



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

THAYNARA MILLENA DE OLIVEIRA BEZERRA

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A
CLARITOMICINA DE *Helicobacter pylori* OBTIDAS DE PACIENTES
ACOMETIDOS POR DOENÇAS GÁSTRICAS**

Recife
2020

THAYNARA MILLENA DE OLIVEIRA BEZERRA

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A
CLARITOMICINA DE *Helicobacter pylori* OBTIDAS DE PACIENTES
ACOMETIDOS POR DOENÇAS GÁSTRICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Alves

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Dyana Leal Veras

Recife
2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Bezerra, Thaynara Millena de Oliveira

Caracterização de genes de virulência e resistência a claritomicina de *Helicobacter pylori* obtidas de pacientes acometidos por doenças gástricas / Thaynara Millena de Oliveira Bezerra - 2020.

60 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Luiz Carlos Alves

Coorientadora: Dyana Leal Veras

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2020.

Inclui referências e anexos.

1. *Helicobacter pylori* 2. Carcinogênico 3. Virulência

I. Alves, Luiz Carlos (Orientador) II. Veras, Dyana Leal (Coorientadora) III. Título

616.333 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-116

THAYNARA MILLENA DE OLIVEIRA BEZERRA

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A
CLARITOMICINA DE *Helicobacter pylori* OBTIDAS DE PACIENTES
ACOMETIDOS POR DOENÇAS GÁSTRICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 28/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE
Departamento de Parasitologia

Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
Departamento de Bioquímica

Prof. Dr. Carlos Alexandre Antunes de Brito
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
Departamento de Medicina Tropical

À Deus, OFEREÇO. Aos meus pais e a todos que estiveram ao meu lado nessa jornada, com carinho, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à DEUS, autor e consumidor da minha fé, que em todo tempo esteve ao meu lado, renovando minhas forças e me capacitando para realização deste trabalho. Imensa gratidão pelo infinito amor, pela paz, saúde, inteligência e sabedoria concedida, pois esses foram essenciais durante a jornada. À Ele toda Honra e toda Glória para sempre.

Gratidão aos meus queridos pais, Cosmo Damião e Maria Edima, meus maiores incentivadores, companheiros e amigos de todas as horas. Agradeço pela educação que me deram, pelo grande incentivo aos estudos e por não medirem esforços para que eu possa alcançar meus sonhos. Agradeço pela força, paciência, apoio e dedicação em todos esses anos. A vocês, sempre, meu eterno amor.

Ao meu amado irmão Alyson Cosmo pelo apoio e companheirismo.

A todos meus familiares, em especial, meus maiores exemplos de vida, meus avós Irene Antônia, Antônio Genêzio, Isabel Herminia (*in memoriam*), Severino Damião e minhas queridas tias Maria Claudinete e Severina Irene, por todo amor, cuidado e apoio.

Aos meus sobrinhos, Camila Kauanne e Bryan Tayllor, por somar alegria, esperança e motivação a minha vida. Agradeço pelos inúmeros momentos vividos, que se resumem ao mais puro e sincero amor.

Aos melhores amigos do mundo, os meus! Que também devem ser chamados anjos do bem. Em especial a minha amiga de longa data Amanda Larissa, por ter me apoiado em mais uma etapa vivida dentre os vinte anos de amizade.

Aos que fazem parte da família UmadalPE, Wilka Mirelly, Núbia Luanna, Deyse Victória, Andressa Sibely, Sérgio Emanuel, Michael Albuquerque e Rubens Alencar, pelos momentos vividos, conselhos, por todo apoio e companheirismo.

Aos meus queridos amigos de graduação, Geryticia, Isabel, Daffany, Roberta, David e em especial, meus braços fortes nessa jornada, Tainá Maria e Anderson Silva, por estarem sempre ao meu lado, pelas inúmeras vezes que transformaram a tristeza em alegria, o desespero em calma, por acreditar tanto em mim e por nunca desistirem de tornar tudo mais leve e feliz. Vocês foram essenciais!

A grande amiga que o LIKA me presenteou, Isabella Ralph, por ter somado alegria e companheirismo aos meus dias.

Aos fiéis, que permaneceram ao meu lado, provando que a distância física nunca será suficiente para esquecer quem amamos, Maurília Palmeira, Iany Rayssa, Fernanda Dias e

Olávio Campos (nenis). Grande e verdadeira benção é tê-los em minha vida. A vocês, minha eterna gratidão.

Ao LBCM, em especial, a ajuda, paciência e companheirismo de Nairomberg Portela, que me proporcionou a alegria de ter mais um alegre companheiro, Ayug Lemos (nhino). A doçura e simpatia de Amanda Vasconcelos, que agora carrega em seu ventre um dos pacotinhos de amor mais esperado do ano, Beatriz. A cumplicidade de Elda Priscila. Ao companheirismo, ajuda e gargalhadas de Fernanda Cristina e Jorge Belém, a disponibilidade e ajuda de Gabriel Gazzoni, Rubens Rocha, Alberon Ribeiro, Catarina Fernandes e Flávia Machullis. Aos momentos de distração com Dayviane Mota, Victor Emanuel e Janderson Weydson. Por tudo que fizeram por mim e pelos momentos incríveis que vivemos juntos, levarei vocês em meu coração.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Luiz Carlos Alves e Prof^a Dr^a Dyana Leal Veras, pelas instruções, paciência, credibilidade e apoio. Aos demais orientadores, Prof. Dr. Fábio Brayner e Prof^a. Dr^a. Ana Paula Sampaio, por toda ajuda.

A todos os profissionais do Departamento de Endoscopia do Hospital das Clínicas, em especial Dr. Eduardo Sampaio, Fabiana e Júnior, pela confiança e credibilidade concedidas para o desenvolvimento desse projeto.

Aos pacientes, que contribuíram de forma simples e espontânea enriquecendo minha formação profissional e principalmente pessoal.

Aos profissionais de serviços gerais do LIKA/IAM, Verinha, Dona Fátima e Cleide, pelo cuidado de sempre.

Ao LIKA/IAM pelos recursos concedidos e estrutura para o desenvolvimento do projeto.

Ao secretario Fábio e a todos que contribuem para o PPGBAS, por toda ajuda e disponibilidade.

A Cristiane do departamento de Parasitologia do IAM, por toda ajuda.

A CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Muito obrigada!

“Para que todos os povos da terra conheçam a mão do SENHOR, que é forte, para que temais ao SENHOR, vosso Deus, todos os dias”.

Bíblia. NT. Josué 4:24

RESUMO

O *Helicobacter pylori* tem um importante papel na etiologia de doenças gástricas, incluindo a gastrite crônica, úlceras pépticas, linfoma do tecido linfoide associado à mucosa (MALT), além de estar relacionado ao desenvolvimento do câncer gástrico. Desde 1994 este microrganismo foi considerado um agente carcinogênico humano pertencente ao grupo 1. No Brasil, o cancer gástrico aparece em quarto lugar na incidência entre homens e em sexto entre mulheres. Estima-se que cerca de 50% da população mundial esteja infectada pelo microrganismo, sendo a maior prevalência em países em desenvolvimento. A prevalência no Brasil, permanece elevada em localidades urbanas, rurais e comunidades indígenas. Em Recife-PE, no entanto, não existem estudos recentes que demonstrem a relação da presença do *H. pylori* e casos de doenças gástricas. A terapia tripla é o esquema terapêutico mais prescrito na erradicação, incluindo dois antibióticos, com crescente aumento de resistência principalmente a claritromicina, contribuindo para a falha terapêutica. Portanto, este trabalho teve o objetivo de realizar através da técnica de PCR convencional, identificação e sequenciamento dos principais genes de virulência e de resistência a claritromicina, encontrados em isolados de *H. pylori* obtidos de pacientes acometidos por doenças gástricas, em hospital público de Recife-PE. Sendo realizada investigação experimental em laboratório, com biópsias do estômago obtidas de pacientes positivos para *H. pylori*. Os fragmentos de biópsias foram obtidos por demanda programada no período de outubro de 2018 a março de 2019. Foram coletadas amostras de corpo e antro de 91 pacientes, totalizando 182 amostras. Destas, 45 (49,5%) foram positivos para o *H. pylori* sendo os homens mais frequentes (66,6%) e em relação a faixa etária, 31 pacientes acima de 44 anos (68,8%) de idade encontraram-se infectados. Na avaliação histológica, dos 45 pacientes com laudos positivos para *H. pylori*, foram observadas 59 e 68 alterações na regiões do corpo e antro, respectivamente. A detecção dos genes de virulência *cagA*, *cagM*, *vacA* e *oipA* nas regiões de corpo e antro não apresentaram diferença significativa. Observou-se alta prevalência desses genes nas amostras analisadas, destacando a combinação alélica *vacA s1m1* que esteve presente em todos os grupos de alterações gástricas. Os resultados encontrados demonstraram que a resistência da *H. pylori* à claritromicina foi de 17,7%, sendo relacionado às mutações A2142G e A2143G do domínio V da fração 23S do RNAr da bactéria. Desta forma, são necessários mais estudos de monitoramento de resistência a esse antibiótico.

Palavras chave: *Helicobacter pylori*. Carcinogênico. Virulência.

ABSTRACT

Helicobacter pylori plays an important role in the etiology of gastric diseases, including chronic gastritis, peptic ulcers, lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT), in addition to being related to the development of gastric cancer. Since 1994 this microorganism has been considered a human carcinogenic agent belonging to group 1. In Brazil, gastric cancer appears in fourth place in the incidence among men and in sixth among women. It is estimated that about 50% of the world population is infected with the microorganism, with the highest prevalence in developing countries. Prevalence in Brazil remains high in urban, rural and indigenous communities. In Recife-PE, however, there are no recent studies that demonstrate the relationship between the presence of *H. pylori* and cases of gastric diseases. Triple therapy is the most prescribed therapeutic scheme for eradication, including two antibiotics, with increasing resistance, mainly to clarithromycin, contributing to therapeutic failure. Therefore, this work aimed to perform, through the conventional PCR technique, identification and sequencing of the main virulence and resistance to clarithromycin genes, found in *H. pylori* isolates obtained from patients affected by gastric diseases, in a public hospital in Recife -PE. Experimental laboratory research was performed, with stomach biopsies obtained from patients positive for *H. pylori*. The biopsy fragments were obtained by programmed demand from October 2018 to March 2019. Samples of body and antrum were collected from 91 patients, totaling 182 samples. Of these, 45 (49.5%) were positive for *H. pylori*, the most frequent men (66.6%) and in relation to the age group, 31 patients over 44 years old (68.8%) were found if infected. In the histological evaluation, of the 45 patients with positive reports for *H. pylori*, 59 and 68 changes were observed in the body and antrum regions, respectively. The detection of viruses of *cagA*, *cagM*, *vacA* and *oipA* virulence in the body and antrum regions did not show significant difference. A high prevalence of these genes was observed in the samples analyzed, highlighting the allelic combination *vacA* s1m1 that was present in all groups of gastric changes. The results found showed that *H. pylori* resistance to clarithromycin was 17.7%, being related to the A2142G and A2143G mutations in domain V of the 23S fraction of the bacterial RNR. Thus, further studies to monitor resistance to this antibiotic are needed.

Keywords: *Helicobacter pylori*. Carcinogenic. Virulence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura morfológica do <i>Helicobacter pylori</i>	18
Figura 2	– Sítios anatômicos do estômago.....	19
Figura 3	– Função da urease na colonização da mucosa gástrica pelo <i>H. pylori</i> . Os números dos painéis representam estágios sucessivos na colonização da mucosa hospedeira. Formação e atividade de ureias extracelulares (1 e 2), levando à agregação (3) e o surgimento de danos às células da mucosa (4)	19
Figura 4	– Polimorfismo do gene <i>vacA</i> do <i>H. pylori</i>	23
Figura 5	– Cascata carcinogênica.....	26
Figura 6	– Representação do mecanismo de resistência do <i>H. pylori</i> a claritromicina. A: Esquema representativo das frações 23S e 16S do ribossomo e sítios de ligação P e A. B: Sequência parcial do domínio V da fração 23S RNAr destacando os nucleotídeos associados as mutações. C: Esquema representativo do ribossomo destacando em amarelo o sítio de ação da peptidiltransferase (sítio P).....	29
Figura 7	– Representação dos tipos das alterações gástricas nas amostras das regiões do corpo e antro em pacientes positivos para <i>H. pylori</i>	36
Figura 8	– Eletroforese em gel para os produtos de PCR específicos para os genes <i>ureC</i> , <i>cagA</i> , <i>cagM</i> e <i>oipA</i> em alguns isolados do <i>H. pylori</i>	37
Figura 9	– Frequência dos genes de virulência da <i>H. pylori</i>	38
Figura 10	– Frequência da combinação alélica do gene <i>vacA</i> nas regiões de corpo e antro ..	39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Conjunto de iniciadores para amplificação dos genes *cagA*, *cagM*, *vacA*, *oipA* e 23S RNAr.....33
- Tabela 2** – Relação entre resultados histopatológicos e dados biológicos dos pacientes.....35
- Tabela 3** – Resultado dos alelos presentes no gene *vacA* nas regiões de corpo e antro.....38
- Tabela 4** – Resultado encontrado das mutações A2142G e A2143G em isolados de *H. pylori*.....39

LISTA DE ABREVIATURAS

cagA	Cytotoxin Associated Gene A
cagM	Cytotoxin Associated Gene M
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
ddNTP	Didesoxinucleotídeos
DI	Displasia Intestinal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDA	Endoscopia Digestive Alta
GA	Gastrite Atrófica
GC	Gastrite Crônica
HF	Hiperplasia Faveolar
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Cancro
IBP	Inibidor da Bomba de Prótons
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
MALT	Tecido Linfóide Associado a Mucosa
MI	Metaplasia Intestinal
OH	Hidroxila Livre
oipA	Protéina Inflamatória Externa A
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RNAr	Ácido Ribonucleico Ribossômico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
ureC	Urease C
vacA	Citotoxina Vacuolizadora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo Geral.....	17
1.1.2	Objetivos Específicos.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1	<i>Helicobacter pylori</i>	18
2.2	EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.3	PATOGÊNESE E FATORES DE VIRULÊNCIA.....	22
2.4	ASPECTOS CLÍNICOS.....	23
2.4.1	Gastrites.....	24
2.4.2	Úlceras pépticas.....	24
2.4.3	Câncer gástrico.....	25
2.4.4	Outras doenças.....	26
2.5	DIAGNÓSTICO.....	27
2.6	TRATAMENTO.....	27
3	JUSTIFICATIVA.....	30
4	METODOLOGIA.....	31
4.1	ASPECTOS CLÍNICOS.....	31
4.2	AMOSTRAS E AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	31
4.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	31
4.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	31
4.5	BIÓPSIAS GÁSTRICAS E IDENTIFICAÇÃO DA <i>H. pylori</i>	31
4.6	EXTRAÇÃO DO DNA.....	32
4.7	REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR).....	33
4.8	SEQUENCIAMENTO.....	34
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS.....	35
5.2	DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE <i>H.pylori</i>	36

5.3	DISTRIBUIÇÃO ALÉLICA DO GENE <i>vacA</i>	38
5.4	RESISTÊNCIA A CLARITROMICINA.....	39
6	DISCUSSÃO	41
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXO A - PARECER CEP	57
	ANEXO B - TCLE	58

1 INTRODUÇÃO

A patogênese de várias doenças gastrointestinais, tais como gastrite crônica, úlceras gástricas, linfoma do tecido linfóide associado à mucosa (MALT) e câncer gástrico podem estar relacionados à presença do *Helicobacter pylori*, encontrado no epitélio gastrointestinal (HOOI et al., 2017; MALFERTHEINER et al., 2017). A prevalência desta infecção está relacionada com aspectos dos hospedeiros, como: idade, gênero, condições socioeconômicas; fatores ambientais e áreas geográficas e fatores bacterianos. (ARCHAMPONG et al., 2017).

A colonização gástrica por *H. pylori* pode contribuir para o desenvolvimento de uma inflamação na mucosa, caracterizado pela presença de células mononucleares e neutrófilos (ESTEVAM et al., 2017). A princípio a patogênese assume um aspecto superficial que pode ser assintomática com manifestações clínicas de curta duração, progredindo para uma gastrite crônica, que evolui para gastrite atrófica, desenvolvendo posteriormente metaplasia intestinal, displasia intestinal e câncer gástrico (CARRASCO et al., 2013).

Em 1994, a Organização Mundial de Saúde (OMS) juntamente com a Agência Internacional de Pesquisa do Cancro (IARC), consideraram o *H. pylori* um agente carcinogênico humano pertencente ao grupo 1 (SANTOS et al., 2015). O câncer gástrico é o quarto câncer mais comum no mundo e a segunda principal causa de mortes por câncer (MELCHIADES et al., 2017). No Brasil, aparece em quarto lugar na incidência entre homens e em sexto entre mulheres (INCA., 2020). Estima-se que cerca de 50% da população mundial esteja infectada pelo *H. pylori*, sendo mais prevalente em países em desenvolvimento (QUAGLIA et al., 2018). No Brasil, a prevalência permanece elevada em localidades urbanas, rurais e comunidades indígenas (ROQUE et al., 2017). Em Recife-PE, no entanto, não existem estudos recentes que demonstrem a relação da presença do *H. pylori* e os casos de doenças gástricas.

O *H. pylori* apresenta um elevado grau de diversidade dos genes de virulência, dentre eles a ilha de patogenicidade *cag*-PAI e o gene *vacA* são considerados os principais fatores de virulência, assim como fatores carcinogênicos (ABDULLAH et al., 2018; BAKHT et al., 2019). Além disso, genes como o *cagM*, localizado nessa ilha de patogenicidade e o *oipA* também se destacam por ser encontrados em cepas de pacientes com *H. pylori* positivo acometidos por doenças gástricas (FELICIANO et al., 2015).

Doenças relacionadas a infecção causada por *H. pylori*, normalmente são tratadas com uma terapia tripla que inclui principalmente um inibidor da bomba de prótons (IBP) e prescrição simultânea de dois antibióticos, dentre eles, os mais utilizados são a claritromicina,

amoxicilina e metronidazol (KIM et al., 2015; HANAFIAH et al., 2019). A claritromicina tem se destacado por apresentar maior falha no tratamento, deixando de apresentar eficácia em isolados relacionados a infecções em todo o mundo, confirmando um déficit na erradicação da bactéria (VIANNA et al., 2016). Em 2017 a Organização Mundial de Saúde publicou uma lista de patógenos prioritários resistentes a antibióticos, formado por doze bactérias que representam maior ameaça à saúde humana. O *H. pylori* foi considerado como alta prioridade, destacando a resistência a claritromicina e estando no mesmo grupo de bactérias como *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus* (WHO., 2017).

A resistência das cepas de *H. pylori* a antibióticos podem variar em diferentes regiões geográficas, estando associada ao uso de antibióticos nessas áreas (LEE et al., 2019). Estudos recentes propõem que os mecanismos de resistência ocorrem principalmente, devido a presença de zonas de plasticidade encontradas no genoma do *H. pylori*, resultando em mutações que diferem as cepas existentes (ALI et al., 2014; HASHEMI et al., 2019). A resistência a claritromicina está associada a mutações na sequência de nucleotídeos encontrados na fração do gene 23S do RNAr, o qual é responsável pela atividade da peptidiltransferase do ribossomo (MÉGRAUD et al., 2015). Essas mutações pontuais, envolvem a substituição de A - G nas posições 2142 e 2143, que afetam o domínio V do gene 23S RNAr, inibindo a atividade antimicrobiana (VALA et al., 2016; PARK et al., 2018).

Devido à escassez de dados recentes relacionados a presença e características genéticas de isolados de *H. pylori* em Recife-PE, pretende-se, com este trabalho, realizar uma análise para identificação dos genes de virulência e de resistência a claritromicina, encontrados em isolados de *H. pylori* obtidos de pacientes acometidos por doenças gástricas em hospital público de Recife-PE.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Determinar características biológicas de pacientes infectados pelo *Helicobacter pylori* e acometidos por doenças gástricas e caracterizar os genes de virulência e resistência a claritromicina dos isolados.

1.1.2 Específicos

- a) Relatar as alterações histopatológicas encontradas nos pacientes positivos para *H. pylori*;
- b) Determinar a ocorrência dos genes de virulência *cagA*, *cagM*, *vacA* e *oipA* em isolados de *H. pylori*;
- c) Identificar a presença de alterações gástricas com a prevalência das combinações alélicas *s* e *m* do gene *vacA* em isolados positivos;
- d) Determinar a ocorrência do gene de resistência 23S do RNAr;
- e) Determinar a presença das mutações A2142G e A2143G no gene que codifica a fração 23S do RNAr do *H. pylori* envolvidas na resistência a claritromicina.

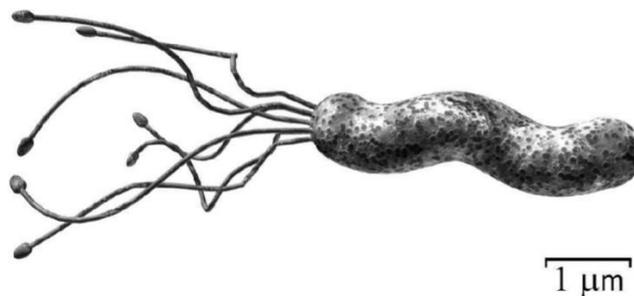
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Helicobacter pylori*

O gênero *Helicobacter* foi definido através de estudos realizados com material genético de RNA ribossômico pelos métodos de sequenciamento e hibridação do DNA da bactéria. Esse gênero pertencente à superfamília VI de bactérias gram-negativas que apresentam atualmente mais de 27 espécies identificadas, destacando a grande importância do *Helicobacter pylori* para o homem (OWEN., 1998; LADEIRA et al., 2003). Em 1983, Warren e Marshall, na Austrália (Prêmio Nobel de Medicina - 2005), descreveram o bacilo pela primeira vez, apresentando em suas características bioquímicas a produção de grande quantidade de citotoxinas vacuolizantes, enzimas tóxicas, especialmente lipases, ureases e proteases, desregulando os fatores defensivos do epitélio (MARSHALL e WARREN., 1984; SIQUEIRA et al., 2007).

A *H. pylori* é um bacilo gram-negativo microaerófilo que apresenta estrutura encurvada ou espiralada, de superfície lisa e extremidades arredondadas. Mede aproximadamente de 0,5 μ m a 1 μ m de largura e 3 μ m de comprimento e possui crescimento lento. A capacidade de locomoção está relacionada à presença de quatro a sete flagelos unipolares embainhados e bulbos terminais que permitem sua adesão as células da mucosa gástrica (MONTECUCCO e RAPPUOLI, 2001; JOSENHANS E SUBERBAUM, 2002) (Figura 1).

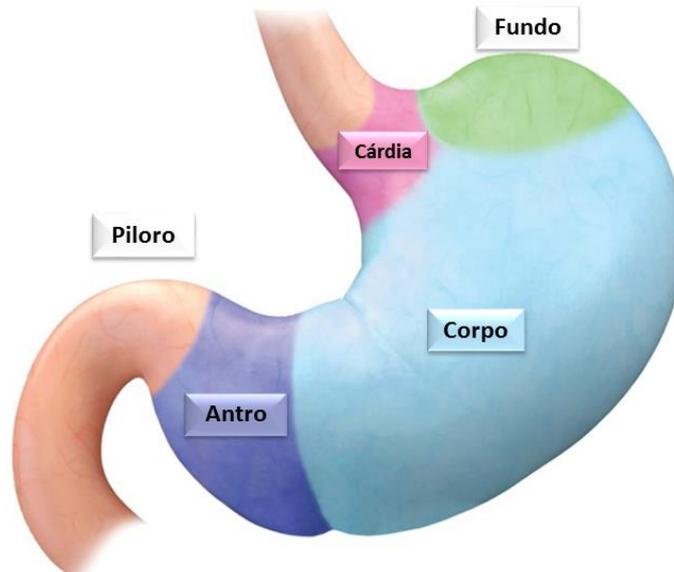
Figura 1 Estrutura morfológica do *Helicobacter pylori*.



Fonte: Marshall et al., 2002.

Esta espécie coloniza normalmente o estômago e pode localizar-se principalmente no corpo e no antro gástrico (Figura 2), sendo o antro a região onde se encontra em maior densidade pela baixa produção de ácido (LEE et al., 2011).

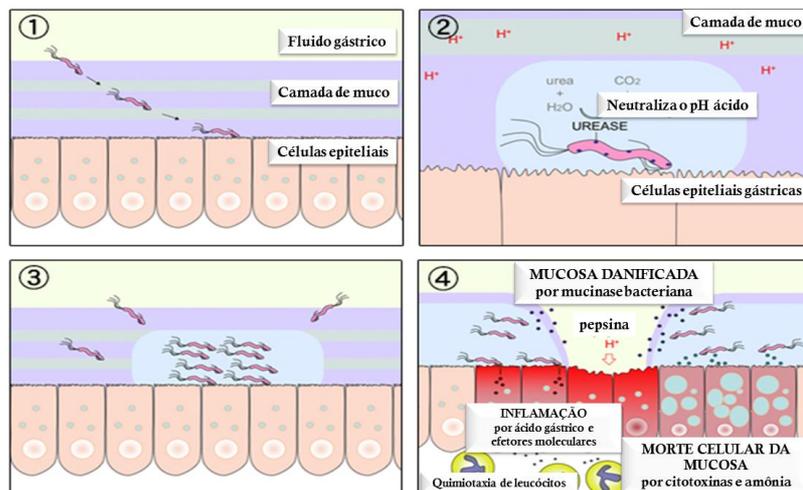
Figura 2 Sítios anatômicos do estômago.



Fonte: Adaptado de Kang et al., 2013.

É um patógeno altamente sensível ao pH ácido, porém devido a presença da urease, responsável por combater a acidez do ambiente, transformando ureia em amônia e dióxido de carbono, é criado um envoltório que permite sua colonização (MONTECUCCO e RAPPUOLI, 2001) (Figura 3). A urease é considerada um potente fator de virulência, sendo necessária para a sobrevivência do microrganismo (QUAGLIA et al., 2018). Além disso, a amônia produzida pode contribuir para o desenvolvimento de algumas doenças gástricas, tais como, úlceras gástricas e pépticas (RIZVI et al., 2019).

Figura 3 Função da urease na colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori*. Os números dos painéis representam estágios sucessivos na colonização da mucosa hospedeira. Formação e atividade de ureias extracelulares (1 e 2), levando à agregação (3) e o surgimento de danos às células da mucosa (4).



Fonte: Adaptado de Khan et al., 2009.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A *H. pylori* tem distribuição cosmopolita e estima-se que cerca de metade da população mundial encontra-se infectada (HANAFIAH et al., 2019). Estudos relatam que a prevalência da infecção por *H. pylori* em adultos europeus é de cerca de 20% a 40% (PELETEIRO et al., 2014). Em países do sul e leste Europeu, como a Letônia, Polônia e Portugal a prevalência é mais alta quando comparado com as demais áreas do continente, sendo superior a 50% da população (LEJA et al., 2012; BASTOS et al., 2013; ŁASZEWICZ et al., 2014). Entre a região Ásia-Pacífico, a distribuição da infecção varia entre os países. Essa prevalência está associada ao nível socioeconômico, que é mais baixo nas regiões mais desenvolvidas. No Vietnã, a taxa de soroprevalência foi de 53,2% (TRUNG et al., 2019). A Índia apresentou valores semelhantes, atingindo cerca de 55% (MUKHERJEE et al., 2019). Um estudo em Bangladesh apresentou maior taxa de ocorrência na população, com 71,8% (RAHMAN et al., 2019). Na Austrália, região desenvolvida, a soroprevalência foi de 24,6% (HOOI et al., 2017). Nas regiões do leste asiático, estudos relataram a positividade em 35,1% no Japão, 25,6% em Taiwan, 62,3% e na China (KUBOSAWA et al., 2019; CHUNG et al., 2016; FRANG et al., 2019). Os países do sudeste asiático exibiram estudos com taxa de infecção, atribuída a 31% em Cingapura, 20% na Malásia e 40% na Tailândia (QUACH et al., 2018).

No Brasil, a infecção por *H. pylori* pode variar de 60% a 90% (SUZUKI et al., 2012). Uma pesquisa realizada apresentou mais de um milhão de casos de infecções e 783.000 mortes relacionadas a essa infecção ocorridas no ano de 2018 (BRAY et al., 2018). Um estudo em crianças e jovens até 18 anos, evidenciou um percentual de 24,7% e 25% de soropositivos respectivamente. (OGATA et al., 2018; TOSCANO et al., 2018). A prevalência da infecção aumenta progressivamente com a idade, e é igualmente encontrada em homens e mulheres (MCCALLION et al., 1995; MITCHELL et al., 2003), sendo influenciada principalmente por fatores como baixo nível socioeconômico e conforme relatado em estudos, com famílias que moram em condições de aglomeração (ROMA-GIANNIKOU et al., 2003). Ensaio utilizando tipagem de DNA confirmaram que membros de uma mesma família tendem a ser infectados pela mesma cepa de bactéria (SILVA et al., 2004; CHEY et al., 2017). Considerando as grandes dimensões geográficas do Brasil, com suas condições socioeconômicas e culturais regionalmente específicas refletidas pela alta e variável prevalência de *H. pylori*, existem poucos estudos epidemiológicos sobre doenças gástricas.

A infecção por *H. pylori* não é autolimitada, podendo ser adquirida na infância e persistir por muitos anos, ocorrendo por vias oral-oral, fecal-oral e gástrico-oral, acometendo em geral o sistema gastrointestinal (ZHOU et al., 2018; CASTILLO et al., 2019). Reservatórios ambientais podem existir, entretanto, a principal fonte de contaminação são águas e alimentos contaminados. (QUAGLIA et al., 2019).

2.3 PATOGÊNESE E FATORES DE VIRULÊNCIA

A virulência do *H. pylori* está comumente associada a um risco aumentado de distúrbios gastrointestinais e podem variar entre as áreas geográficas, a prevalência da infecção e a distribuição de genótipos variados entre regiões, grupos étnicos e países (WANG et al., 2015; BAGHERI et al., 2016; SALLAS et al., 2018). As cepas de *H. pylori* possuem um elevado grau de heterogeneidade genética devido a mutações pontuais e rearranjos genômico (WHITIMIRE et al., 2019). A identificação de fatores bacterianos associados aos desfechos das doenças foi dificultada devido a diversidade genética, entretanto, foram localizadas regiões específicas que aumentam o risco de carcinogênese (ONO et al., 2019).

A ilha de patogenicidade *cag*-PAI constitui uma região do genoma da *H. pylori*, de aproximadamente 40kb de DNA cromossômico, composto de até 32 genes que formam um sistema de secreção do tipo IV. Esse sistema está presente na maioria das espécies bacterianas e é utilizado para a translocação de produtos bacterianos diretamente para o citoplasma da célula hospedeira. A *cag*-PAI foi adquirida através de um evento de transferência horizontal de DNA por um ancestral cerca de 60.000 anos e pode ser dividido em duas regiões, *cag* I (16 genes) e *cag* II (14 genes) (ANSARI et al., 2019; YANOVISH et al., 2019).

- Gene *cagA*

O gene *cagA* foi o primeiro marcador genético encontrado na região de *cag* I, a direita da ilha de patogenicidade *cag*-PAI. Essa proteína de 120 a 140-kDa atua como um antígeno altamente imunogênico que interage com proteínas das células hospedeiras, induzindo mudanças morfológicas (ANSARI et al., 2019). As cepas *cagA* positivas tendem a ser mais virulentas e estão associadas aos casos clínicos mais graves, como úlceras duodenais e câncer gástrico (NEJATI et al., 2018; DAVARPANAH et al., 2019). Além disso, induzem níveis mais altos de expressão de citocinas, tais como IL-1b e IL-84, causam mudanças na estrutura celular e também são responsáveis pela desregulação da polaridade, da proliferação celular e do processo mitótico, agindo como uma engrenagem na desregulação de múltiplas vias de sinalização celular (MURATA-KAMIYA, 2011; COSTA et al., 2015). Estudos relatam que a

relação de antígenos em amostras *cagA* positivas e o cancer gástrico foi maior que em outros antígenos estudados, destacando a importância de compreender a associação da infecção com o fenótipo *cagA* para prevenção do câncer gástrico (MUSHEN et al., 2019).

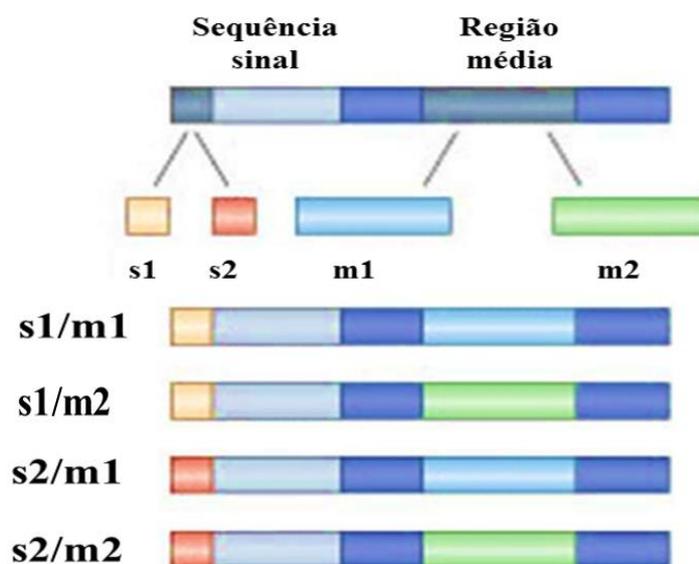
- Gene *cagM*

O gene *cagM* é um marcador da região *cagII* (HSU et al., 2002), localizado a esquerda da ilha *cag*-PAI. Sua importância pode ser observada pela alta frequência em doenças gástricas (PACHECO et al., 2008). A proteína codificada por este gene atua como agente indutor do fator nuclear kB (NFkB), que está associada a produção de IL-8 (ISRAEL et al., 2018). Além disso, esse gene codifica proteínas envolvidas na repressão por HK α e está envolvida na repressão da transcrição de enzimas, inibindo significativamente a secreção de ácido gástrico pelas células. Diante do exposto, a expressão de *cagM* representa uma primeira linha de defesa de *H. pylori* contra o ácido gástrico (SAHA et al., 2010; LING et al., 2013). Alguns estudos relataram que a presença desse gene está diretamente associada aos casos de úlceras pépticas e câncer gástrico (LAI et al., 2013; KHATOON et al., 2017).

- Gene *vacA*

O gene *vacA* é uma importante toxina composta de dois domínios funcionais (p33) e de ligação (p55), secretada pelo patógeno que pode induzir múltiplas atividades celulares, tais como a vacuolização da célula, formação de canais na membrana, interrupção das funções endossomais e lisossomais, apoptose e imunomodulação (FAHIMI et al., 2017; ISRAEL et al., 2018; STERBENC et al., 2019). Apesar de estar presente em todas as cepas de *H. pylori* o gene *vacA* apresenta sequências diferenciadas quando geneticamente relacionadas ao desenvolvimento de doenças gástricas, apresentando dois tipos de regiões: a região de sinal (*s1* e *s2*) e a região média (*m1* e *m2*) (Figura 4), que possuem diferentes atividades de vacuolação, sendo classificado em 4 linhagens, incluindo: *s1m1*, *s1m2*, *s2m2* e *s2m1* (BIBI et al., 2017). Em geral, a combinação alélica *vacA s1m1* produzem grandes quantidades de toxina e induzem maior atividade vacuolante no epitélio gástrico, quando comparado ao genótipo *vacA s1m2*, em contrapartida, a combinação *vacA s2m1* é rara e a *vacA s2m2* produz pouca ou nenhuma toxina (MARTÍNEZ-CARRILLO et al., 2014; MENDONZA-ELIZALDE et al., 2016). As cepas de *H. pylori* foram divididas em dois grupos: tipo I (*cag* + / *vacA s1m1*) que estão mais associadas ao adenocarcinoma gástrico e suas lesões pré-malignas, e tipo II (*cag* - / *vacA s2m2*) que induz menos inflamação e dano tecidual (KORONA-GLOWNIAK et al., 2019).

Figura 4 Polimorfismo do gene *vacA* do *H. pylori*.



Fonte: Adaptado de Blank. 2005.

- Gene *oipA*

O gene *oipA* codifica uma proteína inflamatória externa de aproximadamente 33 a 35 kDa (LANDARANI et al., 2014). O estado funcional desse gene está associado a expressão funcional dessa proteína inflamatória, que é regulado por um sistema baseado na quantidade de repetições dos dinucleotídeos CT na região 5', que indicará se o gene está ativado (*oipA* “on”) ou desativado (*oipA* “off”) (BRAGA et al., 2019). As cepas que expressam a proteína em seu estado “ativado” são associadas a um risco mais elevado de doenças, como úlcera duodenal e câncer gástrico (SALLAS et al., 2018). Além de desempenhar um papel significativo na colonização da mucosa, promovendo a indução de IL-8, facilitando a aderência bacteriana às células epiteliais e conseqüentemente o processo inflamatório, a proteína tem sido associada a redução da expressão da IL-10 e da maturação de células dendríticas, contribuindo para o alto nível de carga bacteriana, estabelecendo uma infecção crônica. (MIFTAHUSSURUR et al., 2017).

2.4 ASPECTOS CLÍNICOS

O *H. pylori* é o principal agente etiológico das doenças gastrointestinais (DHAR et al., 2016). Após sua descoberta na década de 80, foi possível relacionar a presença do patógeno com as gastrites e doença ulcerosa péptica (SIQUEIRA et al., 2007). Na década seguinte, através dos relatos de infecções associadas aos casos de câncer gástrico, foi classificado com um agente carcinógeno humano tipo I (CHMIELA et al., 2017).

2.4.1 Gastrites

A infecção pelo *H. pylori* é considerada a principal causa da gastrite, sendo a primeira condição relacionada a colonização (BIE et al., 2019). A inflamação inicialmente desenvolvida ocorre na superfície da mucosa, quando a acidez do estômago é neutralizada por intermédio de uma reação química envolvendo a uréia presente no lúmen gástrico e a uréase sintetizada pelo microrganismo (TAKAHASHI-KANEMITSU et al., 2019). Após a colonização, a interação ocorrida com as células epiteliais gástricas ativadas estimulam a produção de citocinas inflamatórias, especialmente a IL-8 (LIMA et al., 2011; MA et al., 2017). Durante esse processo, também ocorre ativação dos mastócitos que contribuem para a liberação de ativadores inflamatórios, promovendo o aumento da permeabilidade vascular e migração dos leucócitos. Esta fase é caracterizada como gastrite aguda (ANDERSEN 2007). Nesse estágio, o quadro clínico do paciente é variável, durante ou após o período de incubação pode se desenvolver sintomas, tais como, náuseas, vômitos, dor epigástrica e pirose, que duram cerca de uma a duas semanas (CARRASCO et al., 2013).

O déficit na resposta imunológica para erradicar a bactéria contribui para o aumento de células inflamatórias, onde a infiltração neutrofílica e proliferação de polimorfonucleares por alguns dias altera o padrão da gastrite aguda para crônica (SIPPONEN et al., 2015). A infecção pelo *H. pylori* é altamente significativa quando relacionada aos casos de gastrite crônica, sendo considerado o principal fator etiológico da doença (LAHNER et al., 2019; MANDAL et al., 2019). Nesse estágio, a apresentação clínica é caracterizada por uma condição assintomática, porém com evidente infiltrado inflamatório mononuclear, podendo acometer a mucosa do corpo, do antro ou ambas (ANDERSEN 2007).

A gastrite atrófica (GA) é considerada uma lesão pré-cancerosa, caracterizada pela diminuição ou perda das estruturas glandulares gástricas, contribuindo conseqüentemente para o desenvolvimento da metaplasia intestinal (CHOI et al., 2018; LAHNER et al., 2019). Estudos demonstram a associação entre a infecção por *H. pylori* e o desenvolvimento de GA, e confirmam que a lesão desenvolvida é essencial na cascata de desenvolvimento do câncer gástrico (PLUMMER et al., 2007; SHIN et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

2.4.2 Úlcera péptica

A úlcera péptica é caracterizada por uma inflamação crônica que ultrapassa a camada submucosa, resultando em cicatrizes. É classificada em úlcera gástrica ou úlcera duodenal, de acordo com a região do estômago que são encontradas (GRAHAM et al., 2014). A úlcera

duodenal procede da gastrite, forma mais comum causada pela infecção por *H. pylori* (TOPI et al., 2020). Alterações hormonais regulatórias também estão associados a essa inflamação (NURITDINOV et al., 2002). A somatostatina, produzida pelas células D pode sofrer influência do *H. pylori*, inativando as células G, e assim facilitando a produção excessiva de gastrina, favorecendo a secreção de ácido e constituindo a base patogênica para o surgimento da doença ulcerosa (AHMED et al., 2019). Em contrapartida, a úlcera gástrica é derivada, principalmente, da gastrite corporal, contribuindo para o desenvolvimento de atrofia gástrica e metaplasia intestinal (GRAHAM et al., 2014). A úlcera gástrica duodenal tem o *H. pylori* presente em 90% dos casos, localizando-se preferencialmente no antro gástrico próximo a incisura angularis. Sua patogenia é pouco entendida, porém sabe-se que o fato da localização da inflamação ser mais comum em corpo e antro, o processo inflamatório fica mais evidente, pois é sítio preferencial de colonização da bactéria (ATHERTON 2006).

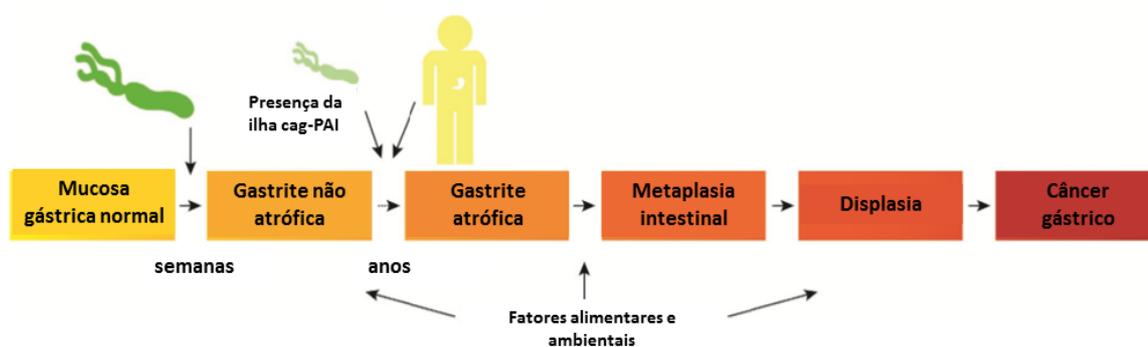
2.4.3 Câncer gástrico

O câncer gástrico é um dos tipos de cânceres mais comuns em todo o mundo, considerado a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer (AMORIM et al., 2014). O *H. pylori* é o seu principal agente etiológico, destacando sua importância desde 1994, quando a Agência de Pesquisa em Câncer definiu a bactéria com carcinógeno tipo I (SANTOS et al., 2015). Durante o diagnóstico inicial, a maioria dos pacientes apresentam a doença em estágio avançado, resultando em uma baixa sobrevivência global (BAO et al., 2019). O processo inflamatório é a base de toda carcinogênese. A produção de radicais livres, apoptose e morte das células epiteliais necróticas são fatores que estão associados ao desenvolvimento do câncer gástrico (WANG et al., 2015). Baseados em aspectos morfológicos, vários sistemas de classificação histológica têm sido propostos, no entanto, a classificação de Lauren é a mais utilizada, que divide o adenocarcinoma gástrico em dois tipos: intestinal e difuso (SEDEF et al., 2019).

Outros mecanismos envolvidos na indução à carcinogênese envolvem a ativação pelo *H. pylori* do Fator Nuclear (NF- κ B) e inativação de genes supressores de tumor, como o p53, onde sua inativação por mutações é registrada em casos de câncer gástrico e sua associação com indivíduos infectados com genótipo *cagA* do *H. pylori* é comum (YONG et al., 2015). Vários fatores etiológicos do hospedeiro (genéticos e epigenéticos) e ambientais, como a dieta rica em sal, obesidade, hiperglicemia e tabagismo podem estar envolvidos no desenvolvimento do câncer gástrico, contudo, a infecção por *H. pylori* continua sendo um dos

principais fatores ambientais causadores desse tipo de neoplasia (NEGOVAN et al., 2019; SONG et al., 2019). Estudos sugerem que esses fatores a interação entre os fatores bacterianos, a resposta do hospedeiro e fatores ambientais são essenciais para o surgimento de alterações genéticas de protooncogenes e genes supressores do tumor, favorecendo o desenvolvimento da cascata carcinogênica (CORREA et al., 2011). (Figura 5).

Figura 5 Cascata carcinogênica.



Fonte: Adaptado de Irsael et al., 2018.

2.4.4 Outras doenças

O *H. pylori* está envolvido em outras doenças gástricas, como os linfomas do tecido linfoide associado à mucosa gástrica (MALT), que são um grupo de linfomas de células B que podem surgir no estômago, pulmões, tireóide e outros órgãos (SALAR 2019). Apesar do aumento na incidência desse linfoma recentemente descrito, os linfomas MALT gástricos são uma neoplasia pouco frequente, geralmente induzido pela infecção com *H. Pylori* (MATYSIAK-BUDNIK et al., 2019). A ação da bactéria ocorre através da estimulação antigênica com inflamação do tipo pangastrite, considerado comum linfoma de baixo grau. Um estudo demonstrou que casos de Linfoma MALT foram revertidos histologicamente após tratamento realizado e erradicação do *H. pylori* (DU et al., 2002).

O *H. pylori* também está associado a etiologia de outras doenças. A deficiência de ferro de causa indefinida e a trombocitopenia tem sido associado a infecção desse microrganismo e sua erradicação mostra o aumento dos níveis de hemoglobina e plaquetas em pacientes infectados (VENDT et al., 2011; FRANCESCHI et al., 2019). Manzón et al. observaram a anemia por deficiência de ferro em 38,1% de casos positivos para *H. pylori*. Papagiannakis et al. (2013) analisando estudos que evidenciavam a resposta plaquetária após erradicação, observaram uma variação entre 13 a 100% dos casos.

2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de infecção por *H. pylori* incluem testes invasivos e não invasivos, sendo esse último grupo de maior acessibilidade (WANG et al., 2015). Os métodos não invasivos incluem teste respiratório da ureia, teste de excreção urinária, antígenos em fezes ou resposta de anticorpos como um marcador da doença, porém, a utilização de antígenos específicos e a presença de outros microrganismos que hidrolisam ureia diminuem a especificidade e a sensibilidade do diagnóstico (DELGADO et al., 2017). Os métodos invasivos são mais utilizados, tais como, a análise histológica de biópsias através do exame de Endoscopia Digestiva Alta (EDA), que permite a realização do teste rápido da uréase e o isolamento da cultura da *H. pylori* (MIRANDA et al., 2019).

A cultura de *H. pylori* é considerada padrão ouro para determinação e susceptibilidade aos antibióticos *in vitro*, contudo, devido as exigências do microrganismo, que possui crescimento lento, esse método não é utilizado na rotina da maioria dos laboratórios clínicos (ROJAS et al., 2013; LEE et al., 2017). O exame histopatológico se destaca por fornecer informações adicionais como a presença da gastrite e grau de inflamação, presença de metaplasia e displasia intestinal, linfoma MALT gástrico e câncer. As limitações dessa técnica incluem a experiência do patologista, o tipo de coloração e a densidade do *H. pylori*, que varia nos diferentes locais podendo levar ao resultado falso negativo (POHL et al., 2019; SYAHNIAR et al., 2019). Com o avanço das técnicas, métodos moleculares têm sido realizados para determinação de diagnóstico. A reação em cadeia da polimerase (PCR) em conjunto com a análise histológica, que pode ser realizada através de amostras de biópsia gástrica, suco gástrico, placa dentária, saliva, cultura e fezes, são considerados testes de alta sensibilidade e especificidade (MAKRISTATHIS et al., 2019).

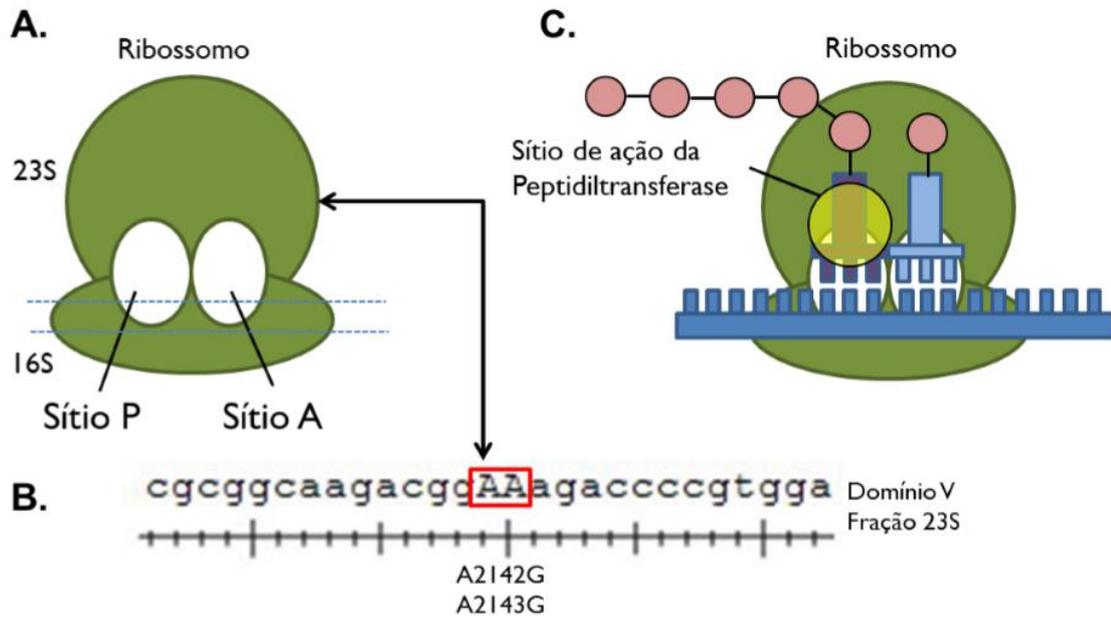
2.6 TRATAMENTO

A terapia tripla utilizada no tratamento empírico de primeira linha, compreende a combinação de claritromicina (CLA) utilizado como componente central, amoxicilina (AMX), metronidazol (MTZ) e um inibidor da bomba de prótons (IBP) (PARRA-SEPÚLVEDA et al., 2019). Contudo, as taxas de erradicação variam de acordo com o nível de prevalência de resistência a antibióticos em determinadas áreas geográficas (HASHEMI et al., 2019). Estudos revelam que a erradicação do *H. pylori* é complexa e tem apresentado falhas em todo o mundo (KIM et al., 2013), destacando a alta resistência a claritromicina que atinge cerca de 25% das cepas em vários países, sendo considerado o principal fator de risco

para falha no tratamento (PICHON et al., 2019). Estudos recentes realizados na Europa apresentaram 19% e 20,9% de isolados resistentes (BARONI et al., 2018; MORILLA et al., 2019). Um levantamento realizado em dados de países do Vietnã mostrou que a resistência da claritromicina pode chegar a 34,1% (KHIEN et al., 2019). No Brasil, estudos recentes apresentaram a resistência em até 16,9% dos isolados (SANCHES et al., 2016; MARTINS et al., 2016; VIANNA et al., 2018). A elevada taxa de falha na terapia é observada, principalmente devido a bomba de efluxo de drogas, mecanismo que dificulta a ligação do antimicrobiano ao alvo nas bactérias e à aquisição de mutações pontuais do *H. pylori*, sendo este último considerado o principal mecanismo de resistência (MÉGRAUD et al., 2007; HUANG et al., 2019). Esse mecanismo está relacionado ao uso frequente ou inadequado dos antimicrobianos utilizados na prática clínica, que podem exercer pressão seletiva sobre cepas resistentes (KIM et al., 2015).

A claritromicina é um macrólido que apresenta boa estabilidade ácida e absorção na camada mucosa gástrica. O antibiótico interage com a peptidil transferase no domínio V da subunidade 23S RNAr, suprimindo a atividade do ribossomo bacteriano e inibindo a síntese de algumas proteínas da bactéria (MÉGRAUD et al., 2015; SANCHES et al., 2016) (Figura 6). Porém, fatores geográficos apresentam variações nessa resistência (SANTOS et al., 2015), que está associada a mutações pontuais ocorridas no domínio V do gene 23S RNAr, dentre elas a transição (A → G) ocorrida nas posições 2142 e 2143, são consideradas as principais mutações encontradas em 81% das cepas resistentes à claritromicina (CAMBAU et al., 2009; ONG et al., 2019).

Figura 6 Representação do mecanismo de resistência do *H. pylori* a claritromicina. A: Esquema representativo das frações 23S do ribossomo e sítios de ligação P e A. B: Sequência parcial do domínio V da fração 23S RNAr, destacando os nucleotídeos associados as mutações. C: Esquema representativo do ribossomo destacando em amarelo o sítio de ação da peptidiltransferase (sítio P).



Fonte: Suzuki., 2013.

3 JUSTIFICATIVA

Doenças gastrointestinais associadas à presença do *H. pylori* estão relacionadas aos diferentes fatores de virulência e a resistência a antimicrobianos, os quais interferem com a evolução da doença e favorecem o crescimento bacteriano. Devido à problemática encontrada diante da infecção por *H. pylori* e da ausência de relatos clínicos recentes, evidencia-se a necessidade de novos estudos que possam avaliar o perfil molecular das cepas de *H. pylori* em Recife-PE, identificando seus principais fatores de virulência, resistência e alterações genéticas que possam tornar esses isolados mais agressivos nas infecções gástricas.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Pernambuco, sob o número de protocolo CAAE 94004818.3.0000.5208 (Anexo I), observando as normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde. Foram incluídos neste estudo apenas aqueles indivíduos submetidos ao exame de Endoscopia Digestiva Alta (EDA), que após serem informados sobre a pesquisa, concordaram em participar dela, assinando espontaneamente o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo II).

4.2 AMOSTRAS E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os fragmentos de biópsias das regiões de antro e corpo do estômago foram obtidos por demanda espontânea no período de outubro de 2018 a março de 2019. As amostras foram obtidas de pacientes atendidos no hospital de referência em gastroenterologia, localizado em Recife-PE. Os dados histopatológicos foram extraídos dos laudos patológicos, presentes nos respectivos prontuários dos pacientes.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram inclusos pacientes de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que receberam atendimento especializado no referido hospital por ocasião da entrada referente a realização do exame de Endoscopia Digestiva Alta (EDA) e que apresentaram alterações na mucosa do estômago, sendo confirmadas posteriormente pelo laudo histopatológico.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo pacientes internados ou que foram submetidos a tratamento recente com uso da claritromicina, e fragmentos de biópsias que não foram fornecidos em armazenamento adequado ou não estiveram devidamente armazenados.

4.5 BIÓPSIAS GÁSTRICAS E IDENTIFICAÇÃO DA *H. pylori*

As coletas das biópsias foram realizadas por profissional médico, sem interferência ou contato de quaisquer profissionais vinculados ao exercício dessa pesquisa. As amostras das regiões de corpo e antro do estômago foram obtidas por demanda espontânea. A partir das

amostras foram extraídos o DNA total, em seguida foi identificado a presença do *H. pylori*, analisando *in vitro* seu perfil genético de virulência e resistência.

As biópsias gástricas foram fornecidas em tubos secos, em até 4 horas após a coleta os fragmentos foram conduzidos ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), para armazenamento a -80°C até o momento da extração. A identificação bacteriana foi realizada pela técnica de PCR através do gene *ureC* F-5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3 R-5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC -3' (294kb). Todo o material genético foi mantido a -20°C no laboratório de pesquisa para realização das análises.

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico foi extraído dos fragmentos de biópsias congelados utilizando brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), adaptado do método de Foster e Twell (1996). A extração de DNA foi realizada nos fragmentos de corpo e antro de cada paciente. De acordo com este método, os fragmentos do tecido foram macerados com auxílio de pistilo esterilizado em microtubos de 2 ml e, em seguida, adicionou-se o tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA; 100 mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,2% de 2Mercaptoetanol), obedecendo-se proporção de 400 µl de tampão de extração para cada tudo contendo tecido. Após esta etapa as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 10 minutos, submetendo os tubos a algumas inversões. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 min e em seguida o sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionando volume igual de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) para purificação, seguido novamente de centrifugação a 13000 rpm por 5 min. Essa etapa é realizada duas vezes. Em seguida, a fase superior foi transferida para outro microtubo de 2 ml e o DNA foi precipitado com o mesmo volume de isopropanol à 100%. Após essa etapa as amostras foram armazenadas à -20°C por 30 min e em seguida foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 min. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 1 ml de etanol 70% gelado e centrifugado a 13000 rpm por 2 min. Após essa etapa desprezou-se o etanol e o DNA foi exposto a temperatura ambiente com os tubos abertos e invertidos por 20 min. Depois de seco, o DNA foi ressuscitado em 30 µL de água milli-Q estéril e armazenado à -20°C. A integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Além disso, a quantidade de DNA foi determinada usando o fluoroscópio NanoDrop™ 3300.

4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A amplificação dos genes *vacA*, *cagA*, *cagM*, *oipA* e 23S RNAr foi realizada pela técnica de PCR convencional utilizando o conjuntos de primers mostrados na Tabela 1. As reações de amplificação foram realizadas segundo instruções do kit Taq DNA polimerase (Promega), com um volume total de 25 µL por tubo, compreendendo 1µL de DNA genômico a 20ng/µL, 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase, 0,75 µl de MgCl₂, 1 µl dos primers (10 pmol), além de 2,5 µl de tampão (10x). As amplificações foram realizadas seguindo protocolo utilizado pela equipe, em termociclador (Biometra), utilizando a seguinte ciclagem: 5 minutos a 96°C para desnaturação, seguido de 35 ciclos consistindo em cada ciclo de 1 minuto a 96°C para desnaturação, 1 minuto a temperatura otimizada para anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão. Após os 35 ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C. Para a visualização dos resultados, os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com 3 µL de Blue green (LGC Biotecnologia) e migrados com tampão TBE 0,5x em cuba de eletroforese horizontal por 25 minutos, sob as seguintes condições: 100V, 150mA, 400W. Os produtos da amplificação foram visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador (Transiluminator LOCCUS biotecnologia – L. PIX) e em seguida fotos documentadas. Como controle positivo foram utilizadas duas amostras positivas (corpo e antro) para *H. pylori*, onde foram identificados e sequenciados todos os genes do estudo.

Tabela 1 Conjunto de iniciadores para amplificação dos genes *cagA*, *cagM*, *vacA*, *oipA* e 23S RNAr.

Genes	Sequências primers	Temperaturas de anelamento	Produtos de PCR	Referências
<i>cagA</i>	F-5'ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3' R-5'TTAGAATAATCAACAAACATAACGCCAT-3'	56°C	297pb	Rasheed et al., 2016
<i>cagM</i>	F-5'ACAAATACAAAAAAGAAAAAGAGGC-3' R-5'ATTTTCAACAAGTTAGAAAAAGCC-3'	52°C	587pb	Rasheed et al., 2016
<i>vacA</i> s1/s2	F-5'ATGGAAATACAACAAACACAC-3' R-5'CTGCTTGAATGCGCCAAAAC-3'	54°C	259/286pb	Bibi et al., 2017
<i>vacA</i> m1/m2	F-5'ATGGAAATACAACAAACACACG-3' F-5'CTGCTTGAATGCGCCAAA-3'	56°C	567/642pb	Sarma et al., 2018
<i>oipA</i>	F-5'GTTTTTGATGCATGGGATTT-3' R-5'GTGCATCTCTTATGGCTTT-3'	55°C	401pb	Ranjbar et al., 2018
23S RNAr	F- 5'CCACAGCGATGTGGTCTCAG-3' R-5'CTCCATAAGAGCCAAAGCCC-3'	56°C	425pb	Agudo et al., 2010

4.8 SEQUENCIAMENTO

Para a confirmação dos genes, alguns amplicons foram sequenciados utilizando o kit ExoSAP-IT®, conforme instruções do fabricante, no qual 5µL do produto da PCR foi adicionado a 2µL da enzima ExoSAP-IT e incubadas em termociclador a 37°C por 15 min e a 80°C por mais 15 min. O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado com amostras de DNA fita dupla, através do método de Sanger et al. (1970) que consiste na adição de didesoxiribonucleotídeos marcados que impedem o crescimento de um fragmento de DNA em replicação pela DNA polimerase. Utilizando primers iniciadores, a partir do molde, a enzima adiciona o nucleotídeo complementar ao grupo hidroxila livre (OH) na posição 3', componente do desoxinucleotídeo anterior. Para identificar a sequência de uma molécula de DNA, adiciona-se a essa reação didesoxinucleotídeos (ddNTP). Durante os ciclos de polimerização, os ddNTPs vão sendo incorporados aleatoriamente, produzindo fragmentos de tamanhos diferentes. A mistura de fragmentos é submetida a uma eletroforese para separação por tamanho. Em sequenciadores automáticos, os diferentes ddNTPs são ligados a moléculas fluorescentes, que quando estimuladas por raio laser, emitem diferentes comprimentos de ondas, sendo reconhecidas por programas apropriados e convertidas a determinada base nitrogenada (A, T, G ou C).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Além da análise descritiva dos dados, utilizou-se o programa PRISM® versão 5.0 para a realização das análises estatísticas. O teste de Qui-Quadrado (χ^2) foi utilizado para comparar variáveis entre a prevalência dos genes de virulência nas amostras de corpo e antro. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA VARIÁVEL BIOLÓGICA DOS PACIENTES E DADOS HISTOPATOLÓGICOS

No período de outubro de 2018 a março de 2019, foram coletadas amostras do corpo e do antro gástrico de 91 pacientes submetidos a EDA e que apresentaram alterações na mucosa gástrica. As amostras foram avaliadas para identificação da presença do *H. pylori* através da análise histológica. Dos 91 pacientes coletados, quarenta e cinco (49,5%) encontraram-se positivos com a presença do bacilo em suas amostras. Dos pacientes positivos, os homens foram mais frequentes 20/30 (44,4%), porém, não houve diferença significativa entre a taxa de infecção entre mulheres e homens, e em relação a faixa etária 31 pacientes acima de 44 anos (68,8%) de idade encontraram-se infectados (Tabela 2).

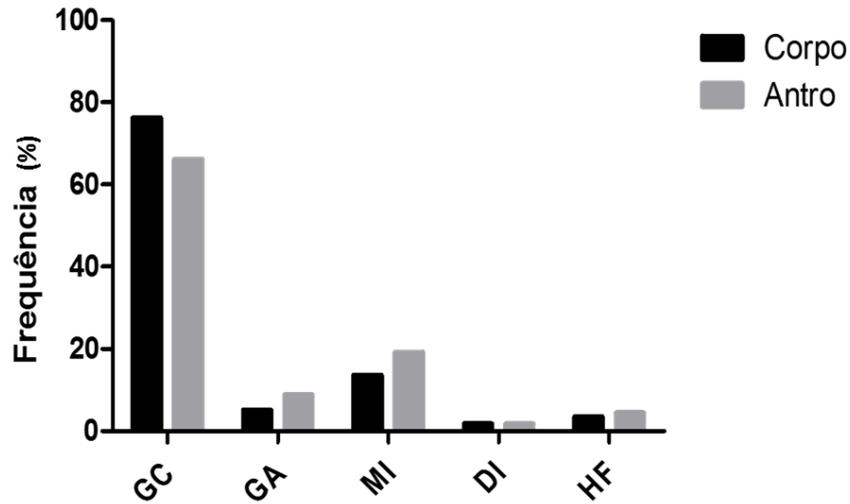
Tabela 2 Relação entre resultados histopatológicos e dados biológicos dos pacientes.

	Casos analisados		Diagnóstico <i>H.pylori</i>			
	n (total)	%	Positivo	%	Negativo	%
	91	100	45	49,5	46	50,5
Sexo						
Feminino	61	67	25	55,6	36	59
Masculino	30	33	20	44,4	10	16,3
Idade						
18-24	2	2,19	1	2,2	1	2,17
24-34	8	8,79	5	11,1	3	6,52
34-44	15	16,4	6	13,3	9	19,5
> 44	58	63,7	31	68,8	27	58,6
Não informados	8	8,79	2	4,44	6	13,0

Na avaliação histológica dos 91 pacientes analisados, foram encontrados 45 pacientes com laudos positivos para *H. pylori*. A partir da análise feita nas amostras das regiões do estômago (corpo e antro), foi possível avaliar pacientes apresentando mais de um achado histopatológico. Das 45 amostras obtidas da região do corpo foi possível observar 59 alterações gástricas classificadas da seguinte forma: 45 (76,2%) gastrites crônicas, 3 (5,08%) gastrites atróficas, 8 (13,5%) metaplasias, 1 (1,69%) displasia e 2 (3,88%) hiperplasias foveolares. Das 45 amostras da região do antro foi observado 68 alterações gástricas, caracterizadas como

45 (66,1%) gastrites crônicas, 6 (8,82%) gastrites atróficas, 13 (19,1%) metaplasias, 1 (1,4%) displasia e 2 (3,88%) hiperplasias faveolar (Figura 7).

Figura 7 Representação dos tipos das alterações gástricas nas amostras das regiões do corpo e antro em pacientes positivos para *H. pylori*.



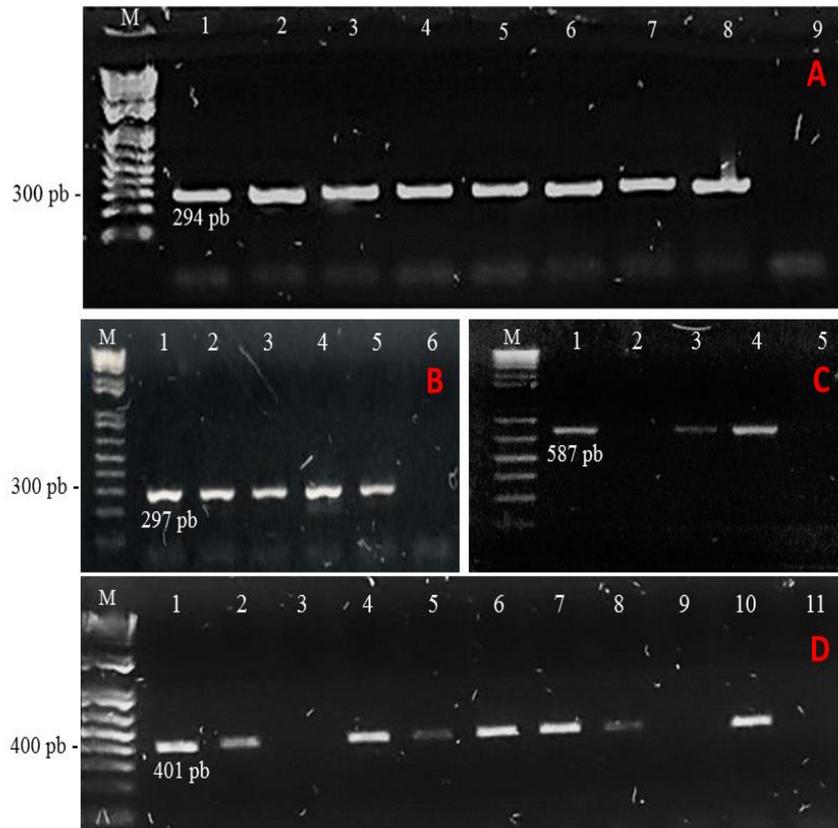
Distribuição de pacientes positivos para *H. pylori* positivos em diferentes grupos de resultados clínicos. GC: gastrite crônica; GA: gastrite atrófica; MI: metaplasia intestinal; DI: displasia intestinal; HF: hiperplasia faveolar.

Das 45 amostras analisadas foi detectada a presença do gene *ureC* (Figura 9A) em 100% (45/45) e 95,5% (43/45) das amostras da região do corpo e antro respectivamente.

5.2 DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS POSITIVAS PARA *H. pylori*

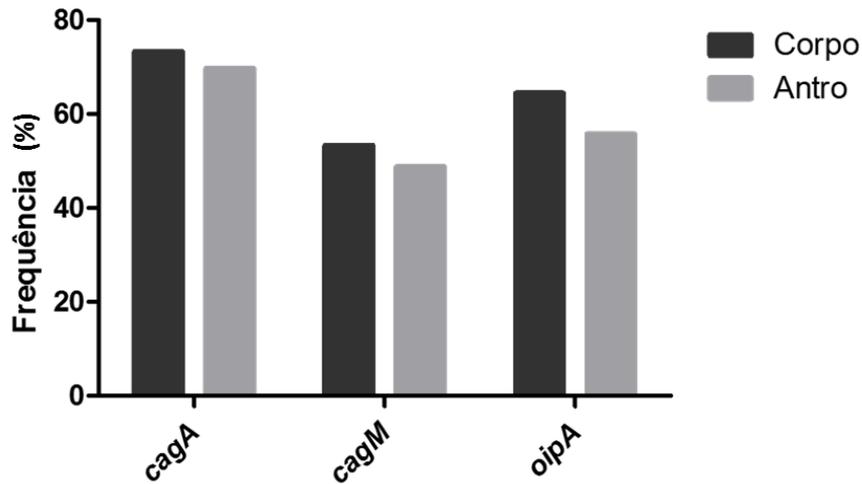
A amplificação dos genes foi realizada em todas as biópsias do estômago positivas para o *H. pylori* (Figura 8).

Figura 8 Eletroforese em gel para os produtos de PCR específicos para os genes *ureC*, *cagA*, *cagM* e *oipA* em alguns isolados de *H. pylori*.



M: marcador; (9A) 1: controle positivo para *ureC*, 2,3,4,5,6,7 e 8: amostras positivas, 9: controle negativo; (9B) 1: controle positivo para *cagA*, 2,3,4 e 5: amostras positivas, 6: controle negativo; (9C) 1: controle positivo para *cagM*, 2: amostra negativa, 3 e 4: amostras positivas, 5: controle negativo; (9D) 1: controle positivo para *oipA*, 3,9: amostras negativas, 2,4,5,6,7,8 e 10: amostras positivas, 11: controle negativo.

Na região do corpo o gene de virulência *cagA* foi detectado em 33/45 (73,3%), o *cagM* em 24/45 (53,3%) e o *oipA* em 29/45 (64,4%) amostras. Na região do antro o *cagA* foi detectado em 30/43 (69,7%), o *cagM* em 21/43 (48,8%) e o *oipA* em 24/43 (55,8%) amostras. Sendo observado a partir destes resultados que a região do corpo e antro não apresentaram diferença significativa na prevalência dos genes ($p= 0.96$) (Figura 10).

Figura 9 Frequência dos genes de virulência da *H. pylori*.

O gráfico representa a prevalência dos genes nas regiões de corpo (45/100%) e antro (43/100%).

5.3 DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO ALÉLICA DO GENE *vacA*

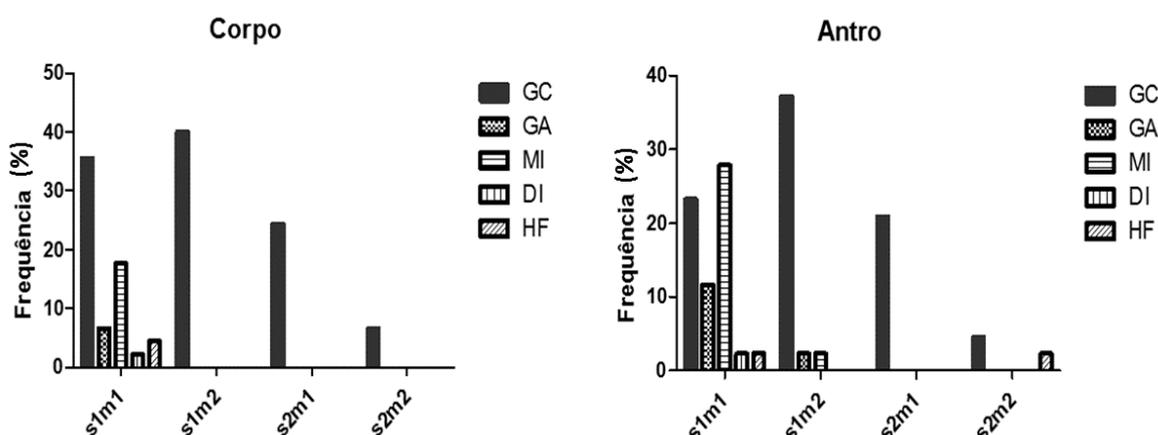
O alelo *vacA s1* foi expresso em 31/45 (71,1%) nas amostras da região de corpo e 29/43 (67,4%) na região do antro. O *vacA s2*, expresso em 12 amostras nas regiões de corpo (26,6%) e antro (27,9%) respectivamente. Já os alelos *s1* e *s2* foram expressos em 2 amostras em ambas regiões sendo, (4,4%) e (4,6%). A ocorrência deste gene na região média foi 21/45 (46,6%) para o *m1* na região do corpo e 21/43 (48,8%) na região do antro. Para o *m2*, 3/45 (6,6%) no corpo e 2/43 (4,6%) no antro. Os alelos *m1* e *m2* foram detectados em ambas regiões 21/45 (46,6%) no corpo e 20/43 (46,5%) no antro (Tabela 3).

Tabela 3 Resultado dos alelos presentes no gene *vacA* nas regiões de corpo e antro.

Alelos <i>vacA</i>	Frequência	
	Corpo n= 45 (%)	Antro n= 43 (%)
<i>vacA s1</i>	31 (71,1)	29 (67,4)
<i>vacA s2</i>	12 (26,6)	12 (27,9)
<i>vacA s1/s2</i>	2 (4,4)	2 (4,6)
<i>vacA m1</i>	21 (46,6)	21 (48,8)
<i>vacA m2</i>	3 (6,6)	2 (4,6)
<i>vacA m1/m2</i>	21 (46,6)	20 (46,5)

A combinação alélica *vacA s1/m1* foi expressa em 30/45 (66,6%) amostras da região do corpo e 29/43 (67,4%) do antro, encontradas em todos os grupos de alterações histopatológicas. O *vacA s1/m2* foi encontrado em 18/45 (40%) das amostras do corpo, associados apenas aos casos de gastrite crônica. Já na região do antro, foi encontrado 16/43 (37,3%) das amostras associados aos casos de gastrite crônica, metaplasia e atrofia. A combinação *vacA s2/m1* foi expressa em 11/45 (24,4%) e 9/43 (20,9%) das amostras do corpo e antro respectivamente, associadas apenas aos casos de gastrite crônica. O *vacA s2/m2* foi detectado em 3/45 (6,6%) e 3/43 (6,9) casos de gastrite crônica em ambas regiões. Sendo observado a presença desta combinação em um caso de hiperplasia na região do antro (Figura 10).

Figura 10 Frequência da combinação alélica do gene *vacA* nas regiões de corpo e antro.



GC: gastrite crônica; GA: gastrite atrófica; MI: metaplasia intestinal; DI: displasia intestinal; HF: hiperplasia faveolar.

5.4 RESISTÊNCIA A CLARITROMICINA

A avaliação da suscetibilidade à claritromicina foi realizada pela análise de sequência do gene 23S RNAr em amostras da região do corpo e antro. Porém, não houve diferença entre as regiões. No geral, 8 das 45 (17,7%) amostras continham pelo menos um ponto de mutação em suas sequências de 23S RNAr. As mutações predominantes entre os isolados resistentes à claritromicina foram de 13,3% (A2143G) e a presença das duas mutações (A2142G e A2143G) em 4,4% dos casos (4,4%).

Tabela 4 Resultado encontrado das mutações A2142G e A2143G em isolados de *H. pylori*.

Pontos das Mutações	n (%)
A2142G	-

A2143G	6 (13,3%)
A2142G + A2143G	2 (4,4%)

6 DISCUSSÃO

Em nossos resultados a maioria dos pacientes positivos para *H. pylori* encontraram-se na faixa etária acima de 44 anos de idade, sendo este o grupo que apresentou maior positividade. Um quantitativo relativamente menor foi observado na faixa etária de 34 a 44 anos, corroborando com estudos recentes de Frang et al. (2019) que detectou a bactéria em indivíduos mais velhos comparado-se aos mais jovens. No Brasil um estudo mostrou maior prevalência da infecção entre pacientes de 40 a 60 anos de idade (TOSCANO et al., 2018). A menor frequência de pacientes com idade >44 anos pode ser explicada pelo fato da coleta ter sido realizada em hospital público, no qual predominam indivíduos de baixa renda, que na maioria dos casos buscam realizar a EDA quando a doença já apresenta estágio avançado.

Apesar de vários relatos apontarem que a prevalência do *H. pylori* é igualmente encontrada entre homens e mulheres, neste estudo, embora o maior número de participantes corresponda ao sexo feminino, os homens apresentaram maior positividade, o mesmo observado por Trindade et al. (2017), Toscano et al. (2018) e Afsharpooyan (2019), quando também relataram em seus estudos os homens como o grupo de maior positividade. Pan et al. (2019) em seu trabalho teve como maior grupo de participantes e positividade indivíduos do sexo masculino, sugerindo através de estudos mais recentes a possível variação existente entre os gêneros e a relevância de novos estudos epidemiológicos que apresentem com clareza essa diferença e os possíveis fatores relacionados.

No presente estudo foi investigado a presença do *H. pylori* em alterações histopatológicas, identificando-se uma positividade relevante entre as alterações encontradas e a presença do *H. pylori*, em quase 50% (45/91) dos pacientes. Um estudo com desenho experimental semelhante ao nosso, realizado na Itália detectou o *H. pylori* em 52,1% das amostras analisadas (BASSO et al., 1996). Estudo similar realizado no Ceará detectou o microrganismo em 68% das amostras de biópsias (LIMA et al., 2011). Em outros países, estudos recentes detectaram o *H. pylori* em 50,7% e 64,9% (SHETTY et al., 2019; YANOVICH1 et al., 2019), confirmando a variação da infecção em diferentes áreas geográficas.

Nosso estudo foi o primeiro a realizar identificação histológica e molecular separadamente nas regiões de corpo e antro, com base nos resultados histopatológicos, apesar de não apresentar diferença significativa, no geral, a região do antro apresentou maior quantidade de alterações histopatológicas. Sendo coerente com Montecucco e Rappuoli (2001) e Quaglia et al. (2018), isso pode ser justificado pela preferência da colonização do *H.*

pylori na região do antro, por ser um ambiente mais adequado para sua colonização e sobrevivência.

Em nosso estudo não houve diferença da presença do *H. pylori* nas duas regiões avaliadas através da técnica molecular, diferenciando dos achados de Johannessen et al. (2013) que utilizou a PCR em tempo real em seu estudo mostrando que a presença do *H. pylori* no antro foi de 1,83 vezes maiores que no corpo. No presente estudo a avaliação da prevalência dos genes de virulência do *H. pylori* não apresentou diferença significativa entre as regiões ($p= 0.96$), porém revelou que o gene *cagA*, *cagM*, *oipA* e a combinação *vacA s1m1*, encontram-se associados às alterações descritas, corroborando com estudos de identificação realizados por Lai et al. (2013) e Sarma et al. (2017).

O *cagA* é um dos genes de virulência mais estudados do *H. pylori*, a positividade obtida no nosso estudo nas regiões de corpo (73,3%) e antro (69,7%) estão de acordo com achados anteriores na cidade do Recife, por Brito et al. (2003) onde o *cagA* apresentou alta prevalência em amostras de gastrites analisadas através de laudos endoscópicos. Como também pesquisas Brasileiras realizadas nas regiões norte e nordeste, onde o *cagA* foi relatado de forma expressiva (VINAGRE et al., 2015; SOUZA et al., 2018). O *cagM* é necessário para a translocação da proteína *cagA*, sua importância pode ser observada pela alta frequência em doenças gástricas (LIA et al., 2013). Nosso estudo identificou o gene em 53,3% dos isolados de corpo e 48,8% de antro. Um estudo semelhante detectou 51,5% da presença desse gene em casos de gastrite atrófica (YANOVICH et al., 2019). Outros estudos envolvendo alterações relevantes como úlceras pépticas e câncer gástrico detectaram o *cagM* em 47,8% das amostras (KHATOON et al., 2017). Em nosso estudo, o *cagA* associado ao *cagM* foi observado em 72,7% (corpo) e 70% (antro) das amostras, sugerindo o uso de ambos como marcadores para presença da ilha *cag-PAI*, assim como em estudo realizado por Yanovich et al. (2019).

No presente estudo a citotoxina vacuolizante (*vacA*) encontrou-se presente em todas as amostras avaliadas para *H. pylori*, sendo a combinação alélica *vacA s1m1* encontrada em todos os grupos de alterações histopatológicas em ambas regiões. Nosso estudo foi realizado apenas em pacientes com dispepsia funcional e gastrite, confirmados através de exames histológicos. Encontrou-se alta prevalência de cepas *s1m1*, cepas que estão frequentemente associados a casos de câncer gástrico como demonstrado nos estudos de Ki et al. (2014) e Abdi et al. (2016).

Avaliando a combinação *s1m2* observamos uma semelhante associação em ambas regiões nos casos de GC, assim como em *s1m1*. Foi encontrado também associação nos

grupos de alterações histopatológicas da GA, MI e HF, apenas na região do antro. Situação já citada anteriormente em casos de gastrite analisados por Cavalcante et al. (2012) e em estudos que comprovam a relação dessa combinação com doenças gástricas, confirmando sua presença em até 50% das amostras analisadas, valores semelhantes ao observado por nossos grupos (LINK et al., 2017). As combinação *s2m1* e *s2m2* estiveram associadas a poucos casos, corroborando com estudos onde a prevalência dessa variação não ocorreu ou ocorreu em baixo percentual (HONARMAND-JAHROMY et al., 2015; YADEGAR et al., 2015; EL-KHLOUSY et al., 2016). Esses resultados corroboram com características patogênicas desse gene, uma vez que, cepas com genótipos *s1m1* e *s1m2* são consideradas altas e moderadas produtoras de toxinas, respectivamente. Em contrapartida as cepas com genótipo *s2m2* produzem baixas concentrações de toxina. Além disso, a combinação *s1m1* é tóxica para uma maior quantidade de células epiteliais quando comparadas a combinação *s1m2* (MARTÍNEZ-CARRILLO et al., 2014; MENDONZA-ELIZALDE et al., 2016).

Avaliando a prevalência da proteína inflamatória A (*oipA*) foi detectada sua presença em mais de 50% nas amostras da região do corpo e antro. Esses dados estão em concordância com um estudo realizado por Saeidi et al. (2017) que identificou o gene em 52,6% de isolados obtidos de pacientes acometidos por doenças gástricas. Outros estudos detectaram o gene *oipA* em menor quantidade em isolados de *H. pylori* (HEMMATINEZHAD et al., 2016; RANJBAR et al., 2016). Um estudo no Brasil identificou o gene *oipA* em 79% das amostras de pacientes acometidos por gastrite crônica e câncer gástrico (SALLAS et al., 2018). A variação existente para o status positivo desse gene entre as regiões do país, assim como em outros países, aponta a necessidade de mais estudos que avaliem a prevalência e a associação do gene aos casos de doenças gástricas.

As transições nas posições A2142G e A2143G conferem resistência a claritromicina e são predominantes em isolados clínicos como já descrito por Stone et al. (1996) e Versalovic et al. (1996). Em nosso estudo, as mutações foram detectadas em 17,7% das amostras analisadas nas regiões de corpo e antro dos pacientes, sendo considerado o primeiro estudo com maior índice de resistência no Brasil. Nossos dados corroboram com uma pesquisa brasileira realizada por Sanches et al. (2016) que avaliou a presença das mutações A2142G e A2143A em biópsias de corpo e antro nas regiões Sul, Sudeste, Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. Um percentual menor foi encontrado em estudos realizados em São Paulo, onde a claritromicina estava presente em 12,5% e 8,7% das amostras (MARTINS et al., 2016; VIANNA et al., 2018). Estudos realizados em outros países já apresentam uma maior resistência, justificando através desses achados a variação da resistência encontrada em

diferentes áreas geográficas. (SALVODI et al., 2018; SEO et al.,2019). Diante disso, evidencia-se a necessidade de ampliar estudos nas regiões, que possam contribuir para uma possível mudança na terapia padrão, como recomendado pela maioria dos consensos e, além disso, realizar testes de sensibilidade antes da erradicação do *H. pylori* em cada indivíduo infectado.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Em nosso estudo observamos uma associação significativa do *H. pylori* em amostras de pacientes acometidos por doenças gástricas;
- Observamos uma alta prevalência dos genes de virulência, previamente relatados como os principais marcadores do *H. pylori*, em todos os grupos de alterações histopatológicas;
- Encontramos uma associação significativa entre a combinação alélica *s1m1* do gene *vacA* e os grupos de alterações histopatológicas encontrados;
- A combinação *s1m2* foi encontrada em alguns casos de GA e MI, sugerindo a importância de novos estudos que avaliem também a associação dessa combinação aos casos mais graves de doenças gástricas;
- Observamos uma alta prevalência da resistência do *H.pylori* à claritromicina devido a substituições de nucleotídeos A2142G e A2143G no do 23S RNAr em Recife-PE.

REFERÊNCIAS

- ABDIE. et al. *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin Genotypes and Preneoplastic Lesions or Gastric Cancer risk: a meta-analysis. **Journal Gastroenterology Hepatology**. v. 31, p.734-744, 2016.
- ABDULLAH.M. et al. VacA promotes CagA accumulation in gastric epithelial cells during *Helicobacter pylori* infection. **Scientific Reports**. v.9, n.38, 2019.
- AFSHARPOOYAN.S; MOHAMMADIAN.T. et al. Seroepidemiology study of *helicobacter pylori* infection and its effect on cardiovascular diseases in Karaj, Iran. **Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy**. v.8, n.6, 2019.
- AGUDO.S. et al. High Prevalence of Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* Strains and Risk Factors Associated with Resistance in Madrid, Spain. **Journal of Clinical Microbiology**. v.48, n.10, p. 3703–3707, 2010.
- AHMED.S; BELAYNEH.Y.M. *Helicobacter pylori* And Duodenal Ulcer: Systematic Review Of Controversies In Causation. **Clinical and Experimental Gastroenterology**. v.12, p.441-447, 2019.
- ALIA. et al. Pan-Genome Analysis of Human Gastric Pathogen *H. pylori*: comparative genomics and pathogenomics approaches to identify regions associated with pathogenicity and prediction of potential core therapeutic targets. **BioMed Research International**. 2014.
- AMORIM.C.A. et al. Ecological study of gastric cancer in Brazil: Geographic and time trend analysis. **Word Journal of Gastroenterology**. v.20, n.17, p. 5036-5044, 2014.
- ANDERSEN.L.P. Colonization and infection by *Helicobacter pylori* in humans. **Helicobacter**. v.2, n. 2, p.12–15, 2007.
- ANNIBALE.E. et al. A current clinical overview of atrophic gastritis. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**. DOI: 10.1080/17474124.2020.1718491. 2020.
- ANSARI. S; YAMAHA.Y. *Helicobacter pylori* virulence factors exploiting gastric colonization and its pathogenicity. **Toxins**. v.11, n.677, 2019.
- ARCHAMPONG.T.N. et al. *Helicobacter pylori* cagA and vacA genes in dyspeptic Ghanaian patients. **BMC Research Notes**. v.10, n.231, 2017.
- ATHERTON.J.C. The Pathogenesis of *Helicobacter pylori* – induced gastro-duodenal diseases. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease**. v.1, p.63-96, 2006.
- BAGHERI.N. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* virulence factors in Iranian patients with gastrointestinal diseases. **Microbial Pathogenesis**. v.100, p.154-162, 2016.
- BAKHTI.S.Z. et al. Inverse association of *Helicobacter pylori* cag-PAI genotypes with risk of cardia and non-cardia gastric adenocarcinoma. **Cancer Medicine**. v.8, p. 4928–4937, 2019.

- BAO.B. et al. Identification of subtype-specific three-gene signature for prognostic prediction in diffuse type gastric cancer. **Frontiers in Oncology**. v. 9, n.1243, 2019.
- BARONI.M.R. et al. Utilidade de amostras rápidas de teste de urease para análise molecular da resistência à claritromicina em *Helicobacter pylori*. **Revista Argentina de Microbiologia**. v.50, n.4, p.359-364, 2018.
- BASSO.D. et al. Gastric juice polymerase chain reaction: an alternative to histology in the diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. **Blackwell Science**. v.1, n.3, p. 159-164, 1996.
- BASTOS.J. et al. Sociodemographic determinants of prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in Portuguese adults. **Helicobacter**. v.18, n.6, p.413-422, 2013.
- BIBI.F. et al. Detection and genotyping of *Helicobacter pylori* among gastric ulcer and cancer patients from Saudi Arabia. **Pakistan Journal of Medical Sciences**. v. 33, n.2, p.320-324, 2017.
- BIE.M. Phylogenetic analysis of clinical strains of *Helicobacter pylori* isolated from patients with gastric diseases in Tibet. **Ann Transl Med**. v.7, n.14, p.320, 2019.
- BRAGA.L.L.B.C. et al. oipA "on" status of *Helicobacter pylori* is associated with gastric cancer in North-Eastern Brazil. **BMC Cancer**. v.19, n.1, p.48, 2019.
- BRAY.F. et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Cancer Journal for Clinicians**. v.68, p.394–424, 2018.
- BRITO.C.A.A. Prevalence of cagA and vacA genes in isolates from patients with *helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.98, n.6, p.817-821, September 2003.
- CAMBAU.E. et al. Evaluation of a New Test, Genotype HelicoDR, for Molecular Detection of Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.47, n.11, p.3600–3607, 2009.
- CARRASCO.G; CORVALAN.A. *Helicobacter pylori* -Induced Chronic Gastritis and Assessing Risks for Gastric Cancer. **Gastroenterology Research and Practice**. 2013.
- CASTILLO.M. *Helicobacter Pylori* Detected in Tap Water of Peruvian Patients with Gastric Cancer. **Helicobacter in Water and Gastric Cancer**. v.20, n. 11, p.3193-3196, 2019.
- CAVALCANTE.M.Q.F. et al. *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**. v. 107, n.4, p.561-563, 2012.
- CHEY.W.D. et al. ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. **American Journal Gastroenterology**. v.112, p.212-238, 2017.

- CHOLIJ. et al. *Helicobacter pylori* Therapy for the Prevention of Metachronous Gastric Cancer. **New England Journal of Medicine**. v.378, n.12, p.085-1095, 2018.
- CHUNG.W.C. et al. Dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR using tissue samples from the rapid urease test kit for the detection of *Helicobacter pylori* in bleeding peptic ulcers. **Digestive and Liver Disease**. v.48, n.8, p.899-903, 2016.
- CORREA.P; PIAZUELO.M.B. *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Adenocarcinoma. **US Gastroenterology Hepatology Rev**. v.7, n.1, p.59–64, 2011.
- DAVARPANAHA.A. et al. Circulating concentration of interleukin-37 in *Helicobacter pylori* -infected patients with peptic ulcer: Its association with IL-37 related gene polymorphisms and bacterial virulence factor CagA. **Cytokine**. v.126, p.154928, 2019.
- DELGADO.J.S. Update on the management of *Helicobacter pylori* infection. Position paper from the Catalan Society of Digestology. **Gastroenterology Hepatology**. v.41, n.4, p.272-280, 2017.
- DU.M.Q. et al. Molecular biology of gastric MALT lymphoma: application in clinical management. **Hematology**. v.7, n.6, p.339-44, 2002.
- EL-KHLOUSY.M. et al. Study of the clinical relevance of *Helicobacter pylori* virulence genes to gastric diseases among Egyptian patients. **Arab Journal of Gastroenterology**. 2016.
- ESTEVAM. B.R. et al. Modulation of Galectin-3 and Galectin 9 in gastric mucosa of patients with chronic gastritis and positive *Helicobacter pylori* infection. **Pathology - Research and Practice**. v. 213, p.1276-1281, 2017.
- FAHIMI.F. et al. Pleiotropic cytotoxicity of VacA toxin in host cells and its impact on immunotherapy. **BioImpacts**. v.7, n.1, p.59-71, 2017.
- FELICIANO.O. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, and iceA Genotypes in Cuban Patients with Upper Gastrointestinal Diseases. **BioMed Research International**. 2015.
- FOSTER.G.D., TWELL.D.J. Plant gene isolation: principles and practice. England: Wiley; 1996.
- FRANCESCHI.F. et al. Revisão: *Helicobacter pylori* e doenças extragástricas. **Helicobacter**. 2019.
- FRANG.Y.J. et al. Accuracy of rapid *Helicobacter pylori* antigen tests for the surveillance of the updated prevalence of *H. pylori* in Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**. DOI:10.1016/j.jfma.2019.12.003. 2019.
- GRAHAM.D.Y. History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**. v.20, n.18, p.5191-5204, 2014.

- HANAFIAH.A. et al. Molecular characterization and prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Kuala Lumpur, Malaysia. **Infection and Drug Resistance**. v. 12, p.3051–3061, 2019.
- HASHEMI.S.J. et al. Genetic basis for metronidazole and clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with gastroduodenal disorders. **Infection and Drug Resistance**. v.12, p.535–543, 2019.
- HEMMATINEZHAD.B. et al. VacA, cagA, iceA and oipA genotypes status and antimicrobial resistance properties of *Helicobacter pylori* isolated from various types of ready to eat foods. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v.15, v.15, n.2, 2016.
- HONARMAND-JAHROMY.S. et al. Reciprocal impact of host factors and *Helicobacter pylori* genotypes on gastric diseases. **World Journal Gastroenterology**. v.21, n.31, p.9317-27, 2015.
- HOOIJ.K.Y. et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: Systematic Review and Meta-analysis. **Gastroenterology**. v.153, p.420–429, 2017.
- HSU.P.I. et al. Clinical presentation in relation to diversity within the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. **American Journal of Gastroenterology**. v.97, n.9. p.2231-8, 2002.
- HUANG.W. et al. Development of novel nanoantibiotics using an outer membrane vesicle-based drug efflux mechanism. **Journal Pre-proof**. 2019.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativas 2020: Incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 10. Fev. 2020.
- ISRAEL.D.A; JÚNIOR.R.M.P. Mechanisms of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Inflammation. **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. 2018.
- JOHANNESSEN.R. et al. Polymerase chain reaction versus culture in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology Insights**. v.5, n.1, 2013.
- JOSENHANS.C; SUBERBAUM.S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**. v.1, n.8, p.605-14, 2002.
- KHATOON.J. et al. Association of heterogeneity of *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island with peptic ulcer diseases and gastric cancer. **British Journal of Biomedical Science**. v. 74, n.3, p.121-126, 2017.
- KHIEN.V.V. et al. Management of antibiotic-resistant *Helicobacter pylori* infection: Perspectives from Vietnam. **Gut and Liver**. v. 13, n. 5, p. 483-497, 2019.
- KI.M.R. et al. Role of vacuolating cytotoxin VacA and cytotoxin-associated antigen CagA of *Helicobacter pylori* in the progression of gastric cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.396, n.1-2, p.23-32. 2014.

- KIM.S.Y. et al. Antibiotic treatment for *Helicobacter pylori*: Is the end coming?. **World Journal Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**. v.6, n.4, p.183-198, 2015.
- KORONA-GLOWNIAK.I. et al. Antibiotic Resistance and Genotypes of *Helicobacter pylori* Strains in Patients with Gastroduodenal Disease in Southeast Poland. **Journal of Clinical Medicine**. v.8, n.7, 2019.
- LADEIRA.M.S.P. et al. Biopathology of *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.39, n.4, 2003.
- LAHNER.E. et al. Chronic atrophic gastritis: Natural history, diagnosis and therapeutic management. A position paper by the Otolian society of Hospital Gastroenterologists and Digestive Endoscopists [AIGO], the Italian society of Digestive Endoscopy [SIED], the Italian Society of Gastroenterology [SIGE], and the Italian Society of Internal Medicine [SIMI]. **Digestive and Liver Disease**. v.51, n.12, p.1621-1632, 2019.
- LANDARINI.Z. et al. Immunological detection of 34 KDa outer membrane protein as a functional form of OipA in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **Iranian Journal Microbiology**. v.6, n.5, p.324-329, 2014.
- ŁASZEWICZ.W. et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in Polish children and adults depending on socioeconomic status and living conditions. **Advances in Medical Sciences**. v.59, n.1, p.147-50, 2014.
- LEE.H.K. et al. Differences of Urease Activity and Expression of Associated Genes According to Gastric Topography. **Helicobacter**. v.16, p.20–26, 2011.
- LEE.J.H. et al. Nationwide antibiotic resistance mapping of *Helicobacter pylori* in Korea: A prospective multicenter study. **Helicobacter**. v.24, n.4, p.12592, 2017.
- LEE.J.Y. et al. Primary and secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Korea from 2003 to 2018. **Helicobacter**. 2019.
- LEJA.M. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and atrophic gastritis in Latvia. **European Journal Gastroenterology Hepatology**. v.24, n.12, p.1410-1417, 2012.
- LIMA.V.P. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (*vacA*, *cagA*, *cagE* and *virB11*) in gastric cancer in Brazilian's patients: an association with histopathological parameters. **Cancer Epidemiology**. v.35, n.5, p.32-7, 2011.
- LING.F. et al. The *Helicobacter pylori* Protein CagM is Located in the Transmembrane Channel That is Required for CagA Translocation. **Current Microbiology**. v.67, n.5, p.531-6, 2013.
- LINK.A. et al. *Helicobacter pylori vacA* genotype is a predominant determinant of immune response to *Helicobacter pylori* CagA. **Word Journal Gastroenterology**. v.23, n.26, p.4712-4723, 2017.
- MANDAL.A.K. et al. An association of *Helicobacter pylori* infection with endoscopic and histological findings in the Nepalese population. **Journal of Family Medicine and Primary Care**. v.8, n.3, p.1227-1231, 2019.

- MAKRISTATHIS.A. et al. Review: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**. v.24, n.1, p.12641, 2019.
- MALFERTHEINER.P. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. **Gut Pathogens**. v. 66, n.1, p.6-30, 2017.
- MARSHALL.B.J; WARREN.J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**. v. 16, n. 1(8390), p. 1311-5, 1984.
- MARSHALL.B. *Helicobacter pylori*: 20 years on. **Clinical medicine**. v.2, n.2, p.147-52, 2002.
- MARTÍNEZ-CARRILLO.D.N. et al. *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotype diversity and interferon gamma expression in patients with chronic gastritis and patients with gastric câncer. **Revista de Gastroenterologia do México**. v.79, n.4, p. 220-8, 2014.
- MARTINS.G.M. et al. Molecular detection of clarithromycin and fluoroquinolones resistance in *Helicobacter pylori* infection, directly applied to gastric biopsies, in an urban brazilian population. **Archives of Gastroenterology**. v. 53, n. 2, 2016.
- MATYSIAK-BUDNIK.T. et al. Gastric MALT lymphoma in a population-based study in France: clinical features, treatments and survival. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. DOI: 10.1111/apt.15409. 2019.
- MCCALLION.W.A. et al. Age dependent hypergastrinaemia in children with *Helicobacter pylori* gastritis--evidence of early acquisition of infection. **Gut**. v.37, n.1, p.35-8, 1995.
- MÉGRAUD.F. *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. **Gut**. v.56, n.11, p.1502, 2007.
- MÉGRAUD.F. et al. Molecular Approaches to Identify *Helicobacter pylori* Antimicrobial Resistance. **Gastroenterology Clinics of North America**. v.44, n.3, p.577-96, 2015.
- MELCHIADES.J.I. et al. Polymorphisms and haplotypes of the interleukin 2 gene are associated with an increased risk of gastric cancer. The possible involvement of *Helicobacter pylori*. **Cytokine**. v.96, p. 203-207, 2017.
- MENDONZA-ELIZALDE.S. et al. Diversification of the vacAs1m1 and vacAs2m2 Strains of *Helicobacter pylori* in Meriones unguiculatus. **Frontiers in Microbiology**. v.8, n.7, p.758, 2016.
- MIFTAHUSSURUR.M. et al. *Helicobacter pylori* as an oncogenic pathogen, revisited. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. v.19, n.4, 2017.
- MITCHELL.A. et al. Age-Specific *Helicobacter pylori* Seropositivity Rates of Children in an Impoverished Urban Area of Northeast Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.3, p.1326–1328, 2003.
- MIRANDA.A.C. et al. Gender, age, endoscopic findings, urease and *Helicobacter pylori*: all uncorrelated within a sample of a high gastric cancer prevalence population in Amazon. **Archives Gastroenterology**. v.56, n.3, 2019.

- MONTECUCCO.C; RAPPUOLI.R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.2, n.6, p.457-66, 2001.
- MOLINA-CASTRO.S. et al. Virulence factor genotyping of *Helicobacter pylori* isolated from Costa Rican dyspeptic patients. **Microbial Pathogenesis**. v.128, n.2019, p.276–280, 2019.
- MORILLA.A.M. Taxas de resistência antimicrobiana primária e prevalência de infecção por *Helicobacter pylori* no norte da Espanha. Um estudo retrospectivo de 13 anos. **Gastroenterology Hepatology**. v.42, n.8, p.476-485, 2019.
- MUHSEN.K. et al. Correlates of infection with *Helicobacter pylori* positive and negative cytotoxin-associated gene A phenotypes among Arab and Jewish residents of Jerusalem. **Epidemiology and Infection**. v. 147, n. 276, p. 1-9, 2019.
- MUKHERJEE.S. et al. Association of tobacco smoke–infused water (tuibur) use by Mizo people and risk of *Helicobacter pylori* infection. **Environmental Science and Pollution Research**. DOI: 10.1007/s11356-019-07543-3. 2019.
- NEGOVAN.A. et al. *Helicobacter pylori* and cytokine gene variants as predictors of premalignant gastric lesions. **World Journal Gastroenterology**. v.25, n.30, p.4105-4124, 2019.
- NEJATI.S. et al. Influence of *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders. **Microbial Pathogenesis**. v.117, p.43-48. 2018.
- NURITDINOV.A.T. et al. Acid production and factors of its regulation in patients with different results of ulcer surgical treatment. **Khirurgiia (Mosk)**. v.10, p.33-6, 2002.
- OGATA.S.K. et al. Development and validation of a whole-cell ELISA for serologically diagnosing *Helicobacter pylori* infection in Brazilian children and adults: a diagnostic accuracy study. **São Paulo Medicine Journal**. v.136, n.5, p.442-8, 2018.
- OHYAMA.H. et al. Rapidly declining trend of signet ring cell cancer of the stomach may parallel the infection rate of *Helicobacter pylori*. **BMC Gastroenterology**. v.19, n.178, 2019.
- ONG.S. et al. *Helicobacter pylori* eradication rates with concomitant and tailored therapy based on 23S rRNA point mutation: A multicenter randomized controlled trial. **Helicobacter**. DOI: 10.1111/hel.12654. 2019.
- ONO.T. et al. Comparative study between *Helicobacter pylori* and host human genetics in the Dominican Republic. **BMC Evolutionary Biology**. v.19, p.197, 2019.
- PACHECO, A.R. et al. Involvement of the *Helicobacter pylori* plasticity region and cag pathogenicity island genes in the development of gastroduodenal diseases. **European Journal of Clinical Microbiology**. v. 27, p. 1053-1059, 2008.
- PAN.W. et al. Association between *Helicobacter pylori* infection and kidney damage in patients with peptic ulcer. **Renal Failure**. v. 41, n.1, p.1028–1034, 2019.

- PAJAVAND.H. High Frequency of *vacA* s1m2 Genotypes Among *Helicobacter pylori* Isolates From Patients With Gastroduodenal Disorders in Kermanshah, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**. v.8, n.11, p.25425, 2015.
- PAPAGIANNAKIS.P. et al. The role of *Helicobacter pylori* infection in hematological disorders. **European Journal of Internal Medicine**. v.24, p.685-90, 2013.
- PARK.C.et al. Clinical relevance of point mutations in the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* eradication. **Medicine**. v. 99, n.33, 2018.
- PARRA-SEPÚLVEDA.C. et al. Antibiotic resistance surveillance of *Helicobacter pylori* at the Biobío region (Chile) in a decade. **Archives Gastroenterology**. v. 56 n.4, 2019.
- PELETEIRO.B. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. **Digestive Diseases and Sciences**. v.59, n.8, p.1698-709, 2014.
- PEREIRA.W.N. et al. Association among *H. pylori* virulence markers *dupA*, *cagA* and *vacA* in Brazilian patients. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v.20, n.1, p.1, 2014.
- PICHON.M. et al. First Detection in *Helicobacter suis* of a Mutation Conferring Resistance to Clarithromycin in *Helicobacter pylori*: Case Report and Review of the Literature. **Microbial Drug Resistance**. DOI: 10.1089/mdr.2019.0270. 2019.
- PLUMMER.M. et al. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated genotype and gastric precancerous lesions. **Journal of National Cancer Institute**. v.99, n.17, p.1328-34, 2007.
- POHL.D. et al. Review of current diagnostic methods and advances in *Helicobacter pylori* diagnostics in the era of next generation sequencing. **World Journal Gastroenterology**. v.25, n.32, p.4629-4660, 2019.
- QUACH.D.T. et al. *Helicobacter pylori* Infection and Related Gastrointestinal Diseases in Southeast Asian Countries: An Expert Opinion Survey. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v.19, n.12, p.3565-3569, 2018.
- QUAGLIA.N.C. et al. *Helicobacter pylori*: Survival in cultivable and non-cultivable form in artificially contaminated *Mytilus galloprovincialis*. **International Journal of Food Microbiology**. v.312, n. 108363, 2019.
- QUAGLIA.N.C; DAMBROSIO.A. *Helicobacter pylori*: a foodborne pathogen?.**World Journal Gastroenterology**. v.24, n.31, p.3472-3487, 2018.
- RAHMAN.M.M. et al. Association of *p53* Gene Mutation With *Helicobacter pylori* Infection in Gastric Cancer Patients and Its Correlation With Clinicopathological and Environmental Factors. **Mundo Journal of Oncology**. v.10, n.1, p.46-54, 2019.
- RANJBAR.R. et al. Phenotypic analysis of antibiotic resistance and genotypic study of the *vacA*, *cagA*, *iceA*, *oipA* and *babA* genotypes of the *Helicobacter pylori* strains isolated from raw milk. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**. v. 7, n.115, 2018.

- RASHEED.F. et al. Analysis of Clinical Isolates of *Helicobacter pylori* in Pakistan Reveals High Degrees of Pathogenicity and High Frequencies of Antibiotic Resistance. **Helicobacter**. v.19, n.5, p.387–399, 2014.
- RIZVI.F. et al. studies on Isoniazid Derivatives through a Medicinal Chemistry Approach for the Identification of New Inhibitors of Urease and Inflammatory Markers. **Scientific Reports**. v.9, p.6738, 2019.
- ROJAS.M.A.B. Microbiological conditions for culturing *Helicobacter Pylori*. **Rev Col Gastroenterology**. v.28, n.2, 2013.
- ROQUE.J.R.S. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in an indigenous community in São Paulo and associated factors: cross-sectional study. **São Paulo Medical Journal**. v.135, n.2, p.140-5, 2017.
- SAEIDI.Y. et al. Determination of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes in duodenal ulcer and gastric biopsies. **Medical Journal of the Islamic Republic of Iran**. v.31, n.95, 2017.
- SAHA.A. et al. *Helicobacter pylori* represses proton pump expression and inhibits acid secretion in human gastric mucosa. **Gut Pathogens**. v.59, n.7, p.874-81, 2010.
- SALAR.A. Gastric MALT lymphoma and *Helicobacter pylori*. **Medicin Clinic**. v.152, n.2, p.65-71, 2019.
- SALLAS.M.L. et al. Status (on/off) of oipA gene: their associations with gastritis and gastric cancer and geographic origins. **Archives of Microbiology**. 2018.
- SANCHES.B.S. et al. Detecção da resistência do *Helicobacter pylori* à claritromicina e fluoroquinolonas no Brasil : uma pesquisa nacional. **World Journal gastroenterology**. v. 22, n.33, p.7587-94, 2016.
- SANGER.F; BROWNLEE.G.G. Methods for determining sequences in RNA. **Biochemical Society Symposia**. v.30, p.183-97, 1970.
- SANTOS.A.A; CARVALHO.A.A. Pharmacological therapy used in the elimination of *Helicobacter pylori* infection: A review. **World Journal Gastroenterology**. v.21, p.139-154, 2015.
- SARMA.A. et al. Molecular characterisation of virulent gene *vacA* in *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients with gastroduodenal diseases in Assam, India. v. 36, n.2, p.178-185, 2018.
- SEDEF.A.M. et al. Addition of taxanes to combination chemotherapy in distal intestinal gastric cancer is more beneficial than proximal ones: A multicenter retrospective study of Turkish Oncology Group. **JBUON**. v.24, n.2, p.650-655, 2019.

SHETTY.V. et al. High resistance to metronidazole and levofloxacin, and a moderate resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* isolated from Karnataka patients. **Gut Pathogens**. v.11, n. 121, 2019.

SHIN.S.Y. et al. Chronic atrophic gastritis and intestinal metaplasia surrounding diffuse-type gastric cancer: Are they just bystanders in the process of carcinogenesis?. **Plos One**. 2019.

SIQUEIRA.J.S. et al. Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori* Revisão. **Research Gate**. v.39, n.1, p.9-13, 2007.

SILVA.H.A. et al. Comparison of one week and two weeks of triple therapy for the eradication of *Helicobacter pylori* in a Sri Lankan population: a randomised, controlled study. **Ceylon Medical Journal**. v.49, n.4, p.118-22, 2004.

SONG.M. et al. Autoimmune Diseases and Gastric Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Cancer Research and Treatment**. v.51, n.3, p.841-850, 2019.

STERBENC.A. et al. *Helicobacter pylori* virulence genes. **World Journal Gastroenterology**. v.25, n.33, p.4870-4884, 2019.

SUZUKI.R.B. et al. Different risk factors influence peptic ulcer disease development in a Brazilian population. **World Journal Gastroenterology**. v. 18, n.38, p.5404-5411, 2012.

SYAHNIAR.R. et al. Detecting the *Helicobacter pylori* 16S rRNA Gene in Dyspepsia Patients Using Real-Time PCR. **Acta Medica Indonesia**. v.51, n.1, 2019.

TOSCANO.E.P. et al. Epidemiological and Clinical-Pathological Aspects of *Helicobacter pylori* Infection in Brazilian Children and Adults. **Gastroenterology Research and Practice**. 2018.

TOPLS. et al. Gastric Cancer in History: A Perspective Interdisciplinary Study. **Cancers**. v. 12, n. 264, 2020.

TRINDADE.L.M. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in Samples of Gastric Biopsies. **Gastroenterology Research**. v.10, n.1, p.33-41, 2017.

TRUNG.T.T. et al. Value of CIM, CLO Test and Multiplex PCR for the Diagnosis of *Helicobacter Pylori* Infection Status in Patients with Gastritis and Gastric Ulcer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v.20, n.11, p.3497-3503, 2019.

VALA.M.H. et al. Evaluation of Clarithromycin Resistance Among Iranian *Helicobacter pylori* Isolates by E-Test and Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods. **Jundishapur Journal of Microbiology**. v.9, n.5, p.29839, 2016.

VENDT.N. et al. Iron deficiency and *Helicobacter pylori* infection in children. **Acta Paediatrica**. v.100, n.9, p.1239-43, 2011.

VIANNA.J.U. et al. Drug Resistance in *Helicobacter pylori*. **Archives of Gastroenterology**. v.53, n.4, 2016.

- VIANNA.J.S. The interplay between mutations in *cagA*, 23S rRNA, *gyrA* and drug resistance in *Helicobacter pylori*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.60, n.25, 2018.
- VINAGRE.I.D.F. et al. *Helicobacter pylori* infection in patients with different gastrointestinal diseases from northern Brazil. **Archives Gastroenterology**. v.52, n.4, 2015.
- WANG.Y. et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. **World Journal Gastroenterology**. v.21, n.40, p.11221-35, 2015.
- WHITMIRE.J.M. et al. *Helicobacter pylori* genetic polymorphisms in gastric disease development. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v.1149, p.173-194, 2019.
- YADEGAR.A. et al. Analysis of the intactness of *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island in Iranian strains by a new PCR-based strategy and its relationship with virulence genotypes and EPIYA motifs. **Infection, Genetics and Evolution**. v.35, p. 19-26, 2015.
- YANOVICH.O. et al. *Helicobacter pylori* genotypes among belarus patients with gastroduodenal disorders and their association with clinical outcome. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**. 2019.
- YONG.X. et al. *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways. **Cell Communication and Signaling**. v.13, n.30, 2015.
- ZHANG.H. et al. Cytotoxin-associated gene A increases carcinogenicity of *Helicobacter pylori* in colorectal adenoma. **The International Journal of Biological Markers**. 2020.
- ZHANG.M. et al. Biopsy strategies for endoscopic screening of pre-malignant gastric lesions. **Scientific Reports**. v.9, n.14909, 2019.
- ZHOU.Y. et al. High prevalence and low spontaneous eradication rate of *Helicobacter pylori* infection among schoolchildren aged 7-12 years. **Acta Paediatrica**. doi: 10.1111/apa.14387, 2018.

ANEXO A – PARECER CEP**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Caracterização dos genes de resistência e virulência de *Helicobacter pylori* obtidos de pacientes acometidos por gastrite crônica ou câncer gástrico.

Pesquisador: THAYNARA MILLENA DE OLIVEIRA BEZERRA

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 94004818.3.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.087.207

ANEXO B - TCLE**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **Caracterização dos genes de resistência e virulência de *Helicobacter pylori* obtidos de pacientes acometidos por câncer gástrico ou gastrite crônica**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Thaynara Millena de Oliveira Bezerra, com endereço Rua Patativa, nº 76 – Cruz de Rebouças, Igarassu/PE - Brasil, CEP: 53.625-546, telefone: (81) 98575-6556, e-mail: thaynaramillena22@gmail.com.

Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Dra. Dyana Leal Veras Telefone: (81) 2101.2693 e Dr. Fábio André Brayner dos Santos Telefone: (81) 2101.2693 do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ) e está sob a orientação de Luiz Carlos Alves Telefone: (81) 2101.2693, e-mail: able.lcalves390@gmail.com.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

O objetivo desta pesquisa é relacionado a obtenção de informações sobre a associação da bactéria (microrganismo) *Helicobacter pylori* frente a gastrite crônica, motivo pelo qual o senhor está sendo convidado a participar deste estudo. A realização desta pesquisa é importante, pois pretendemos obter um maior conhecimento sobre esta bactéria que pode causar doenças gastrointestinais, disponibilizando informações para o combate dessas infecções com base nas características do *H. pylori*.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com o pesquisador responsável antes da assinatura deste documento. Apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem fornecidos, caso concorde com a sua participação neste estudo e que assine este documento, necessitaríamos realizar uma coleta de pequenos fragmentos de tecido (biópsias) do seu estômago, durante a endoscopia solicitada pelo seu médico para acompanhamento do seu quadro clínico. Informamos ainda que nenhum procedimento será realizado sem necessidade de acompanhamento clínico do senhor. A retirada de pequenos pedaços do tecido do seu estômago será realizada independente de sua participação neste estudo para seu acompanhamento clínico. Se o senhor permitir, mais dois ou quatro fragmentos serão retirados, para utilização neste trabalho. A amostra coletada para realização deste trabalho será utilizada apenas para realização de testes em laboratório, para isolamento do microrganismo que desejamos analisar.

Após a realização da biópsia, o material coletado do seu estômago será encaminhado ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, localizado no Laboratório de Imunopatologia Keiso Azami (LIKA), no térreo do prédio do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ – PE, localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária. Uma vez no laboratório, o material da biópsia será utilizado para pesquisa e isolamento da bactéria *H. pilory*. Posteriormente o material de biópsia será descartado, não havendo armazenamento em laboratório do seu material biológico.

Os riscos que o senhor corre ao participar desta pesquisa estão associados com a coleta da amostra, que incluem: infecções e sangramentos. Estes riscos estão também vinculados ao procedimento solicitado

para o seu acompanhamento clínico, pela realização de endoscopia e biópsia, independente deste estudo. O presente projeto irá trabalhar para minimizar todo e qualquer risco sendo garantido o caráter confidencial da instituição de saúde onde será realizada a pesquisa assim como das informações contidas nos prontuários dos pacientes. Os pesquisadores se comprometem, portanto, em manter o sigilo de toda e qualquer informação pessoal ou que possa levar à identificação dos participantes da pesquisa ou Hospital relacionado ao estudo. Sendo assim, serão seguidos os preceitos éticos determinados pelo Conselho Nacional de Saúde (CNS) conforme a Resolução 466/12 que regulamenta as diretrizes de pesquisas envolvendo seres humanos.

Os benefícios obtidos com a realização desta pesquisa incluem a determinação do perfil epidemiológico relacionado a gastrite crônica, além das características genéticas de resistência e virulência dos isolados de *H. pylori* em pacientes com gastrite crônica, visando estabelecer subsídios teóricos aos órgãos de controle público em Recife-PE.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa tais como dados de prontuários, ficarão armazenados em computador sob a responsabilidade da pesquisadora Thaynara Millena de Oliveira Bezerra, no endereço Laboratório de Imunopatologia Keiso Azami (LIKA), no térreo do prédio do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ – PE, localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária., pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo Caracterização dos genes de resistência e virulência de *Helicobacter pylori* obtidos de pacientes acometidos por câncer gástrico e gastrite crônica, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

<p>Impressão digital (opcional)</p>

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura: