos fatores de virulência.

A expressão de *CCR-2* foi maior nos indivíduos *H. pylori* positivo. Segundo pesquisas, a expressão do *CCR-2* mostra-se três vezes maior 24 horas após a infecção pelo *H. pylori* (FUTAGAMI et al., 2006; SUN et al., 2017), contribuindo para o recrutamento e maturação de células dendríticas, equilíbrio do balanço dos linfócitos Treg/Th17 e, conseqüentemente, a tolerância contra a infecção (SUN et al., 2017). Entretanto, as bactérias *cagA* positivo ou *cagA* negativo induzem o aumento do mRNA do *CCR-2* (FUTAGAMI et al., 2006). Deste modo, nossos achados parecem estar de acordo aos de outros estudos. A infecção pelo *H. pylori* está associada à etiopatogênese da gastrite. Os achados deste estudo reforçam esta hipótese, uma vez que as alterações inflamatórias foram prevalentes entre os indivíduos *H. pylori* positivo e diagnosticado com a forma ativa da doença.

Portanto, os fatores de virulência *cagA*, *CagA EPIYA*, *vacAm1*, *vacAm2*, *vacAs1*, *vacAs2*, *iceA1* e *iceA2*, foram significativamente expressos na gastrite ativa; reiterando que a expressão gênica desses fatores contribui para o agravamento da inflamação nesta população avaliada.

## ***CONCLUSÕES***

---

## 8 CONCLUSÕES

- Infecção por *H. pylori* não mostrou nenhum fator clínico preditivo de infecção.
- No exame de EDA, destacaram-se dados do laudo do exame como sugestivos para presença de provável infecção da bactéria.
- O uso de IBPs deverá ser suspenso por pelo menos duas semanas antes da EDA para evitarmos falsos negativos da presença do *H. pylori* no estômago.
- O exame anatomopatológico mostrou-se necessário para classificar as diferentes gastrites e/ou alterações histopatológicas provocadas pela bactéria.
- O estudo da presença do gene *cagA* e os sítios de fosforização CagA EPIYA são importantes, porém ainda estão aquém dos exames de rotina na prática diária.
- Indivíduos *H. pylori* e *cagA* positivo apresentam maior expressão de *IL-8* e *CCR-2* no antro da mucosa gástrica, sugerindo assim, que estas moléculas podem estar associadas a exacerbação da resposta imune e agravamento das lesões no antro gástrico.



***REFERÊNCIAS***

---

## 9 REFERÊNCIAS

ABU-TALEB, A. M. F. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* cagA and iceA genes and their association with gastrointestinal diseases. **Int J Microbiol**, v. 2018, n. 4809093, p. 1-7, 20018.

AGBOR, N. E. et al. *Helicobacter pylori* in patients with gastritis in West Cameroon: prevalence and risk factors for infection. **BMC Res Notes**, v. 11, n. 1, p. 559, Aug 3 2018.

ALLAKER, R. P. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. **J Med Microbiol**, v. 51, n. 4, p. 312-7, Apr 2002.

ÁLVARES, M. M. D. et al. Características da gastrite crônica associada a *Helicobacter pylori*: aspectos topográficos, doenças associadas e correlação com o status cagA. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 51-59, 2006.

AMIEVA, M. R.; EL-OMAR, E. M. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology**, v. 134, n. 1, p. 306-23, Jan 2008.

AMJAD, N. et al. Clinical significance of *Helicobacter pylori* cagA and iceA genotype status. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 35, p. 4443-7, Sep 21 2010.

ASAHI, M. et al. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. **J Exp Med**, v. 191, n. 4, p. 593-602, Feb 21 2000.

ASHOUR, A. A. et al. Distribution of vacA genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 33, n. 3, p. 173-8, Jul 12 2002.

ATHERTON, J. C. et al. Vacuolating cytotoxin (vacA) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types, m1 and m2, and have evolved through limited recombination. **Curr Microbiol**, v. 39, n. 4, p. 211-8, Oct 1999.

BARTCHEWSKY, W., JR. et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection on IL-8, IL-1beta and COX-2 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. **Scand J Gastroenterol**, v. 44, n. 2, p. 153-61, 2009.

BATISTA, S. A. et al. Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. **BMC Microbiol**, v. 11, p. 61, 2011.

BHUIYAN, T. R. et al. Th1 and Th17 Responses to *Helicobacter pylori* in Bangladeshi Infants, Children and Adults. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93943, 2014.

BITTENCOURT, P. F. et al. Gastroduodenal peptic ulcer and *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. **J Pediatr (Rio J)**, v. 82, n. 5, p. 325-34, Sep-Oct 2006.

BLASER, M. J.; ATHERTON, J. C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **J Clin Invest**, v. 113, n. 3, p. 321-33, Feb 2004.

CADAMURO, A. C. et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on TLR2 and TLR4 expression in patients with gastric lesions. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 481972, 2015.

CANER, V. et al. *H. pylori* iceA alleles are disease-specific virulence factors. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 18, p. 2581-5, May 14 2007.

CARRILHO, C. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection, chronic gastritis, and intestinal metaplasia in Mozambican dyspeptic patients. **Virchows Arch**, v. 454, n. 2, p. 153-60, Feb 2009.

CAVALCANTE, M. Q. et al. *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 561-3, Jun 2012.

CENSINI, S. et al. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 25, p. 14648-53, Dec 10 1996.

CHEY, W. D.; WONG, B. C.; PRACTICE PARAMETERS COMMITTEE OF THE AMERICAN COLLEGE OF, G. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. **Am J Gastroenterol**, v. 102, n. 8, p. 1808-25, Aug 2007.

COVER, T. L.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention. **Adv Intern Med**, v. 41, p. 85-117, 1996.

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. 603-10, Mar 1990.

CRABTREE, J. E. et al. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. **Lancet**, v. 338, n. 8763, p. 332-5, Aug 10 1991.

DABIRI, H. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, oipA, iceA, babA2 and babB genotypes in Iranian dyspeptic patients. **Microb Pathog**, v. 105, p. 226-230, Apr 2017.

DIXON, M. F. et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. **Am J Surg Pathol**, v. 20, n. 10, p. 1161-81, Oct 1996.

DOWSETT, S. A.; KOWOLIK, M. J. Oral *Helicobacter pylori*: can we stomach it? **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14, n. 3, p. 226-33, 2003.

EVERHART, J. E. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 29, n. 3, p. 559-78, Sep 2000.

FAZELI, Z. et al. *Helicobacter pylori* CagA induced interleukin-8 secretion in gastric epithelial cells. **Gastroenterol Hepatol Bed Bench**, v. 9, n. Suppl1, p. S42-S46, Dec 2016.

FERREIRA, R. M. et al. *Helicobacter pylori* cagA Promoter Region Sequences Influence CagA Expression and Interleukin 8 Secretion. **J Infect Dis**, v. 213, n. 4, p. 669-73, Feb 15 2016.

FRUGIS, S. et al. PREVALENCE OF *HELICOBACTER PYLORI* TEN YEARS AGO COMPARED TO THE CURRENT PREVALENCE IN PATIENTS UNDERGOING UPPER ENDOSCOPY. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 29, p. 151-154, 2016.

FUTAGAMI, S. et al.  $\gamma$ delta T cells increase with gastric mucosal interleukin (IL)-7, IL-1 $\beta$ , and *Helicobacter pylori* urease specific immunoglobulin levels via CCR2 upregulation in *Helicobacter pylori* gastritis. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 21, n. 1 Pt 1, p. 32-40, Jan 2006.

GARZA-GONZALEZ, E. et al. mRNA levels of TLR4 and TLR5 are independent of *H pylori*. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 34, p. 5306-10, Sep 14 2008.

GARZA-GONZÁLEZ, E. et al. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 6, p. 1438-49, Feb 14 2014.

GATTI, L. L. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* cagA, iceA and babA2 alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. **Acta Trop**, v. 100, n. 3, p. 232-40, Dec 2006.

GENTA, R. M.; LASH, R. H. Helicobacter pylori-negative gastritis: seek, yet ye shall not always find. **Am J Surg Pathol**, v. 34, n. 8, p. e25-34, Aug 2010.

GERHARD, M. et al. Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 22, p. 12778-83, Oct 26 1999.

GOODWIN, C. S. Campylobacter pylori becomes Helicobacter pylori. **Lancet**, v. 2, n. 8670, p. 1019-20, Oct 28 1989.

GOODWIN, C. S. et al. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (Campylobacter pyloridis) from the human gastric mucosa. **J Med Microbiol**, v. 19, n. 2, p. 257-67, Apr 1985.

GRUBEL, P. et al. Vector potential of houseflies (Musca domestica) for Helicobacter pylori. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 6, p. 1300-3, Jun 1997.

HATAKEYAMA, M. Helicobacter pylori CagA -- a bacterial intruder conspiring gastric carcinogenesis. **Int J Cancer**, v. 119, n. 6, p. 1217-23, Sep 15 2006.

HATAKEYAMA, M. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. **J Gastroenterol**, v. 44, n. 4, p. 239-48, 2009.

HOCKER, M.; HOHENBERGER, P. Helicobacter pylori virulence factors--one part of a big picture. **Lancet**, v. 362, n. 9391, p. 1231-3, Oct 11 2003.

HOOI, J. K. Y. et al. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. **Gastroenterology**, v. 153, n. 2, p. 420-429, Aug 2017.

ISHIHARA, S. et al. Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during Helicobacter pylori-associated gastritis. **J Immunol**, v. 173, n. 2, p. 1406-16, Jul 15 2004.

ISHIJIMA, N. et al. BabA-mediated adherence is a potentiator of the Helicobacter pylori type IV secretion system activity. **J Biol Chem** v. 286, n. 28, p. 25256-64, 2011.

JONES, K. R.; WHITMIRE, J. M.; MERRELL, D. S. A Tale of Two Toxins: Helicobacter Pylori CagA and VacA Modulate Host Pathways that Impact Disease. **Front Microbiol**, v. 1, p. 115, 2010.

KABIR, S. The role of interleukin-17 in the Helicobacter pylori induced infection and immunity. **Helicobacter**, v. 16, n. 1, p. 1-8, Feb 2011.

KAO, C. Y.; SHEU, B. S.; WU, J. J. Helicobacter pylori infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. **Biomed J**, v. 39, n. 1, p. 14-23, Feb 2016.

KELLY, S. M. et al. Isolation of Helicobacter pylori from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. **Gastroenterology**, v. 107, n. 6, p. 1671-4, Dec 1994.

KHAMRI, W. et al. Helicobacter pylori Stimulates Dendritic Cells To Induce Interleukin-17 Expression from CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 2, p. 845-853, 2010.

KIM, S. Y. et al. Helicobacter pylori CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 97-106, Jan 2006.

KUSTERS, J. G.; VAN VLIET, A. H.; KUIPERS, E. J. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 3, p. 449-90, Jul 2006.

LI, H. et al. Serum Helicobacter pylori FliD antibody and the risk of gastric cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 16, p. 22397-408, Apr 19 2016.

MA, Y. J. et al. Mutation of iceA in Helicobacter pylori compromised IL-8 induction from human gastric epithelial cells. **J Basic Microbiol**, v. 50 Suppl 1, p. S83-8, Dec 2010.

MAEDA, S.; MENTIS, A. F. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter**, v. 12 Suppl 1, p. 10-4, Oct 2007.

MARSHALL, B. Helicobacter pylori: 20 years on. **Clin Med**, v. 2, n. 2, p. 147-52, Mar-Apr 2002.

MARSHALL, B.; TACHIBANA, C.; LEVY, S. B. Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose-fermenting coliforms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 24, n. 6, p. 835-40, Dec 1983.

MARSHALL, B. J. et al. Urea protects Helicobacter (Campylobacter) pylori from the bactericidal effect of acid. **Gastroenterology**, v. 99, n. 3, p. 697-702, Sep 1990.

MARTINS, L. C. et al. 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. 875-81, Dec 2005.

MCCOLL, K. E. Clinical practice. Helicobacter pylori infection. **N Engl J Med**, v. 362, n. 17, p. 1597-604, Apr 29 2010.

MCCOLL, K. E.; EL-OMAR, E.; GILLEN, D. Interactions between *H. pylori* infection, gastric acid secretion and anti-secretory therapy. **Br Med Bull**, v. 54, n. 1, p. 121-38, 1998.

MCGEE, D. J.; MOBLEY, H. L. Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: bacterial factors. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 241, p. 155-80, 1999.

MENG, W. et al. Role of *Helicobacter pylori* in gastric cancer: advances and controversies. **Discov Med**, v. 20, n. 111, p. 285-93, Nov 2015.

MIZUNO, T. et al. Interleukin-17 levels in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 40, p. 6305-11, Oct 28 2005.

NAGY, T. A. et al. *Helicobacter pylori* induction of eosinophil migration is mediated by the *cag* pathogenicity island via microbial-epithelial interactions. **Am J Pathol**, v. 178 n. 4, p. 1448-52, 2011.

NAITO, M. et al. Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. **Gastroenterology**, v. 130, n. 4, p. 1181-90, Apr 2006.

NGUYEN, L. T. et al. Evaluation of the anti-East Asian CagA-specific antibody for CagA phenotyping. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 11, p. 1687-92, Nov 2009.

NGUYEN, T. N.; BARKUN, A. N.; FALLONE, C. A. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. **Helicobacter**, v. 4, n. 3, p. 185-97, Sep 1999.

NORDENSTEDT, H. et al. *Helicobacter pylori*-negative gastritis: prevalence and risk factors. **Am J Gastroenterol**, v. 108, n. 1, p. 65-71, Jan 2013.

O'TOOLE, P. W.; LANE, M. C.; PORWOLLIK, S. *Helicobacter pylori* motility. **Microbes Infect**, v. 2, n. 10, p. 1207-14, Aug 2000.

PALFRAMAN, S. L.; KWOK, T.; GABRIEL, K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 92, 2012.

PANDOLFINO, J. E.; HOWDEN, C. W.; KAHRILAS, P. J. H. *pylori* and GERD: is less more? **Am J Gastroenterol**, v. 99, n. 7, p. 1222-5, Jul 2004.

PAPADAKOS, K. S. et al. Presence of terminal EPIYA phosphorylation motifs in *Helicobacter pylori* CagA contributes to IL-8 secretion, irrespective of the number of repeats. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56291, 2013.

PARSONNET, J. et al. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v. 40, n. 3, p. 297-301, Mar 1997.

PEEK, R. M. J. et al. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. **Proc Assoc Am Physicians** v. 110, n. 6, p. 531-44, 1998.

PEREIRA, M. I.; MEDEIROS, J. A. Role of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 3, p. 684-98, Jan 21 2014.

PRINZ, C. et al. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. **Cancer Res**, v. 61, n. 5, p. 1903-9, Mar 1 2001.

RADOSZ-KOMONIEWSKA, H. et al. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, n. 8, p. 602-10, Aug 2005.

RIBEIRO, P. F. S. et al. RELATIONSHIP BETWEEN ESOPHAGITIS GRADES AND HELICOBACTER PYLORI. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 29, p. 135-137, 2016.

RILEY, L. K. et al. Identification of murine helicobacters by PCR and restriction enzyme analyses. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 4, p. 942-6, Apr 1996.

SEDAGHAT, H. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, *babA2*, and *oipA* genotypes in patients with upper gastrointestinal diseases. **Iran J Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 14-21, Feb 2014.

SEO, J. H. et al. *Helicobacter pylori* in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases, AP-1, and NF-kappaB and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells. **Lab Invest**, v. 84, n. 1, p. 49-62, Jan 2004.

SHI, R. et al. Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Chinese populations. **Helicobacter**, v. 13, n. 2, p. 157-65, Apr 2008.

SHIOTA, S. et al. Virulence genes of *Helicobacter pylori* in the Dominican Republic. **J Med Microbiol**, v. 63, n. Pt 9, p. 1189-96, Sep 2014.



SIDDIQUE, I. et al. Association between *Helicobacter pylori* genotypes and severity of chronic gastritis, peptic ulcer disease and gastric mucosal interleukin-8 levels: Evidence from a study in the Middle East. **Gut Pathog**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2014.

SLOMIANY, B. L.; SLOMIANY, A. Role of LPS-elicited signaling in triggering gastric mucosal inflammatory responses to *H. pylori*: modulatory effect of ghrelin. **Inflammopharmacology**, v. 25, n. 4, p. 415-429, Aug 2017.

SMITH, M. F., JR. et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. **J Biol Chem**, v. 278, n. 35, p. 32552-60, Aug 29 2003.

SONG, X. et al. *H. pylori*-encoded CagA disrupts tight junctions and induces invasiveness of AGS gastric carcinoma cells via Cdx2-dependent targeting of Claudin-2. **Cell Immunol**, v. 286, n. 1-2, p. 22-30, Nov-Dec 2013.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* infection. **N Engl J Med**, v. 347, n. 15, p. 1175-86, Oct 10 2002.

SUN, X. et al. CCR2 mediates *Helicobacter pylori*-induced immune tolerance and contributes to mucosal homeostasis. **Helicobacter**, v. 22, n. 2, Apr 2017.

TEGTMAYER, N.; WESSLER, S.; BACKERT, S. Role of the *cag* pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. **FEBS J**, v. 278, n. 8, p. 1190-202, Apr 2011.

TSUKAMOTO, T. et al. Prevention of Gastric Cancer: Eradication of *Helicobacter Pylori* and Beyond. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 8, Aug 3 2017.

UEMURA, N. et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. **N Engl J Med**, v. 345, n. 11, p. 784-9, Sep 13 2001.

VAN DOORN, L. J. et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 115, n. 1, p. 58-66, Jul 1998.

WANG, S. K. et al. CagA+ *H. pylori* infection is associated with polarization of T helper cell immune responses in gastric carcinogenesis. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 21, p. 2923-31, Jun 7 2007.

WARREN, J. R.; MARSHALL, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, v. 1, n. 8336, p. 1273-5, Jun 4 1983.

WEN, S.; MOSS, S. F. Helicobacter pylori virulence factors in gastric carcinogenesis. **Cancer Lett**, v. 282, n. 1, p. 1-8, Sep 8 2009.

WOODWARD, M.; MORRISON, C.; MCCOLL, K. An investigation into factors associated with Helicobacter pylori infection. **J Clin Epidemiol**, v. 53, n. 2, p. 175-81, Feb 2000.

WOODWARD, M.; MORRISON, C.; MCCOLL, K. An investigation into factors associated with Helicobacter pylori infection. **J Clin Epidemiol** v. 53, n. 2, p. 175-81, 2000.

YAKOUB, J. et al. Helicobacter pylori: correlation of the virulence marker iceA allele with clinical outcome in a high prevalence area. **Br J Biomed Sci**, v. 72, n. 2, p. 67-73, 2015.

YAKUT, M. et al. The association between precancerous gastric lesions and serum pepsinogens, serum gastrin, vascular endothelial growth factor, serum interleukin-1 Beta, serum toll-like receptor-4 levels and Helicobacter pylori Cag A status. **Clin Res Hepatol Gastroenterol** v. 37, n. 3, p. 302-11, 2013.

YAMAOKA, Y. Pathogenesis of Helicobacter pylori-Related Gastrointestinal Diseases from Molecular Epidemiological Studies. **Gastroenterol Res Pract**, v. 2012, p. 371503, 2012.

ZAMBON, C. F. et al. Helicobacter pylori babA2, cagA, and s1 vacA genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. **J Clin Pathol**, v. 56, n. 4, p. 287-91, Apr 2003.

ZATERKA, S. et al. Factors related to Helicobacter pylori prevalence in an adult population in Brazil. **Helicobacter**, v. 12, n. 1, p. 82-8, Feb 2007.

ZHENG, P. Y. et al. 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.

***ANEXOS***

---

## 10 ANEXOS

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

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

Número de registro: \_\_\_\_\_

**Nome do Paciente:**

---

Você está sendo convidado para participar da pesquisa clínica: “INFECÇÃO POR *Helicobacter pylori* NA MUCOSA GÁSTRICA: HISTÓRIA CLÍNICA, ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA, EXAME ANATOMOPATOLÓGICO, GENE *cagA* E SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO *CagA EPIYA*”.de responsabilidade da Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues e Dra. Natalia Maria Jacom Wood da Silva e que será desenvolvida na Universidade de Uberaba (UNIUBE) e Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

Esta pesquisa pretende estudar as alterações da parte interna do seu esôfago e do seu estômago, já que você apresenta sintomas do trato gastrointestinal superior, bem como pesquisar a presença de uma bactéria chamada de *Helicobacter pylori* no seu estômago.

Acreditamos que ela seja importante porque irá ajudar você e outros pacientes a terem um melhor esclarecimento da doença do refluxo, da presença da bactéria no estômago, bem como melhorar os seus possíveis tratamentos.

Para a realização deste estudo, precisamos da sua colaboração em autorizar a utilização destes fragmentos da parte interna do seu esôfago e do seu estômago.

Deixamos bem claro que o exame de endoscopia digestiva alta que agora você irá fazer, já realiza normalmente a retirada de fragmentos da parte interna do esôfago e do estômago.

Portanto ao autorizar a utilização dos fragmentos da parte interna do seu esôfago e do seu estômago para o presente estudo, você estará tendo uma possível melhora no seu diagnóstico e no seu tratamento e isto será feito sem nenhum custo a mais tanto físico bem como financeiro.

Os possíveis desconfortos ou riscos que poderão acontecer são os mesmos de um exame de endoscopia digestiva alta realizada de rotina, isto é, o exame é geralmente seguro e as complicações são raras. Pode ocorrer sangramento, normalmente mínimo, após a retirada dos fragmentos citados. Outros riscos incluem irritação no local onde foi aplicada a

medicação endovenosa, reações alérgicas aos medicamentos sedativos empregados. Complicações maiores como perfuração, são muito raras.

Pela sua participação no estudo, você não receberá nenhum pagamento, e também não terá nenhum custo. Você poderá parar de participar a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo para você ou para seu tratamento/atendimento.

Sinta-se à vontade para solicitar, a qualquer momento, os esclarecimentos que você julgar necessários.

Se você aceitar participar deste estudo, as informações desta pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação de você e de outros pacientes, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. Será também utilizada imagens a nível de microscopia e imunologia do material coletado, porém sem identificar o nome de nenhum paciente, conforme já citado.

Os gastos necessários para a sua participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

Uma cópia desse termo, assinado por um membro responsável pela equipe, onde consta a identificação e os telefones da equipe de pesquisadores, está sendo entregue a você, caso queira entrar em contato com eles.

---

Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE

Dados dos pesquisadores:

Profa. Dra. Denise Bertulucci Rodrigues

e-mail: [denise.rodrigues@uniube.br](mailto:denise.rodrigues@uniube.br) 9158-9234

Dra. Natalia Maria Jacom Wood da Silva

e-mail: [wood@mednet.com.br](mailto:wood@mednet.com.br) 9972-4000

## Autorização

Eu, \_\_\_\_\_ após a leitura (ou escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com um dos pesquisadores responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário ou de seu representante legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura de uma testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário (ou seu representante legal) para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pela autorização do CLE

Dados dos pesquisadores:

Profa. Dra. Denise Bertulucci Rodrigues

e-mail: [denise.rodrigues@uniube.br](mailto:denise.rodrigues@uniube.br) 9158-9234

Dra. Natalia Maria Jacom Wood da Silva

e-mail: [wood@mednet.com.br](mailto:wood@mednet.com.br) 9972-4000

## Questionário Médico para Pesquisa Clínica

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Número de registro: \_\_\_\_\_ Grupo: \_\_\_\_\_

### Título da Pesquisa:

“INFECÇÃO POR *Helicobacter pylori* NA MUCOSA GÁSTRICA: HISTÓRIA CLÍNICA, ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA, EXAME ANATOMOPATOLÓGICO, GENE *cagA* E SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO *CagA* EPIYA”.

### Pesquisadores responsáveis:

Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues e

Dra. Natalia Maria Jacom Wood da Silva

### Identificação do Paciente:

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

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Estado Civil: \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ N° \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Telefones: Celular ( \_\_\_\_ ) \_\_\_\_\_ Fixo: ( \_\_\_\_ ) \_\_\_\_\_

e-mail de contato: \_\_\_\_\_

### História Clínica:

Dor: não ( ) sim ( ) Tipo: pirose ( ) cólica ( ) outras: \_\_\_\_\_

Náuseas: não ( ) sim ( ) Vômitos: não ( ) sim ( ) Disfagia: não ( ) sim ( )

Laringite de repetição: não ( ) sim ( ) Rouquidão: não ( ) sim ( ) Pigarro: não ( ) sim ( )

Tosse seca “tipo alérgica”: não ( ) sim ( ) Tosse noturna: não ( ) sim ( )

Asma ou bronquite: não ( ) sim ( ) Recente: não ( ) sim ( )

Regurgitação: não ( ) sim ( ) De: líquidos ( ) alimentos ( ) outros ( )

Tabagismo: não ( ) sim ( ) carga tabágica: \_\_\_\_\_

Etilismo: não ( ) sim ( ) quantidade diária: \_\_\_\_\_

Gravidez: não ( ) sim ( ) G \_\_\_ P \_\_\_ C \_\_\_ A \_\_\_

Outros sintomas e/ou doenças:

---

---

---

Antecedentes de câncer na família: não ( ) sim ( )

Qual e quando:

---

---

---

Tratamento clínico anterior para doenças do aparelho digestivo: não ( ) sim ( )

Qual doença:

---

---

Cirurgias realizadas:

---

---

---

---

Medicamentos atualmente em uso:

---

---

---

---

Tratamento anterior para *Helicobacter pylori*: não ( ) sim ( )

omeprazol 20 + claritromicina 500 + amoxicilina 500 - bid ( )

lansoprazol 30 + claritromicina 500 + amoxicilina 500 - bid ( )

lansoprazol 30 + levofloxacino 500 + amoxiciliana 500 - bid ( )

Outros medicamentos utilizados no tratamento:

---

---

---

Responsável pelo preenchimento: \_\_\_\_\_



## Exame de Endoscopia Digestiva Alta

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

Número de registro: \_\_\_\_\_

### Nome do Paciente:

\_\_\_\_\_

### Dados do Exame de Endoscopia Digestiva Alta:

Nome do médico examinador: \_\_\_\_\_

Local de realização do exame: \_\_\_\_\_

Equipamento utilizado: \_\_\_\_\_

Medicação utilizada no exame: \_\_\_\_\_

### Local de biópsias realizadas:

esôfago distal ( ) antro gástrico ( ) corpo gástrico ( ) fundo ( )

outros: \_\_\_\_\_

### Esofagoscopia:

Normal: sim ( ) não ( )

Esofagite: não ( ) sim ( ) Tipo: \_\_\_\_\_

Esofagite erosiva: não ( ) sim ( ) grau I ( ) grau II ( ) grau III ( ) grau IV ( )

Esôfago de Barrett: não ( ) sim ( ) curto ( ) longo ( )

Hérnia de Hiato: não ( ) sim ( ) Tamanho: \_\_\_\_cm Tipo: desli ( ) rolam ( )

Estenose péptica: não ( ) sim ( ) úlcera: não ( ) sim ( ) erosões: não ( ) sim ( )

Câncer: não ( ) sim ( )

Outros: \_\_\_\_\_

### Gastroscoopia:

Normal: sim ( ) não ( )

Gastrite: não ( ) sim ( ) elevada ( ) plana ( ) erosiva ( ) enantematosa ( )

Antro ( ) corpo ( ) fundo ( ) atrofica ( )

Úlcera gástrica: não ( ) sim ( ) ativa ( ) cicatriz ( ) antro ( ) corpo ( ) fundo ( )

Incisura angularis ( ) pré-pilórica ( )

Câncer: não ( ) sim ( ) antro ( ) corpo ( ) cárdia ( ) pré-pilórico ( )

Outros: \_\_\_\_\_

### Duodenoscopia:

Normal: sim ( ) não ( )

Duodenite: não ( ) sim ( )

Úlcera duodenal: não ( ) sim ( ) ativa ( ) cicatriz ( )

Outros: \_\_\_\_\_

Teste da urease: positivo ( ) negativo ( )

Diagnóstico clínico do exame de endoscopia digestiva: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Exame Anatomopatológico

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Lâmina nº : \_\_\_\_\_ Número de registro: \_\_\_\_\_

### Nome do Paciente:

---

#### Esôfago:

Infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário: ( ) ausente; ( ) mínimo; ( ) moderado; intenso ( )  
 Exsudato neutrofílico: ( ) ausente; ( ) mínimo; ( ) moderado; intenso ( )  
 Eosinófilos: ( ) ausente; ( ) mínimo; ( ) moderado; intenso ( )  
 Hiperplasia do epitélio escamoso: ( ) ausente; ( ) mínimo; ( ) moderado; intenso ( )  
 Metaplasia intestinal especializada: presente ( ) ausente ( )  
 ( ) incompleta; ( ) completa  
 ( ) focal ( ) multifocal ( ) difusa

#### Corpo Gástrico:

Infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário: ( ) ausente; ( ) mínimo; ( ) moderado; intenso ( )  
 Exsudato neutrofílico: ( ) ausente; ( ) presente: ( ) mínimo; ( ) moderado; intenso ( )  
 Reação do epitélio foveolar: ( ) ausente; ( ) mínimo; ( ) moderado; intenso ( )  
 Metaplasia intestinal: ( ) ausente; presente ( )  
 ( ) incompleta; ( ) completa  
 ( ) focal ( ) multifocal ( ) difusa  
 Helicobacter pylori: ( ) ausente ( ) presente ; Escasso( ) ; moderado ( ) ; muito ( )

#### Antro Gástrico:

Infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário: ( ) ausente; ( ) mínimo; ( ) moderado; intenso ( )  
 Exsudato neutrofílico: ( ) ausente; ( ) presente: ( ) mínimo; ( ) moderado; intenso ( )  
 Reação do epitélio foveolar: ( ) ausente; ( ) mínimo; ( ) moderado; intenso ( )  
 Metaplasia intestinal: ( ) ausente; presente ( )  
 ( ) incompleta; ( ) completa  
 ( ) focal ( ) multifocal ( ) difusa  
 Helicobacter pylori: ( ) ausente ( ) presente ; escasso( ) ; moderado ( ) ; muito ( )

#### Diagnóstico:

---



---



---



---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

HOSPITAL DE CLÍNICAS

Diretoria de Pesquisa

Av Getúlio Guarita, 130 - Cep: 38.025-440 – Uberaba MG

Fone: (34) 3318 5211 - E-mail – [diretoria.pesquisa@hc.uftm.edu.br](mailto:diretoria.pesquisa@hc.uftm.edu.br)

Mem. 24/2013/Dir.Pesq./HC/UFTM.

Uberaba, 21 de junho de 2013.

À: Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

Assunto: parecer de projeto

1. Em relação à solicitamos de V.Sa. de autorização para realização da Pesquisa “*Avaliação da resposta imune na mucosa esofagiana e gástrica de pacientes com esofagite de refluxo portadores de Helicobacter pylori e pacientes com esofagite de refluxo não portadores de Helicobacter pylori*”, ressaltamos que o nosso parecer para realização da mesma é favorável.

Atenciosamente,

  
Dr. Helio Moraes de Souza  
Diretor de Pesquisa/HC/UFTM

UNIVERSIDADE DE UBERABA -  
UNIUBE

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação da resposta imune na mucosa esofagiana e gástrica de pacientes com esofagite de refluxo portadores de *H. pylori* e pacientes com esofagite de refluxo não portadores de *H. pylori*

**Pesquisador:** DENISE BERTULUCCI ROCHA RODRIGUES

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 19666013.0.0000.5145

**Instituição Proponente:** Universidade de Uberaba - UNIUBE

**Patrocinador Principal:** Universidade de Uberaba - UNIUBE  
Sociedade Educacional Uberabense

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 350.874

**Data da Relatoria:** 06/08/2013

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se do projeto - Avaliação da resposta imune na mucosa esofagiana e gástrica de pacientes com esofagite de refluxo portadores de *Helicobacter pylori* e pacientes com esofagite de refluxo não portadores de *Helicobacter pylori*. - coordenado pela profa Denise Bertulucci Rocha Rodrigues, vinculada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba.

Trata-se de um estudo observacional, descritivo e laboratorial.

Serão analisados resultados de biópsias provenientes de exames de endoscopia alta, cujos pacientes foram indicados para esse tipo de exame por determinação médica.

Nas palavras dos proponentes - O estudo será embasado em exames de endoscopia digestiva alta (EDA), não mudando em nada a rotina dos cuidados de atenção à saúde dispensados aos paciente portadores de patologias do trato digestivo superior, ou seja, a realização de biópsias tanto do esôfago como do estômago já faz parte do esclarecimento diagnóstico do exame de EDA realizado no dia a dia. -

**Objetivo da Pesquisa:**

Apresenta-se como objetivos:

Geral:

**Endereço:** Av.Nene Sabino, 1801

**Bairro:** Universitário

**UF:** MG

**Município:** UBERABA

**CEP:** 38.055-500

**Telefone:** (34)3319-8959

**Fax:** (34)3314-8910

**E-mail:** cep@uniube.br

# UNIVERSIDADE DE UBERABA - UNIUBE

Continuação do Parecer: 350.874

Avaliar os mecanismos da resposta imune nas lesões da mucosa esofagiana e gástrica de pacientes com esofagite de refluxo portadores de *Helicobacter pylori* e pacientes com esofagite de refluxo não portadores de *Helicobacter pylori*.

Específicos:

1 Avaliar o processo inflamatório e condições da mucosa em biópsia de esôfago de pacientes portadores de esofagite de refluxo comparadas com grupo controle

2 Avaliar a presença da infecção por *H. pylori* em pacientes com esofagite de refluxo 3

Detectar e quantificar a presença de mastócitos. 4 Avaliar e quantificar a presença de fibrose.

5 Avaliar MMP-3 e MMP-9

6 Analisar in situ a expressão de citocinas do perfil th1(TNF- $\gamma$  E IFN- $\gamma$ ), Th2(IL-4), Th17 (IL-17, IL-23) e Treg (TGF- $\beta$  e IL-10).

7 Avaliar in situ a expressão de galectinas (1, 3 e 9).

8 Avaliar TLR-2 E TLR-4

## **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são os inerentes a qualquer pesquisa com seres humanos, incluindo a perda da confidencialidade, adequadamente minimizado pelos proponentes. Não há risco adicional ao sujeito, pois ele tem a indicação da endoscopia pelo seu quadro de saúde. Se o paciente for positivo ou negativo para a bactéria *H. pylori* ele será incluído em um ou outro grupo da pesquisa.

O grupo envolve médicos, com experiência na realização e interpretação do exame endoscópico.

## **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é pertinente e aborda um tema importante na área médica, representado pela doença do refluxo gastro esofágico. O protocolo de pesquisa está bem apresentado e embasado na literatura científica atualizada.

Os objetivos são amplos e devem compor um número considerável de trabalhos científicos.

Serão incluídos como participantes indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos, com indicação médica para realização de endoscopia digestiva alta.

Apresenta-se como critérios de exclusão:

1) Não concordância em participar

**Endereço:** Av.Nene Sabino, 1801

**Bairro:** Universitário

**CEP:** 38.055-500

**UF:** MG

**Município:** UBERABA

**Telefone:** (34)3319-8959

**Fax:** (34)3314-8910

**E-mail:** cep@uniube.br

Continuação do Parecer: 350.874

- 2) Cirurgia prévia do trato digestivo superior
- 3) Grávidas
- 4) Pacientes com presença de comorbidades graves como neoplasias, doenças do colágeno e distúrbios de coagulação.
- 5) Pacientes que no momento do exame de endoscopia, a critério dos médicos pesquisadores, não apresentavam condições físicas ou mentais de participação no estudo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta-se a folha de rosto, o TCLE, um modelo de exame anatomopatológico (onde se anota as observações ao exame endoscópico).

Apresenta-se pareceres diversos, incluindo da diretoria clínica, do serviço de endoscopia, dos ambulatórios e da diretoria de pesquisa do Hospital de Clínicas da UFTM.

**Recomendações:**

não há

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto está bem apresentado, inclui todos os documentos necessários, o TCLE está bem redigido e adequado. Não há pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em 06 de agosto de 2013 a plenária votou de acordo com o relator.

UBERABA, 06 de Agosto de 2013

---

**Assinador por:**  
**Geraldo Thedei Junior**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av.Nene Sabino, 1801

**Bairro:** Universitário

**CEP:** 38.055-500

**UF:** MG

**Município:** UBERABA

**Telefone:** (34)3319-8959

**Fax:** (34)3314-8910

**E-mail:** cep@uniube.br

