

BRUNA MARIA ROESLER

**DETECÇÃO E ANÁLISE DOS PADRÕES GENOTÍPICOS
DE CEPAS DO *Helicobacter pylori* EM AMOSTRAS DE
TECIDO GÁSTRICO OBTIDAS DE PACIENTES COM
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DISTAL DO TIPO
INTESTINAL NOS ESTÁGIOS PRECOCE E AVANÇADO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

2011



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**DETECÇÃO E ANÁLISE DOS PADRÕES GENOTÍPICOS
DE CEPAS DO *Helicobacter pylori* EM AMOSTRAS DE
TECIDO GÁSTRICO OBTIDAS DE PACIENTES COM
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DISTAL DO TIPO
INTESTINAL NOS ESTÁGIOS PRECOCE E AVANÇADO**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas. Sob orientação do Prof. Dr. José Murilo Robilotta Zeitune e Co-orientação da Prof^a. Dr^a. Sandra Cecília Botelho Costa.

Campinas, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

Unidade BRCL
T/UNICAMP
Cutter R629d
V. 1 Ed. 92300
Tombo BC
Proc. 16-150-2011
C D X
Preço 124 11,20
Data 24.10.8.2011
Cód. tit. 801865

Roesler, Bruna Maria

Deteção e análise dos padrões genotípicos de cepas do *Helicobacter pylori* em amostras de tecido gástrico obtidas de pacientes com adenocarcinoma gástrico distal do tipo intestinal nos estágios precoce e avançado. / Bruna Maria Roesler. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : José Murilo Robilotta Zeitune

Co-orientador : Sandra Cecília Botelho Costa

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Carcinogênese. 3. Fatores de virulência. 1. Zeitune, José Murilo Robilotta. II. Costa, Sandra Cecília Botelho. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em Inglês: Detection and analysis of different genotypes of *Helicobacter pylori* strains obtained from patients with early and advanced distal type intestinal gastric adenocarcinoma

Keywords: • *Helicobacter pylori*

- Carcinogenesis
- Virulence factors

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Área de Concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Murilo Robilotta Zeitune

Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira

Prof. Dr. Shoiti Kobayasi

Prof. Dra. Maria Aparecida Mesquita

Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

Data da defesa: 23.02.2011

14768571030

BANCA EXAMINADORA

Banca examinadora da tese de Doutorado

Bruna Maria Roesler

Orientador: Prof. Dr. José Murilo Robilotta Zeitune

Membros:

Profª. Drª. Carmen Silvia Bertuzzo

Profª. Drª. Maria Aparecida Mesquita

Prof. Dr. Shoiti Kobayasi

Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira

Prof. Dr. José Murilo Robilotta Zeitune

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/02/2011

DEDICATÓRIA

Para Antonella...

*“De todos os presentes da natureza
para a raça humana, o que é mais
doce para o homem do que as
crianças?”*

(Ernest Hemingway)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os dias de minha vida, mostrando caminhos, protegendo-me e guiando-me... *“Pedi, e vos será dado”* (Lucas 11,9)

Aos meus pais, Ederley e Salete, pelo apoio em todos os momentos, pelo carinho, pela dedicação e pelo amor incondicional... *“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”* (Fernando Pessoa)

À minha irmã, Flávia, por todo o incentivo e, mais importante do que tudo, simplesmente por ser minha irmã, grande amiga e companheira... *“Lembre-se que se algum dia você precisar de ajuda, você encontrará uma mão no final do seu braço. À medida que você envelhecer, você descobrirá que tem duas mãos – uma para ajudar a si mesmo, e outra para ajudar aos outros.”* (Audrey Hepburn)

À minha filhinha Antonella, por, mesmo sendo pequena, ter entendido meus momentos de ausência, sempre me esperando com um sorriso lindo nos lábios e com os bracinhos abertos a pedir meu colo... Ser criança é o que a gente nunca deveria deixar de ser...

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Murilo, que, mais do que um mestre, tornou-se um pai e um grande amigo... obrigada pela acolhida, pela compreensão, pelo apoio e por todos os ensinamentos... *“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”* (Leonardo da Vinci)

À Profa. Dra. Sandra Costa, por confiar no meu trabalho e na minha vontade de vencer...

Ao Wilson, pelo carinho e pelo incentivo na carreira acadêmica... e pela nossa pequena Antonella...

À amiga Sandra Helena Alves Bonon, pelo companheirismo e pelos ensinamentos sobre biologia molecular desde a época do mestrado...

À amiga e professora Ana Laura Remédio Zeni Beretta, por ter acreditado na minha capacidade durante o curso de Farmácia Bioquímica....

À minha avó Dina e às minhas tias Athélia e Gina, por estarem sempre presentes, torcendo pelas minhas conquistas e vitórias...

Aos meus tios Luiz Henrique e Ana Nilza, por acompanharem esse momento tão importante da minha carreira profissional...

À Renata, minha prima, pela leitura e acompanhamento da tese...

A todas as pessoas da minha família, que sempre apoiaram a realização de meus projetos...

Aos queridos amigos e estagiários do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia... agradeço pelos momentos gratificantes de companheirismo e ajuda mútua no árduo trabalho da pesquisa acadêmica...

À minha amiga Telma Barbosa de Oliveira, cuja ajuda foi imprescindível para o término da presente tese... obrigada também pelas risadas, pelas lágrimas e por todos os momentos em que estivemos juntas...

À Daniela Corte Parola, pela amizade e pelo auxílio no laboratório, especialmente com o computador....

À Eliane Cristina Magdalon, pela imprescindível e eterna amizade, e por estarmos sempre juntas tanto nos momentos difíceis quanto nas alegrias...

Ao Luciano Benjamin Gomez, por todos os momentos em que não estive presente, e por acreditar em meu potencial como pesquisadora...

À Ana Diva Correa, pela simpatia e alegria constantes, pelo trabalho eficiente na ajuda de quaisquer problemas e, principalmente, pelas palavras de carinho...

À Dra. Luciana Rodrigues de Meirelles, patologista do Gastrocentro, pela paciência em revisar as lâminas e blocos de parafina das amostras utilizadas nesse estudo...

Às biólogas Elizabeth Rabelo Gonçalves e Natalícia Hifumi Hara, do Laboratório de Bacteriologia e Hepatologia do Gastrocentro, pela prontidão em sempre ajudar, pela torcida e pelas palavras de apoio, que sempre se traduziram em amizade...

À técnica administrativa do Laboratório de Patologia do Gastrocentro, Judith Sandoval Magnussen, pela ajuda na árdua e demorada tarefa de pesquisa dos laudos dos pacientes determinados para o presente estudo...

Às biólogas do Laboratório de Patologia do Gastrocentro, Ana Lúcia Rosseto Pereira e Neusa Vieira Âmbar, pelo trabalho prestimoso e primoroso no cuidado e no armazenamento das amostras biológicas que fazem parte da presente tese...

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico (SAM) do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pelo auxílio e pela paciência na busca de tantos prontuários...

À secretária da Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica, Adriana Peredo Lisboa, pela ajuda...

Ao Sr. Hécio Hildebrandt, pela paciência e por me acompanhar desde a época dos vestibulares...

A todos os pacientes que possibilitaram a realização desse estudo, pessoas especiais, sem as quais esse trabalho não teria razão de ser...

Ao meu cãozinho, Frederico, eterna companhia!

À CAPES, pela bolsa de doutorado concedida

À FAPESP, pelos auxílios e reserva técnica utilizados para a compra dos materiais permanentes e de consumo utilizados no presente trabalho.

Trabalho realizado no Laboratório de Patologia do Centro de Diagnóstico de Doenças do Aparelho Digestivo – Gastrocentro, e pelo Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

EPÍGRAFE

*“Uma vez que você tenha experimentado voar,
você andar  pela terra com os olhos voltados para o céu,
pois l  você esteve e para lá você desejar  voltar.”*

(Leonardo da Vinci)

*“De tudo ficaram três coisas: a certeza de que
estava sempre começando, a certeza de que era
preciso continuar e a certeza de que seria
interrompido antes de terminar. Fazer da
interrup o um caminho novo. Fazer da queda
um passo de dança, do medo uma escada, do
sonho uma ponte, da procura um encontro.”*

(Fernando Sabino)

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	49
ABSTRACT	53
1- INTRODUÇÃO	57
1.1- <i>Helicobacter pylori</i>	60
1.1.1- Histórico	60
1.1.2- Diversidade genética e genoma	61
1.1.3- Características microbiológicas	63
1.1.4- Transmissão	64
1.1.5- Epidemiologia	66
1.1.6- Patogênese e fatores de virulência	68
1.1.6a- <i>vacuolating cytotoxin gene</i> (gene <i>vacA</i>)	69
1.1.6b- Ilha de patogenicidade <i>cag</i> (cagPAI), <i>cytotoxin associated gene A</i> (gene <i>cagA</i>), <i>cytotoxin associated gene T</i> (gene <i>cagT</i>)	71
1.1.6c- <i>duodenal ulcer promoting gene</i> (gene <i>dupA</i>)	74
1.1.7- Relação entre o <i>H. pylori</i> e as doenças humanas	75
1.1.7a- Doenças gastrointestinais	75
1.1.7b- Doenças extradigestivas	78

1.2- Câncer gástrico	80
1.2.1- Câncer gástrico precoce e avançado	80
1.2.2- Patologia do câncer gástrico	83
1.2.2a- Aspectos macroscópicos do adenocarcinoma gástrico precoce e avançado	83
1.2.2b- Aspectos microscópicos do adenocarcinoma gástrico precoce e avançado	84
1.2.3- Adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal, adenocarcinoma gástrico do tipo difuso e <i>H. pylori</i>	86
1.2.4- Associação entre os polimorfismos genéticos do hospedeiro, o gene p53 e o risco de desenvolvimento do câncer gástrico	89
1.2.5- Epidemiologia do câncer gástrico	91
1.2.6- Úlcera duodenal e câncer gástrico	93
1.2.7- A carcinogênese gástrica e a hipótese das células-tronco cancerosas	94
1.3- Tratamento de erradicação do <i>H. pylori</i> e relação com a prevenção do câncer gástrico	95
1.3.1- Diretrizes de tratamento	95
1.3.2- Erradicação do <i>H. pylori</i> e prevenção do câncer gástrico	99
1.3.3- Erradicação do <i>H. pylori</i> e câncer gástrico em modelos animais	101

1.4- Biologia molecular para o diagnóstico	102
2- OBJETIVOS	105
3- CASUÍSTICA	109
4- MÉTODOS	123
4.1- Extração de DNA de tecidos fixados e emblocados	
em parafina	126
4.2- Controle de qualidade do experimento	127
4.2.1- Quantificação do DNA extraído	127
4.2.2- PCR para detecção do gene da betaglobina humano	127
4.3- PCR para a região do gene urease C (<i>glmM</i>) do <i>H. pylori</i>	128
4.4- PCR para a região do gene vacA do <i>H. pylori</i>	129
4.5- Nested PCR para a região do gene cagA do <i>H. pylori</i>	131
4.6- PCR para a região do gene cagT do <i>H. pylori</i>	132
4.7- PCR para a região do gene dupA do <i>H. pylori</i>	133
4.8- Análise estatística	134
4.9- Normas de biossegurança	135
5- RESULTADOS	137
5.1- Extração e quantificação do DNA	139
5.2- PCR para o gene da betaglobina humana	139
5.3- PCR para a região do gene urease C (<i>glmM</i>) do <i>H. pylori</i>	140
5.4- Estatística descritiva da idade dos pacientes	144
5.5- Estatística descritiva do gênero dos pacientes	144
5.6- PCR para a região do gene vacA do <i>H. pylori</i>	145

5.6.1- Gene vacA região s	145
5.6.2- Gene vacA região m	148
5.6.3- Gene vacA s/m	149
5.7- Nested PCR para a região do gene cagA do <i>H. pylori</i>	150
5.8- PCR para a região do gene cagT do <i>H. pylori</i>	151
5.9- PCR para a região do gene dupA do <i>H. pylori</i>	152
5.9.1- Gene dupA jhp0917	152
5.9.2- Gene dupA jhp0918	153
6- DISCUSSÃO	161
7- CONCLUSÕES	177
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	183
9- ANEXOS	233
I - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (FCM UNICAMP)	235
II - Autorização para armazenamento de amostras biológicas	237
10- APÊNDICES	239
I - Tabela de pacientes com adenocarcinoma precoce	241
II - Tabela de pacientes com adenocarcinoma avançado	243

LISTA DE ABREVIATURAS

A	avanzado
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ATPase	enzima adenosina trifosfato
BabA	<i>blood group antigen binding adhesin</i>
° C	graus Celsius
C+	controle positivo
C-	controle negativo
CO ₂	gás carbônico
CagA	<i>cytotoxin associated protein</i>
cagPAI	<i>cag pathogenicity island</i>
CagA-SHP-2	complexo formado entre a proteína CagA e SHP-2
cagA +	gene cagA positivo
cagA -	gene cagA negativo
CagT	<i>cytotoxin associated protein T</i>
cagT +	gene cagT positivo
cagT -	gene cagT negativo
DNA	ácido desoxirribonucléico
dntp	desoxinucleotídios trifosfato
EDA	endoscopia digestiva alta
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EPIYA	domínio da região polimórfica carboxi-terminal da proteína CagA
EPIYA-A	subtipo A do EPIYA
EPIYA-B	subtipo B do EPIYA
EPIYA-C	subtipo C do EPIYA
EPIYA-D	subtipo D do EPIYA
F	<i>forward</i>
gene babA	<i>blood group antigen binding adhesin gene A</i>

gene babB	<i>blood group antigen binding adhesin gene B</i>
gene babC	<i>blood group antigen binding adhesin gene C</i>
gene cagA	<i>cytotoxin associated gene A</i>
gene cagT	<i>cytotoxin associated gene T</i>
gene dupA	<i>duodenal ulcer promoting gene</i>
gene oipA	<i>outer inflammatory protein gene</i>
gene p53	gene supressor tumoral
gene sabA	<i>sialic acid binding adhesin gene A</i>
gene sabB	<i>sialic acid binding adhesin gene B</i>
gene vacA	<i>vacuolating cytotoxin gene A</i>
gene virB7	gene pertencente ao genoma da <i>A. tumefaciens</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HCl	ácido clorídrico
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IL-1	interleucina-1
IL-1 β	interleucina-1 β
IL-8	interleucina-8
IL-10	interleucina-10
INCA	Instituto Nacional do Câncer
jhp0917	região jhp0917 do gene dupA
jhp0918	região jhp0918 do gene dupA
Kb	kilobases
kDa	kilodaltons
λ	absorbância
M	marcador de peso molecular (ladder)
m1, m2	alelos da região m do gene vacA
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i> (linfoma tipo MALT)
MARK2	<i>microtubule affinity-regulating kinase-2</i>
MB	megabases
mg	miligramas

MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitros
μm	micrômetros
N.A.	não avaliado
nested PCR	reação em cadeia da polimerase do tipo nested
NF-κB	fator de transcrição nuclear κB
ng/μL	nanogramas/microlitro
nm	nanômetros
O ₂	oxigênio
OipA	<i>outer inflammatory protein</i>
P	precoce
p33	domínio p33 do gene vacA
p55	domínio p55 do gene vacA
PAR1b	<i>partitioning-defective-1b</i>
pb	pares de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	potencial hidrogeniônico
PPIs	inibidores da bomba de prótons
PTI	púrpura trombocitopênica idiopática
R	<i>reverse</i>
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
s1, s2	alelos da região s do gene vacA
s1a, s1b, s1c	alelos da região s1 do gene vacA
SabA	<i>sialic acid binding adhesin</i>
SAM	Serviço de Arquivo Médico
SDS	dodecil-sulfato de sódio
SHP-2	<i>protein-tyrosine phosphatase 2</i>
SRE	<i>serum responsible element</i>
Tris	tri (hidroximetil) aminometano

TNF- α	fator de necrose tumoral α
ureC	urease C
VacA	<i>vacuolating cytotoxin A</i>
vacA s	<i>signal region</i> do gene <i>vacA</i>
vacA m	<i>middle region</i> do gene <i>vacA</i>
VirB4	proteína componente do sistema de secreção tipo IV da <i>A. tumefaciens</i>

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 01- Dados obtidos na endoscopia digestiva alta realizada pelos pacientes com diagnóstico prévio de adenocarcinoma gástrico distal precoce; data de coleta do tecido por biópsia e resultado da endoscopia	112
Tabela 02- Dados obtidos na endoscopia digestiva alta realizada pelos pacientes com diagnóstico prévio de adenocarcinoma gástrico distal avançado; data de coleta do tecido por biópsia e resultado da endoscopia	113
Tabela 03- Dados histopatológicos das amostras dos pacientes com adenocarcinoma gástrico precoce	116
Tabela 04- Dados histopatológicos das amostras dos pacientes com adenocarcinoma gástrico avançado	117
Tabela 05- Amostras provenientes dos pacientes do grupo controle	121
Tabela 06- Primers para detecção do gene da betaglobina humana	128
Tabela 07- Primers para PCR da região do gene urease C do <i>H. pylori</i>	129
Tabela 08- Primers para a PCR do gene vacA região s do <i>H. pylori</i>	130

Tabela 09-	Primers para a PCR do gene <i>vacA</i> região m1 do <i>H. pylori</i>	130
Tabela 10-	Primers para a PCR do gene <i>vacA</i> região m2 do <i>H. pylori</i>	131
Tabela 11-	Primers da primeira PCR e da nested PCR para a região do gene <i>cagA</i> do <i>H. pylori</i>	132
Tabela 12-	Primers para a PCR da região do gene <i>cagT</i> do <i>H. pylori</i>	133
Tabela 13-	Primers da PCR da região do gene <i>dupA</i> jhp0917 do <i>H. pylori</i>	134
Tabela 14-	Primers da PCR da região do gene <i>dupA</i> jhp0918 do <i>H. pylori</i>	134
Tabela 15-	Amostras positivas para <i>H. pylori</i> nos pacientes com adenocarcinoma gástrico precoce	141
Tabela 16-	Amostras positivas para <i>H. pylori</i> nos pacientes com adenocarcinoma gástrico avançado	142
Tabela 17-	Estatística da quantificação das amostras de DNA positivas para <i>H. pylori</i>	143
Tabela 18-	Dados referentes à estatística descritiva da idade dos pacientes	144

Tabela 19-	Estatística descritiva do gênero dos pacientes	145
Tabela 20-	Resultados estatísticos obtidos para o gene vacA região s	146
Tabela 21-	Resultados estatísticos obtidos para o gene vacA região m	148
Tabela 22-	Resultados estatísticos obtidos para o gene vacA classificação s/m	149
Tabela 23-	Resultados estatísticos obtidos para o gene cagA	150
Tabela 24-	Resultados estatísticos obtidos para o gene cagT	151
Tabela 25-	Resultados estatísticos obtidos para o gene dupA jhp0917	153
Tabela 26-	Resultados estatísticos obtidos para o gene dupA jhp0918	154
Tabela 27-	Resultados gerais obtidos após reações para o gene urease C, vacA regiões s e m, cagA, cagT e dupA jhp0917 e jhp0918 do <i>H. pylori</i>	155
Tabela 28-	Análise do risco (OR) com intervalo de confiança de 95% para as regiões genômicas do <i>H. pylori</i> estudadas	156
Tabela 29-	Análise descritiva das variáveis categóricas para o total de amostras	157

Tabela 30-	Análise descritiva das variáveis categóricas para as combinações de resultados do total de amostras	158
Tabela 31-	Análise comparativa da combinação dos genótipos entre os dois grupos de pacientes estudados	159

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01- Análise dos fragmentos obtidos por PCR após eletroforese em gel de agarose para a região do gene da betaglobina humana	140
Figura 02- Análise dos fragmentos obtidos por PCR após eletroforese em gel de agarose para a região do gene urease C do <i>H. pylori</i>	140
Figura 03- Análise dos fragmentos obtidos por PCR após eletroforese em gel de agarose para a região do gene vacA s do <i>H. pylori</i> (vacA s1)	146
Figura 04- Análise dos fragmentos obtidos por PCR após eletroforese em gel de agarose para a região do gene vacA s do <i>H. pylori</i> (vacA s2)	147
Figura 05- Análise dos fragmentos obtidos por PCR após eletroforese em gel de agarose para a região do gene vacA s do <i>H. pylori</i> (vacA s1/s2)	147
Figura 06- Análise dos fragmentos obtidos por PCR após eletroforese em gel de agarose para a região do gene vacA m do <i>H. pylori</i> (vacA m1)	148

Figura 07-	Análise dos fragmentos obtidos por nested PCR após eletroforese em gel de agarose para a região do gene <i>cagA</i> do <i>H. pylori</i>	150
Figura 08-	Análise dos fragmentos obtidos por PCR após eletroforese em gel de agarose para a região do gene <i>cagT</i> do <i>H. pylori</i>	152
Figura 09-	Análise dos fragmentos obtidos por PCR após eletroforese em gel de agarose para a região do gene <i>dupA</i> do <i>H. pylori</i> (jhp0917)	153
Figura 10-	Análise dos fragmentos obtidos por PCR após eletroforese em gel de agarose para a região do gene <i>dupA</i> do <i>H. pylori</i> (jhp0918)	154

RESUMO

O entendimento acerca da carcinogênese gástrica, que é um processo multifatorial, avançou consideravelmente nas últimas décadas, especialmente no que diz respeito ao papel do *Helicobacter pylori* no desenvolvimento das lesões pré-cancerosas e na neoplasia propriamente dita, tanto em seu estágio precoce quanto avançado.

O *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa, classificada como carcinógeno tipo I pela IARC e que possui um alto grau de diversidade genética, assim como importantes fatores de virulência, o que pode ser verificado através das diferentes cepas encontradas nas doenças do trato gastrointestinal.

A determinação, portanto, das cepas mais virulentas, responsáveis, pelo menos teoricamente, pelo desenvolvimento das doenças gástricas mais graves, é de vital importância tanto para estudos epidemiológicos quanto para a determinação de quais são os pacientes com maior probabilidade de desenvolvimento do câncer gástrico, que permanece como um grave problema de saúde pública.

No presente estudo foram comparadas cepas da bactéria prevalentes em amostras de tecido gástrico provenientes de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico distal do tipo intestinal precoce e avançado através do uso de técnicas de biologia molecular para avaliar diferentes regiões genômicas da bactéria: genes *ureaseC*, *vacA* (regiões *s* e *m*), *cagA*, *cagT* e *dupA* (regiões *jhp0917* e *jhp0918*).

Os resultados obtidos foram semelhantes tanto para os casos precoces quanto avançados da doença, porém, uma relação estatisticamente significativa foi encontrada entre o gene *cagA* e o adenocarcinoma avançado.

Em geral, as cepas foram classificadas como *vacA* s1m1, *cagA* positivas, *cagT* positivas e *dupA* negativas, concluindo-se que cepas com o genótipo *vacA* s1m1 *cagA* positivo e *cagT* positivas podem ser consideradas mais virulentas. Além disso, conclui-se que o gene *dupA*, apesar de pouco presente nas amostras de câncer gástrico estudadas, não pode ser considerado um marcador exclusivo da úlcera duodenal, como descrito inicialmente.

ABSTRACT

The understanding of gastric carcinogenesis, that is a multifactorial process, has advanced considerably in recent decades, especially with regard to the role of *Helicobacter pylori* in the development of precancerous lesions and cancer, both in its early or advanced stage.

H. pylori is a gram-negative bacteria, classified as a group I carcinogen by the IARC and it has a high degree of genetic diversity, as well as important virulence factors, which can be verified through the different strains present in gastrointestinal diseases.

Therefore, determination of the most virulent strains, responsible, at least theoretically, for the development of the most severe diseases, as gastric adenocarcinoma, is of fundamental importance for epidemiological studies and for determination of the patients with high probability for development of the disease, which remains as a serious public health problem.

In the present study they were compared strains of the bacteria prevalent in early and advanced gastric distal type intestinal adenocarcinoma through molecular biology techniques to evaluate different regions of bacterium genome: urease C, vacA (regions s and m), cagA, cagT and dupA (jhp0917 and jhp0918 regions) genes.

The results were similar for both early and advanced cases of the disease, however, a statistically significant relationship was found between the cagA gene and advanced adenocarcinoma.

In general, the strains were classified as vacA s1m1, cagA positive, cagT positive and dupA negative, concluding that strains with the genotype vacA s1m1, cagA positive and cagT positive may be considered more virulent. Moreover, it is concluded that the dupA gene, although found in a little proportion of the gastric cancer *H. pylori* strains, can not be considered an exclusive marker for duodenal ulcer, as described earlier.

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

Os conhecimentos acerca da etiologia e da patogênese do câncer gástrico foram alterados substancialmente pelo reconhecimento da associação desta doença com o *Helicobacter pylori*.

A infecção pela bactéria é considerada o maior fator de risco conhecido para as doenças malignas que acometem o estômago, sendo que estudos epidemiológicos determinaram que o risco atribuído a essa infecção para o desenvolvimento do câncer gástrico é de 75% (Herrera e Parsonnet, 2009).

Embora o *H. pylori* esteja presente tanto no tipo difuso quanto no tipo intestinal dos adenocarcinomas gástricos, sugere-se que os mecanismos envolvidos na capacidade da bactéria em determinar o desenvolvimento do câncer sejam diferentes em cada um deles (Polk e Peek, 2010).

A erradicação bacteriana diminui significativamente o risco de desenvolvimento do câncer em indivíduos infectados que não apresentam lesões pré-malignas (Wong et al., 2004), reforçando a tese de que o micro-organismo tem influência nos estágios precoces da carcinogênese gástrica (Polk e Peek, 2010).

Entretanto, apenas uma pequena proporção de indivíduos infectados desenvolve a neoplasia, e o risco da doença envolve a interação entre o patógeno e o hospedeiro, sendo esta, por sua vez, dependente de fatores cepa-específicos da bactéria, além de fatores intrínsecos do hospedeiro e de fatores ambientais, tais como, a dieta.

Dessa maneira, considerando-se também as evidências recentes de que determinadas cepas estejam inversamente relacionadas ao desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago e a algumas doenças extragástricas (Peek e Blaser, 2002; Chen e Blaser, 2007), verifica-se a importância de analisar os mecanismos biológicos e os fatores de virulência do *H. pylori*, que podem, dependendo de sua expressão, promover a carcinogênese, dando início a lesões pré-cancerosas e depois ao câncer, em seu grau precoce ou avançado.

1.1- *Helicobacter pylori*

1.1.1- Histórico

A descoberta do *H. pylori* em 1983 pelos pesquisadores australianos J. Robin Warren e Barry J. Marshall (Marshall e Warren, 1984), foi um dos avanços mais importantes da gastroenterologia, tendo levado seus pesquisadores, à premiação com o Nobel de Medicina no ano de 2005.

Bactérias semelhantes já haviam sido observadas em tecido gástrico por patologistas europeus mesmo antes de 1906 (Krientiz, 1906), sendo também descritas por outros pesquisadores posteriormente (Doenges, 1938; Freedberg e Barron, 1940; Steer, 1975), mas, por não terem sido isoladas, foram ignoradas e esquecidas por várias gerações. Em 1979, o micro-organismo começou a ser observado por Warren como uma bactéria de formato curvo presente em amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia e submetidas a exame histológico (Goodwin et al., 1987; Blaser, 1993; Dunn et al., 1997). Assim, apesar do ceticismo inicial demonstrado pelas comunidades médica e científica, o que fez com que Marshall infectasse a si próprio com a referida bactéria, ficou comprovada a associação do *H. pylori* com o desenvolvimento das doenças gástricas, como a gastrite, a úlcera duodenal e a úlcera gástrica (Ahmed e Sechi, 2005).

A princípio, os micro-organismos foram classificados como pertencentes ao gênero *Campylobacter*, composto por bactérias gram-negativas em forma de bastão curvado, oxidase e catalase positivas, que se locomovem através de flagelos polares. Dessa forma, foram primeiramente chamados de “gastric *Campylobacter* like organism”, recebendo, posteriormente, as denominações *Campylobacter pyloridis*, *Campylobacter pyloricus* e *Campylobacter pylori* (Murray et al., 1998).

Finalmente, a partir de 1989, após estudos ultraestruturais e de análise da sequência de ácidos nucleicos, a bactéria recebeu a denominação *Helicobacter pylori*, diferenciando-se do gênero anteriormente chamado *Campylobacter* (bastão

curvado) para o novo gênero *Helicobacter* (forma helicoidal). A espécie foi denominada *pylori* devido ao fato de a bactéria ser mais comumente encontrada na mucosa do antro gástrico, próxima ao piloro (Goodwin et al., 1989).

1.1.2- Diversidade genética e genoma

As cepas de *H. pylori* provenientes de indivíduos não relacionados por parentesco e não institucionalizados demonstram um alto grau de diversidade genética (Blaser e Berg, 2001; Linz e Schuster, 2007), o que é prontamente detectado pela análise de sequências de nucleotídeos de genes individuais em cepas da bactéria (Suerbaum et al., 1998), provenientes de diferentes populações (Ahmed e Sechi, 2005). A diversidade alélica do *H. pylori* é provavelmente consequência de múltiplos fatores, incluindo um alto grau de mutações, uma elevada taxa de recombinação genética intraespécies e uma longa história de evolução das espécies (Blaser e Berg, 2001; Suerbaum e Josenhans, 2007). Alelos correspondentes em diferentes cepas da bactéria são tipicamente idênticos de 92% a 99% nas sequências de nucleotídeos (Suerbaum et al., 1998; Blaser e Berg, 2001), mas vários genes apresentam um índice mais elevado no que diz respeito à diversidade genética (Atherton et al. 1995; Cao e Cover, 2002).

Estudos também demonstram que existe uma variação geográfica entre cepas do *H. pylori* (Achtman et al., 1999; Wirth et al., 2004; Linz et al., 2007; Devi et al., 2007, Yamaoka, 2009). Com base na análise de sequências multilocais de um grupo de 370 cepas do micro-organismo isoladas de indivíduos de diferentes partes do mundo, sete populações de cepas com distribuições geográficas diferentes foram identificadas (Falush et al., 2003). Essas populações bacterianas refletem a migração dos humanos da África para outras partes do mundo num período estimado de mais de 58.000 anos (Linz et al., 2007). Portanto, as diferenças geográficas entre as cepas do *H. pylori* podem ser um fator potencial para ajudar a explicar a variação na incidência de determinadas doenças associadas à bactéria em diferentes partes do mundo (McClain et al., 2009).

Além da variação nas sequências de genes individuais entre as diferentes cepas da bactéria, há uma considerável diversidade entre cepas no que diz respeito ao conteúdo gênico (McClain et al., 2009). Um dos exemplos mais importantes sobre essa diferença é a ausência ou presença de uma região de 40kb do DNA cromossomal conhecida como *cag pathogenicity island* (cagPAI) (Atherton et al., 1995; Censini et al., 1996). Nos Estados Unidos da América e na Europa, cerca de 50 a 60% das cepas contêm a cagPAI, havendo, nas demais cepas, uma ausência dessa região (Figueiredo et al., 2002). Em diversas outras partes do mundo, incluindo o Leste Asiático, quase todas as cepas do *H. pylori* apresentam a cagPAI (van Door et al., 1999; Maeda et al., 1999).

Com relação ao genoma, várias cepas têm sido sequenciadas, demonstrando resultados similares, sendo que algumas delas possuem genes exclusivos, denominados genes cepa-específicos (Dong et al., 2009). O *H. pylori* (cepa 26695) possui um genoma circular composto por 1.667.876 pares de bases (1,7 Mb), considerado pequeno se comparado com o de bactérias que vivem em uma grande variedade de *habitats*, demonstrando ser, portanto, um patógeno notavelmente bem adaptado a um nicho ecológico muito especializado (Tomb et al., 1997; Lee, 1998).

O *H. pylori* foi a primeira bactéria patogênica que teve seu genoma completamente sequenciado em duas cepas diferentes: a denominada 26695, isolada de um paciente com gastrite no Reino Unido (Tomb et al., 1997) e a cepa J99, proveniente de um paciente com úlcera duodenal, nos Estados Unidos da América (Alm et al., 1999).

Posteriormente, outras cepas foram tendo seu genoma sequenciado, a HPAG1, obtida de um indivíduo sueco com gastrite crônica atrófica (Oh et al., 2006), a B128, proveniente de um indivíduo com úlcera gástrica e a 98-10, isolada de um paciente japonês com câncer gástrico (McClain et al., 2009), a cepa G27, obtida de um indivíduo italiano (Baltrus et al., 2009) e a cepa Shi470, proveniente do antro gástrico de um ameríndio residente em uma região amazônica remota no Peru (Thiberge et al., 2010).

Além dessas, mais recentemente, a cepa B38, isolada de um paciente com linfoma gástrico tipo MALT, demonstrou possuir o menor genoma do *H. pylori* já seqüenciado, quando comparado a outras cepas (Thiberge et al., 2010).

1.1.3- Características microbiológicas

O gênero *Helicobacter* foi definido por estudos de composição do RNA ribossômico (Romaniuk et al., 1987) e de sequenciamento e hibridação do DNA bacteriano (Goodwin et al., 1989). Este gênero, juntamente com *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Wolinella*, constitui a denominada superfamília VI de bactérias gram-negativas (Vandamme et al., 1991).

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria gram-negativa que apresenta de dois a quatro μm de comprimento e de meio a um μm de largura. Embora usualmente tenha o formato espiralado, pode aparecer como um bastão, enquanto formas cocóides também podem surgir, porém menos comumente (Kusters et al., 1997).

A bactéria apresenta de dois a seis flagelos unipolares de aproximadamente três μm de comprimento, com um característico bulbo em seu final. Tais estruturas conferem motilidade e permitem movimentos rápidos em soluções viscosas como o muco que recobre as células gástricas epiteliais (O'Tolle et al., 2000).

Uma característica importante para o desenvolvimento bacteriano é a microaerofilia, com crescimento ótimo a níveis de O_2 de dois a cinco por cento, cinco a dez por cento de CO_2 e alta umidade. O crescimento ocorre de 34° C a 40° C, sendo ideal a temperatura de 37° C. O *habitat* natural da bactéria é o estômago humano, com pHs menores do que quatro, apesar de seu crescimento ocorrer de maneira ideal em pHs que variam de 5.5 a 8.0, preferencialmente no pH neutro (Scott et al., 2002; Stingl et al., 2002).

O *H. pylori* é um micro-organismo urease, catalase e oxidase positivo, características comumente utilizadas para sua identificação. Além disso, é capaz de catabolizar a glicose, porém não outros açúcares (Doig et al., 1999; Marais et

al., 1999). Para combater o estresse oxidativo, a bactéria expressa vários componentes de resistência, como as enzimas superóxido-dismutase, utilizando o ferro (Seyler et al., 2001), catalase e alquil-hidroperoxi-redutase (Olczak et al., 2003).

Com relação ao metabolismo do nitrogênio, presente em sua maior parte na forma de aminoácidos e ureia no ambiente gástrico, o *H. pylori*, através da síntese da urease, produz amônia, um importante fator que permite sua sobrevivência no pH ácido do estômago; além dessa função, essa enzima também é considerada um fator de virulência (Kusters et al., 2006). Estima-se, inclusive, que pelo menos dez por cento das enzimas produzidas pela bactéria sejam constituídos pela urease (Bauerfeind et al., 1997). Outras importantes proteínas sintetizadas pelo micro-organismo são as amidases, as deamidases e a arginase (Mendz e Hazell, 1996; Gobert et al., 2001).

Os metais também são importantes para o metabolismo bacteriano, atuando em uma série de reações químicas como cofatores de enzimas e catalizadores de reações básicas como o transporte de elétrons. Assim, de essencial importância são o níquel (Fulkerson et al., 1998), o ferro (Berg et al., 1997), o cobre (Ge e Taylor, 1996) e o cobalto (McGee et al., 1999).

Finalmente, o *H. pylori* possui um envoltório celular semelhante ao de outras bactérias gram-negativas, consistindo de uma membrana citoplasmática, um periplasma com peptidoglicanas e uma segunda membrana formada por lipídios (Kusters et al., 2006).

1.1.4- Transmissão

O mecanismo exato de transmissão do *H. pylori* permanece indefinido, já que a bactéria tem praticamente como único reservatório o ser humano (Mendall e Northfield, 1995; Kusters et al., 2006). Em raras ocasiões, o micro-organismo foi detectado em animais domésticos, que podem, portanto, ser uma fonte de infecção (Brown et al., 2001; Dore et al., 2001).

Alguns estudos demonstraram a colonização bacteriana em gatos domésticos, primatas e suínos (Handt et al., 1994; Fox et al., 1995), também sugerindo-se que as moscas domésticas possam ser vetores para a transmissão do *H. pylori* (Grubel et al., 1997).

No entanto, como não há uma conclusão acerca da possível transmissão por animais, novas infecções parecem ocorrer como consequência direta da transmissão entre humanos, através de duas vias principais: oral-oral e fecal-oral, ou de ambas (Kusters et al., 2006).

Considera-se que a infecção seja adquirida na infância, sendo a transmissão oral-oral a mais comum, especialmente devido a estudos que demonstraram que pessoas de uma mesma unidade familiar e indivíduos institucionalizados apresentam uma prevalência elevada da bactéria (Brown, 2000; Allaker et al., 2002; Kivi et al., 2003; Konno et al., 2005). Evidências primárias de que o *H. pylori* pode ser transmitido pela saliva foram decorrentes de estudos que mostraram uma elevada contaminação entre crianças que ingeriram alimentos previamente mastigados pelas mães, o que é uma prática comum em alguns países da África (Albenque et al., 1990).

Assim, a cavidade oral tem sido proposta como reservatório da infecção e também das reinfecções pelo *H. pylori*, apesar de não ser claro se a bactéria é um habitante constante ou intermitente deste local (Nguyen et al., 1995; Madinier et al., 1997). As mais prováveis fontes de infecção oral incluem a saliva, a placa dental, o conteúdo do refluxo gástrico e o vômito (Brown, 2000; Song et al., 2000).

O DNA bacteriano também foi isolado através da análise das fezes de indivíduos infectados, demonstrando ser, a rota fecal-oral, um mecanismo também importante de transmissão (Namavar et al., 1995; Gramley et al., 1999; Parsonnet et al., 1999). A disseminação pela via fecal-oral pode ocorrer diretamente de uma pessoa infectada a outra ou em decorrência de situações ambientais que a favoreçam, como elevada densidade populacional no domicílio e precárias condições sanitárias e higiênicas (Dominici et al., 1999; Malaty et al., 2003; Bruce e Maaroos, 2008).

Diversos estudos também analisaram a possível transmissão através da água (Enroth e Engstrand, 1995; Hegarty et al., 1999; Queralt et al., 2005; Bruce e Maaroos, 2008), o que provavelmente reflete a contaminação desse recurso com DNA bacteriano degradado ou com o micro-organismo morto (Kusters et al., 2006). Ainda, outra fonte de contaminação seriam os alimentos, já que há evidências de que a bactéria possa sobreviver por um tempo limitado em comidas refrigeradas (Poms e Tatini, 2001).

Com base nessas considerações, a transmissão pessoa-pessoa permanece como a forma mais provável de aquisição da infecção.

1.1.5- Epidemiologia

O *H. pylori* é uma bactéria de distribuição universal que acomete mais da metade da população mundial, sendo considerado um importante problema de saúde pública.

A prevalência das infecções pela bactéria varia bastante entre as nações industrializadas e os países em desenvolvimento assim como dentro de uma mesma sociedade (Megraud et al., 1989; Graham et al., 1991; Taylor e Blaser, 1991; Fischbach et al., 2009). Obviamente, as diferenças encontradas entre os grupos étnicos são ocasionadas pelas intensidades maiores ou menores de exposição ao agente etiológico, tanto social como relativa à dieta alimentar e aos fatores ambientais (Graham et al., 1991; Malaty et al., 1994).

Evidências epidemiológicas apontam que a infecção pelo *H. pylori* é adquirida principalmente na infância e se caracteriza pela cronicidade (Fiedorek et al., 1991; Kodaira et al., 2002), sendo que estudos realizados em locais economicamente menos satisfatórios demonstraram que as condições sanitárias e de higiene podem ser importantes fatores para a disseminação da bactéria (Fox, 1995; Torres et al., 2001).

Nos países em desenvolvimento, estima-se que mais de 80% da população sejam contaminados pela bactéria, incluindo indivíduos bem jovens (Perez-Perez

et al., 2004). Por outro lado, nos países desenvolvidos, a prevalência de pessoas contaminadas permanece ao redor de 40% e é consideravelmente bem menor em crianças e adolescentes do que em adultos (Kusters et al., 2006).

No Brasil, pesquisas feitas com crianças na região nordeste, por exemplo, identificaram altas taxas de infecção pela bactéria em crianças, com valores de 22.2% na idade de meio a dois anos, 46.9% para três a quatro anos e 70.0% para cinco a seis anos, seguindo-se porcentagens também elevadas nas idades acima das citadas (Parente *et al.*, 2006). Outros estudos realizados no país confirmam as evidências de que o nível social e de educação, além das condições sanitárias e familiares em que os indivíduos vivem, além da idade, são fatores determinantes na aquisição da infecção (Santos et al., 2005; Zaterka et al., 2007).

Dados provenientes da Alemanha demonstraram que a prevalência da infecção pelo *H. pylori* varia de cinco a sete por cento em crianças com idade de cinco a sete anos (Grimm e Fischbach, 2003). Já para os adultos, mulheres e homens, a prevalência em idades menores do que 30 anos é de 25 e 30%, entre 30 e 34 anos, de 19 e 16% e, acima dos 35 anos, de 12 e 24%, respectivamente (Rothenbacher et al., 1998; Brenner et al., 2006).

Por sua vez, na região da Ásia-Pacífico, que é bastante heterogênea, a prevalência da infecção pela bactéria varia tanto dentro de um mesmo país quanto entre países (Lam e Talley, 1998; Fock et al., 2009). Apesar de as taxas de infecção e, portanto, de transmissão, terem sofrido um decréscimo nas últimas décadas, principalmente devido à melhoria das condições de higiene em alguns países dessa região, uma grande proporção de indivíduos adultos permanece infectada, manifestando índices elevados para a úlcera péptica e o câncer gástrico. Nesse último caso, a doença permanece como a segunda causa de morte por câncer no mundo, e os casos dessa região contribuem muito para essa estatística (Kamangar et al., 2006; Fock et al., 2009).

1.1.6- Patogênese e fatores de virulência

A primeira doença, que ocorre após a colonização pelo *H. pylori*, é a gastrite crônica ativa, condição que pode ser observada em todos os indivíduos infectados pela bactéria. A distribuição intragástrica e a gravidade do processo crônico inflamatório dependem de uma variedade de fatores, dentre os quais as características das cepas, a genética e a resposta imunológica do hospedeiro, a dieta e o nível de produção do ácido gástrico. Como complicações desse processo inflamatório, particularmente nos locais de mais grave inflamação, aparecem a úlcera péptica, o câncer gástrico e o linfoma MALT (Kusters et al., 2006).

Dessa forma, desde sua descoberta, e com o sequenciamento do genoma de várias cepas, foram identificados diversos fatores de virulência bacterianos, os quais parecem ditar regras importantes no que diz respeito à patogênese das doenças gastroduodenais. Apesar disso, a identificação de um fator de virulência específico, preditivo de uma determinada doença, permanece desconhecida.

Os diversos genes codificadores de diferentes fatores de virulência bacterianos são geralmente classificados em três categorias (Yamaoka, 2008).

A primeira comporta os genes cepa-específicos, que são presentes em apenas algumas cepas do *H. pylori*. Dentro desse grupo, o fator mais estudado é a cagPAI, que codifica um sistema de secreção bacteriano do tipo IV (Censini et al., 1996). A cagPAI contém aproximadamente 30 genes, incluindo o cagA, que injeta a citotoxina CagA e, possivelmente, outras proteínas bacterianas nas células hospedeiras (Asahi et al., 2000; Viala et al., 2004). Cepas que possuem o gene cagA são estatisticamente relacionadas ao desenvolvimento da úlcera péptica e do câncer gástrico do que cepas que possuem deleção desse gene (Blaser et al., 1995; van Door et al., 1998). Apesar de os genomas completos de três cepas do *H. pylori* (26695, J99 e HPAG1) demonstrarem positividade para a cagPAI, outros genes cepa-específicos com potencial para serem classificados como fatores de virulência são encontrados fora da cagPAI, na região denominada zona de plasticidade (Yamaoka, 2008).

Na segunda categoria definida por essa classificação, encontram-se os genes fase-variáveis, que são aqueles que podem sofrer modificações durante o crescimento bacteriano ou sob diferentes condições. Com base na comparação dos três genomas acima citados, cinco genes codificadores de proteínas da membrana parecem apresentar variações, sendo eles *oipA*, *sabA*, *sabB*, *babB* e *babC*. Dentre esses, há indicações de que a OipA (*outer inflammatory protein*) e a SabA (*sialic acid binding adhesin*) sejam associadas à úlcera péptica e ao câncer gástrico (Yamaoka et al., 2002; Yamaoka et al., 2006). Além desses, a proteína BabA (*blood group antigen binding adhesin*) também demonstrou uma possível associação com essas duas doenças (Yamaoka et al., 2006; Fujimoto et al., 2007).

Por sua vez, a terceira categoria é constituída pelos genes que possuem estruturas ou genótipos diferentes dependendo da cepa. Por exemplo, genótipos *vacA* específicos contendo diferentes combinações do mosaicism formado pelas regiões s e m têm sido associados às diversas doenças gástricas (Atherton et al., 1995). Além disso, a estrutura de muitos desses genes difere entre as cepas ocidentais e as asiáticas, o que pode influenciar a virulência (Yamaoka, 2008).

Dessa forma, no presente estudo, foram considerados importantes para a identificação de cepas bacterianas do *H. pylori* presentes em amostras de tecido gástrico canceroso precoce e avançado, os genes *vacA*, *cagA*, *cagT* e *dupA*, cuja descrição mais detalhada como fatores de virulência segue abaixo.

1.1.6.a- *Vacuolating cytotoxin gene* (gene *vacA*)

O gene *vacA*, presente em todas as cepas do *H. pylori*, produz a denominada citotoxina de vacuolização (VacA), um importante fator de virulência bacteriano que tem sido associado ao desenvolvimento da úlcera péptica e do câncer gástrico (Blaser e Atherton, 2004). Essa toxina pode induzir múltiplas atividades celulares, incluindo a vacuolização celular, a formação de canais de membrana, a perturbação da função endossomal/lisossomal, a apoptose e a

imuno-modulação (Czajkowsky et al., 1999; Tombola et al., 2001; Costa et al., 2009).

A forma monomérica da VacA possui dois domínios, p55 e p33, importantes para a atividade celular. A cadeia N-terminal do p55 é essencial para a vacuolização induzida por essa proteína e para a despolarização da membrana celular do hospedeiro (Ivie et al., 2008). Esse domínio também é importante para a formação de estruturas oligoméricas da VacA, sugerindo seu papel na formação de canais de membrana aniônicos (Mashima et al., 2008; Gangwer et al., 2010). Por sua vez, o domínio p33, localizado na região intermediária do gene *vacA*, apresenta algumas variações, que foram associadas com o desenvolvimento do câncer gástrico em um estudo iraniano (Hussein et al., 2008) e com a úlcera péptica em uma pesquisa realizada na Itália (Basso et al., 2008).

O gene *vacA* compreende, ainda, duas partes variáveis, que são denominadas s e m. A região s (*signal region*) codifica o sinal peptídico e está localizada no final da cadeia 5', possuindo dois alelos, s1 e s2, sendo que, para o alelo s1, existem três subtipos: s1a, s1b e s1c; a região média (*middle region*), por sua vez, possui os alelos m1 e m2 (Atherton et al., 1995; Dunn et al., 1997; van Door et al., 1998; Blaser e Atherton, 2004). A combinação em mosaico dos alelos da região s com os alelos da região m determina a produção de citotoxinas, responsáveis pelo grau de virulência da bactéria. As cepas portadoras do genótipo *vacA* s1/m1 produzem grande quantidade de toxina, enquanto as cepas s1/m2 produzem quantidade moderada, e as cepas s2/m2, pouca ou nenhuma toxina (Letley et al., 2003). As cepas *vacA* do tipo s1a parecem ser mais patogênicas que as s1b, s1c ou s2, sendo mais relacionadas à úlcera péptica. As cepas do tipo m1 estão associadas ao maior risco de danos às células epiteliais do que as do tipo m2 (van Door et al., 1998, Atherton et al., 1999). As diferentes combinações dessas regiões, portanto, determinam a produção da atividade citotóxica (Ahmed e Sechi, 2005).

1.1.6.b- Ilha de Patogenicidade cag (cagPAI), *cytotoxin associated gene A* (gene cagA), *cytotoxin associated gene T* (gene cagT)

O *cytotoxin associated gene A*, que codifica a expressão de uma proteína imunodominante de 120 a 145 kDa, a CagA, é localizado no final da denominada cagPAI, um segmento do DNA de 40 kb, que é provavelmente transferido de forma horizontal no genoma bacteriano (Censini et al., 1996; Akopyants et al., 1998).

Com base na presença ou na ausência desse gene, comumente conhecido como gene cagA, as cepas do *H. pylori* são classificadas em positivas ou negativas (Covacci et al., 1993; Tummuru et al., 1993). Nos Países Ocidentais, aproximadamente 30 a 40% das cepas da bactéria não possuem esse gene, enquanto nos países do Leste Asiático praticamente todas as cepas são cagA positivas (Hatakeyama e Higashi, 2005; Hatakeyama, 2009).

Estima-se que a cagPAI contenha de 27 a 31 genes, dependendo da cepa. Dentre eles, pelo menos 18 codificam proteínas que atuam como construtores de um sistema de secreção do tipo IV, uma estrutura em forma de envelope aberto composta por múltiplas unidades celulares ancestralmente relacionadas aos sistemas de conjugação bacterianos, e que tem a função de transferir proteínas e complexos núcleo-protéicos através das membranas (Akopyants et al., 1998). Esse sistema parece compor uma estrutura capaz de transportar produtos do *H. pylori* através das membranas bacteriana e plasmática das células gástricas epiteliais (Hatakeyama, 2009).

Infecções com cepas cagA positivas têm sido associadas com graus mais elevados de inflamação da mucosa gástrica, parecendo desempenhar um importante papel no desenvolvimento do câncer gástrico, tanto do tipo difuso quanto do intestinal, sendo crucial nos estágios pré-neoplásicos que ocorrem nesse último (Endo et al., 1995; Blaser et al., 1995; Kuipers et al., 1995; Parsonnet et al., 1997; Wang et al., 2007).

Os mecanismos principais de patogenicidade da CagA incluem sua entrada nas células gástricas epiteliais, onde ocorre um processo de fosforilação (Segal et

al., 1999; Stein et al., 2000), sua interação com a SHP-2 fosfatase (Higashi et al., 2002; Yamazaki et al., 2003), seus efeitos na transcrição (Hirata et al., 2002; Brandt et al., 2005) e os defeitos que provoca na polaridade e na junção das membranas celulares (Amieva et al., 2003; Saadat et al., 2007).

Dessa maneira, após ligação às células do epitélio gástrico, as cepas do *H. pylori* *cagA* positivas injetam a proteína CagA no citoplasma celular, através do sistema de secreção tipo IV (Segal et al., 1999; Asahi et al., 2000; Odenbreit et al., 2000; Azuma, 2004). A proteína CagA translocada localiza-se, então, na parte interna da membrana plasmática, onde sofre tirosina fosforilação, através de uma das enzimas da família quinase (Selbach et al., 2002; Poppe et al., 2007; Hatakeyama, 2009). A CagA possui uma seqüência repetida de 5 aminoácidos (ácido glutâmico-prolina-isoleucina-tirosina-alanina), que constitui um domínio denominado EPIYA, encontrado na região polimórfica carboxi-terminal da proteína (Higashi et al., 2002; Nguyen et al., 2009). O domínio EPIYA é dividido em quatro extensões, EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C e EPIYA-D, com base na sequência de aminoácidos que flanqueia cada um deles. De acordo com a combinação desses domínios, as cepas produtoras de CagA foram divididas em dois grupos, a CagA dos Países Ocidentais, que possui os domínios EPIYA-A e EPIYA-B seguidos de uma a cinco repetições do EPIYA-C, e a CagA do Leste Asiático, que apresenta os domínios EPIYA-A e EPIYA-B seguidos do EPIYA-D (Hatakeyama, 2006).

Além disso, a proteína CagA, injetada nas células hospedeiras, é capaz de perturbar os sistemas de transdução de sinais e alterar as funções celulares através da interação direta com uma proteína celular denominada SHP-2. Esta desempenha um importante papel na transdução mitogênica, sendo também ativamente envolvida na regulação da difusão, da migração e da adesão celulares (Ahmad et al., 1993; Yu et al., 1998). A alteração na regulação dessa proteína pela CagA pode induzir a proliferação anormal das células gástricas epiteliais, podendo, ainda, ter um papel crucial no surgimento de fenótipos celulares alterados em um estágio relativamente precoce do processo da carcinogênese gástrica (Azuma, 2004; Backert et al., 2010).

Outra maneira de induzir os danos celulares é representada pela interação da CagA na transcrição celular, o que pode ocorrer por diferentes caminhos. A CagA ativa o denominado *serum responsible element* (SRE) dependente de transcrição de uma forma independente de fosforilação (Hirata et al., 2002), e a NF-Kb, que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-8 (Brandt et al., 2005).

Finalmente, a proteína CagA é capaz de romper as junções celulares, provocando a perda da polaridade apical baso-lateral (Amieva et al., 2003; Saadat et al., 2007), atividade mediada por uma interação específica entre ela e duas enzimas da membrana, *partitioning-defective-1b* (PAR1b) e *microtubule affinity-regulating kinase-2* (MARK2) (Zeaiter et al., 2008)

No que diz respeito ao desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal, infecções com cepas cagA positivas do *H. pylori* levam a alterações histopatológicas progressivas, quais sejam a gastrite crônica ativa, a gastrite atrófica, a metaplasia intestinal, a displasia, e o câncer propriamente dito (Correa, 1992). Como o complexo CagA-SHP-2 é detectado principalmente na mucosa presente na gastrite atrófica, ele pode desempenhar uma regra crucial no desenvolvimento dessa alteração tecidual, assim como na transição entre esta e a metaplasia intestinal (Azuma et al., 2004). Dessa forma, a CagA media sinais anormais que desregulam o crescimento celular, levando à proliferação e à consequente apoptose. Contudo, o crescimento exacerbado e desordenado das células gástrica epiteliais leva ao desenvolvimento do câncer (Tsutsumi et al., 2003).

Por sua vez, o *cytotoxin associated gene T* (gene cagT), localizado na segunda metade da região cag II da cagPAI, é homólogo do gene virB7 da *A. tumefaciens*, e codifica uma lipoproteína encontrada no denominado canal periplasmático do sistema de secreção tipo IV (Cascales e Christie, 2003; Christie et al., 2005). Esse gene ainda não teve seu papel completamente identificado na patogênese das doenças gastroduodenais, mas, demonstra ser, junto ao gene cagA, um componente essencial do sistema de secreção tipo IV, sendo associado,

em alguns trabalhos, ao desenvolvimento da úlcera péptica (Mattar et al., 2007; Pachecco et al., 2008).

1.1.6.c- *Duodenal ulcer promoting gene* (gene dupA)

O *duodenal ulcer promoting gene* (gene dupA) é localizado na denominada zona de plasticidade do genoma bacteriano, região que apresenta uma variabilidade genética de aproximadamente 3 a 4% do cromossomo, quando feita a comparação entre diferentes isolados bacterianos (Tomb et al., 1997; Alm e Trust, 1999).

Análises de sequências do genoma indicam que pelo menos metade dos genes cepa-específicos do *H. pylori* sejam encontrados nessa região, o que tem levado ao interesse da comunidade científica (Occhialini et al., 2000; Kersulyte et al., 2003). Estudos sugerem que alguns genes, ou a combinação deles, na zona de plasticidade, podem ter um papel importante na patogênese das doenças gastroduodenais associadas ao *H. pylori* (Lu et al., 2005).

A zona de plasticidade da cepa J99 contém dois homólogos do virB4, os genes jhp0917 e jhp0918. O gene jhp0917 codifica uma proteína de 475 aminoácidos, mas apresenta ausência de uma região C-terminal do virB4, enquanto o gene jhp0918 codifica um produto de 140 aminoácidos homólogos à região deletada do virB4. Os genes jhp0917 e jhp0918, que são altamente conservados, formam uma região contínua e apresentam uma possibilidade de variação na sua sequência de aminoácidos de apenas 1.9%, compondo o denominado gene dupA (Lu et al., 2005). Além disso, o alto grau de conservação das suas sequências e o fato de o gene dupA estar presente em cepas provenientes de diferentes continentes e em populações com perfis genéticos diversos, sugere que esse gene tenha sido mantido através das migrações humanas (Schmidt et al., 2009).

Após sua descoberta, o gene dupA foi considerado um marcador específico de úlcera duodenal e um fator de proteção contra a gastrite atrófica, a metaplasia

intestinal e o câncer gástrico (Lu et al., 2005), informação que não tem sido corroborada por trabalhos mais recentes (Pachecco et al., 2008; Zhang et al., 2008; Schmidt et al., 2009).

Dessa forma, a função do gene *dupA* não é ainda completamente entendida. Esse gene codifica homólogos da ATPase do VirB4, a qual parece estar envolvida na transferência do DNA e de proteínas. Experimentos *in vitro* utilizando cepas com deleção e com mutações do gene demonstraram que a ausência do *dupA* é associada à possível diminuição do pH. Ainda, a presença do gene demonstrou estar envolvida no aumento da produção de interleucina-8 (IL-8) tanto na mucosa gástrica antral *in vivo* quanto nas células epiteliais gástricas *in vitro* (Lu et al., 2005).

É possível que o gene *dupA* atue em combinação com outros homólogos (*vir*) da zona de plasticidade formando um sistema de secreção do tipo IV similar à *cagPAI*, que também é envolvida na secreção de IL-8. Entretanto, pesquisas realizadas nos genes dessa região na cepa J99 não encontraram outros genes que pudessem, junto ao *jhp0917* e ao *jhp0918*, constituir um sistema desse tipo. Sugere-se, dessa maneira, que algumas cepas formem um sistema de secreção tipo IV com envolvimento do gene *dupA* enquanto outras não, acrescentando, ainda, que apenas as cepas *dupA* positivas formadoras de um sistema desse tipo, sejam capazes de provocar o desenvolvimento das doenças gastroduodenais (Yamaoka, 2008).

1.1.7- Relação entre o *H. pylori* e as doenças humanas

1.1.7.a- Doenças gastrointestinais

A infecção pelo *H. pylori* provoca grande desconforto em milhares de indivíduos e leva à morte, através do desenvolvimento de doenças mais graves, como o adenocarcinoma gástrico, uma porcentagem bastante elevada de

pacientes anualmente, fatos estes que, muitas vezes, são subestimados pelas autoridades de saúde pública e por especialistas em doenças infecciosas (Sullivan et al., 1990; Tebbe et al., 1996; Blaser, 2005).

A grande parte dos indivíduos infectados pela bactéria não apresenta sintomas e, quando estes ocorrem, comumente incluem sintomas inespecíficos, acompanhados ou não de outros sinais clínicos, tais como pirose, náusea, vômitos e flatulência (Bernersen et al., 1992; Dev e Lambert, 1998). Além disso, há suposições de que infecções pelo micro-organismo possam estar associadas com diarreia persistente e com o aumento da susceptibilidade a outras doenças infecciosas (Clemens et al., 1995).

A infecção pelo *H. pylori* geralmente está associada à gastrite crônica ativa e à úlcera péptica (Cover e Blaser, 1996), também estando envolvida no desenvolvimento de doenças gastroduodenais mais graves, como o adenocarcinoma gástrico, tanto do tipo intestinal quanto do difuso (Correa, 1995; Ming, 1998), e o linfoma gástrico tipo MALT (Parsonnet et al., 1994).

Com relação à gastrite, após a infecção pela bactéria, ocorre invariavelmente um processo inflamatório no estômago, caracterizado por um intenso infiltrado de neutrófilos e eosinófilos na lâmina própria, na camada de muco e na luz glandular. Há edema e congestão, além das células epiteliais poderem apresentar atipias. Essas alterações, caracterizadas como gastrite aguda, ocorrem, em geral, no corpo e, mais intensamente, no antro gástricos. Pelo exame endoscópico pode-se verificar hiperemia, friabilidade da mucosa e erosões. A maioria dos indivíduos pode não apresentar sintomas nessa fase, porém, alguns pacientes relatam a ocorrência de dor epigástrica e vômitos (Rocha et al., 1991).

A persistência do agente leva a um quadro de gastrite crônica, caracterizado pela presença de linfócitos e plasmócitos na lâmina própria, sendo que a relação causal entre a infecção e a gastrite crônica em atividade é muito consistente. A bactéria é encontrada na quase totalidade desses casos, com redução do processo inflamatório quando há a erradicação do micro-organismo. Também estima-se que haja um paralelismo entre a intensidade do processo e a

maior densidade de colonização (McNulty et al., 1986; Johnston et al., 1988; Zeitune e Monici, 2000).

Por sua vez, para a úlcera péptica, considera-se que a descoberta do *H. pylori* tenha sido um evento definitivo para o entendimento da sua patogênese (Rauws e Tytgat, 1990; Dev e Lambert, 1998). A infecção pela bactéria é relacionada com mais de 90% dos casos de úlcera duodenal e, na ausência do uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), com mais de 80% das úlceras gástricas (Walsh e Peterson, 1995; Dev e Lambert, 1998).

Consequentemente, após a constatação de que a erradicação do *H. pylori* leva à cicatrização da úlcera péptica, estabeleceu-se, em 1987, que todos os pacientes com essa doença relacionada ao micro-organismo deveriam receber o tratamento específico para eliminação do agente (Kodaira et al., 2002; Blaser, 2005).

O *H. pylori* desempenha um papel de suma importância na patogênese do câncer gástrico, tornando-se objeto do presente estudo, estando associada tanto aos adenocarcinomas do tipo intestinal quanto do difuso, o que levou, no ano de 1994, à classificação da bactéria como carcinógeno do tipo I pela *International Agency for Research on Cancer*, órgão subordinado à Organização Mundial de Saúde (International Agency for Research on Cancer, 1994; Peter e Beglinger, 2007; Wang et al., 2007).

Evidentemente, como mencionado no decorrer do presente texto, o processo da doença é multifatorial, sendo dependente das características das cepas do *H. pylori* infectantes de cada indivíduo, das características genéticas do hospedeiro e de fatores ambientais.

Finalmente, resultados de estudos epidemiológicos sugerem que o linfoma gástrico tipo MALT esteja relacionado à infecção prévia pelo *H. pylori*, já que essa infecção é encontrada em mais de 90% dos pacientes com esse diagnóstico (Parsonnet et al., 2004; Erdman et al., 1997). As lesões linfóides são geralmente confinadas à mucosa gástrica, mas envolvem os linfonodos regionais em aproximadamente 25% dos casos. Esses linfomas, chamados de baixo grau, regredem no período de doze meses quando a infecção pelo *H. pylori* é

eficazmente tratada, sendo o prognóstico, na maior parte dos casos, muito bom (Cammarota et al., 2005).

Por outro lado, apesar das associações entre a bactéria e o desenvolvimento das doenças gastrointestinais acima citadas, uma possível relação simbiótica entre o *H. pylori* e seu hospedeiro é também discutida por alguns pesquisadores (Ahmed, 2005; Ritcherl et al., 2005). Dessa forma, por exemplo, a infecção pelo micro-organismo poderia exercer uma proteção contra determinados tipos de diarreia em crianças (Rothenbacher et al., 2000) e até mesmo em adultos (Bode et al., 2001). Poderia, ainda, basear a hipótese de que a aquisição da infecção na infância seria associada a reduzidos índices de aparecimento de asma e alergias (Chen et al., 2007) e, por fim, que a erradicação da bactéria diminuiria as incidências de úlceras pépticas e de câncer gástrico, mas estaria inversamente relacionada ao surgimento de taxas mais elevadas de câncer do esôfago (Blaser, 2005; Figueiredo et al., 2005).

1.1.7.b- Doenças extradigestivas

As doenças gastroduodenais passaram a ser intensamente estudadas após a descoberta do *H. pylori*, não só com relação aos seus aspectos patogênicos como também nas condutas diagnóstica e terapêutica (Lorena e Zeitune, 2007).

Com base nas observações de que o *H. pylori* produz, na fase aguda de sua infecção, diversas substâncias pró-inflamatórias, e que existe uma relação importante entre alguns antígenos bacterianos e do hospedeiro, alguns autores têm relacionado a presença da bactéria com a patogênese de algumas doenças extragástricas e, inclusive, extradigestivas (Gasbarrini et al., 1999; Lorena e Zeitune, 2007). Para possível explicação das alterações determinadas pela bactéria e o surgimento dessas enfermidades, tem sido sugerido que o processo inflamatório ocasionado pela presença da bactéria possa liberar substâncias que atuam à distância, ou pela mimetização molecular cruzada que poderia ocorrer entre a bactéria e os antígenos do hospedeiro. Entretanto, existem

questionamentos acerca desse aspecto, na medida em que se tem isolado esse micro-organismo em outros tecidos do organismo, além daquele habitualmente colonizado, ou seja, a mucosa gástrica (Lorena e Zeitune, 2007).

Dentre as doenças extragástricas e extradigestivas possivelmente relacionadas ao *H. pylori*, incluem-se a anemia por deficiência de ferro de causa desconhecida (Capurso et al., 2001) e algumas doenças autoimunes, como a artrite reumatóide (Zentilin et al., 2002) e as doenças da tireóide (de Luis et al., 1998). Investigações também têm sido feitas com relação ao possível envolvimento da bactéria nas doenças coronarianas e cardíacas (Kowalski, 2001; Eskandarian et al., 2006), e em certos tipos de alergia, como a urticária e a dermatite atópica (Galadari e Sheriff, 2006). Alguns problemas respiratórios (Roussos et al., 2003; Karel'skaia e Ignat'ev, 2005) e a púrpura trombocitopênica imunológica (PTI) também podem estar associados à infecção crônica pelo *H. pylori*. Neste último caso, certos estudos demonstraram que a erradicação do micro-organismo parece favorecer o prognóstico em uma importante porcentagem de pacientes (Di Campli et al., 1998; Emilia et al., 2001; Ando et al., 2004). Há hipóteses também que cepas específicas do *H. pylori* possam ser relacionadas ao desenvolvimento da PTI, como as *cagA* positivas, entretanto, estudo realizado no Brasil, não encontrou essa relação, apesar de ter relatado uma importante associação entre a presença da bactéria e o aparecimento da doença (Oliveira, 2008). Também realizado no Brasil, mas com relação à associação entre a anemia por deficiência de ferro, um trabalho demonstrou que não há relação entre essa doença e o *H. pylori*, no grupo de pacientes estudado (Alvarenga et al., 2010).

Finalmente, dados importantes também têm sido relatados no que diz respeito à presença do *H. pylori* em amostras de tecido hepático. Estudo realizado na Rússia sugeriu uma possível relação entre a presença da bactéria e o desenvolvimento de doenças hepato-biliares, encontrando o DNA do micro-organismo em amostras provenientes de tecido hepático, do epitélio do ducto biliar e da bile (Isaeva et al., 2009). No Irã, utilizando amostras de tecido hepático fixadas e emblocadas em parafina, foram obtidos resultados positivos para a presença do DNA do *H. pylori* em nove de 28 amostras, revelando que,

possivelmente, a bactéria determina um importante papel nas enfermidades hepáticas (Pirouz et al., 2009). No Brasil, estudo em andamento, também realizado com amostras de tecido hepático fixadas, relatou a presença da bactéria em uma porcentagem importante de pacientes (Rabelo Gonçalves et al., 2010).

1.2- Câncer gástrico

1.2.1 - Câncer gástrico precoce e avançado

Os tumores do estômago apresentam-se, predominantemente, sob a forma de três tipos histológicos, o adenocarcinoma, responsável por 95% das neoplasias gástricas, o linfoma, diagnosticado em 3% dos casos, e o leiomiossarcoma (Instituto Nacional do Câncer, 2010).

O conceito de câncer gástrico precoce foi dado pela Sociedade Japonesa de Endoscopia Digestiva em 1962, com base no potencial de cura dessa doença em relação a outras enfermidades. Dessa forma, o câncer gástrico precoce é definido como o tumor confinado à mucosa ou à submucosa, independente de sua forma ou extensão, sem considerar se há ou não a invasão linfonodal (Japanese Research Society for Gastric Cancer, 1973).

A primeira descrição de um caso de câncer gástrico precoce foi atribuída a Hauser de Leipzig, em 1883 (Friesen et al., 1983) ou Saeki do Japão em 1938 (Traynor et al., 1987), sendo a primeira série de 15 casos relatada por Stout (1942).

Pacientes com diagnóstico da doença nessa fase apresentam um excelente prognóstico, com índices de sobrevivência de cinco anos maiores do que 90% (Yamazaki et al., 1989; Sue-Ling et al., 1992), especialmente se não houver o envolvimento linfonodal. Inclusive, os denominados micro-carcinomas (diâmetros menores do que 5 mm) têm sido mais diagnosticados, especialmente no Japão, onde a incidência da doença é bastante alta (Everett e Axon, 1998).

Os adenocarcinomas precoces são mais diferenciados do que os avançados (Hampson et al., 1990). No Japão, adenocarcinomas tubulares bem diferenciados, identificados simplesmente com base no atipismo celular, são reconhecidos e são descritos como “menos malignos” pelos pesquisadores (Fujii et al., 1994), porém os critérios de diagnóstico desse tipo de câncer diferem entre os patologistas japoneses e os de outros países em muitos casos (Schlemper et al., 1997).

Acredita-se que muitos tumores gástricos precoces sejam provenientes de um ciclo de ulcerações, cicatrização e reulcerações. Eventualmente, esse processo pode levar possivelmente à cura em determinados casos, sendo que alguns tumores permanecem em estágio precoce por vários anos, mesmo sem tratamento (Kohli et al., 1981; Everett e Axon, 1998).

Trabalho de extrema importância, também realizado no Japão, demonstrou que a erradicação do *H. pylori*, após ressecção endoscópica do câncer precoce, levou ao não surgimento de novos tumores, o que não ocorria quando apenas o tratamento cirúrgico era realizado, sugerindo que a erradicação bacteriana pode inibir o desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal em seus estágios iniciais (Uemura et al., 1997).

Nessa pesquisa, em 65 pacientes submetidos à ressecção endoscópica da neoplasia gástrica do tipo intestinal em estágio precoce e ao tratamento de erradicação do *H. pylori*, feito com combinações de omeprazol e antibióticos, foi verificada uma diminuição da infiltração de neutrófilos e um decréscimo da gravidade da metaplasia intestinal, presente em todos os casos, sugerindo que a erradicação da bactéria pode ser de extrema importância para o não desenvolvimento de novas lesões (Uemura et al., 1997). Outro estudo, nessa mesma linha de entendimento, chegou a conclusões semelhantes, sugerindo que a erradicação do *H. pylori*, juntamente com a ressecção endoscópica do adenocarcinoma precoce, leva a não formação de novos tumores (Fukase et al., 2008).

Em outro estudo, em um grupo de 43 pacientes com câncer gástrico precoce (diagnosticado endoscopicamente) seguido por um período de 29 meses,

27 pacientes progrediram para câncer avançado enquanto 16 permaneceram no estágio precoce (Tsukuma et al., 1983). Os pesquisadores estimaram que a duração média do câncer precoce, antes de evoluir para avançado, foi de 37 meses, sendo o tempo médio de sobrevivência desses pacientes de 77 meses. Além disso, 50% desses indivíduos sobreviveram por mais de seis anos sem tratamento. Em outro grupo, 20% dos pacientes com câncer gástrico precoce não tratado sobreviveram por mais de dez anos (Tsukuma et al., 1983; Yamazaki et al., 1989).

O adenocarcinoma avançado, por sua vez, é definido como aquele que infiltra a partir da camada muscular própria e predomina em todas as séries teciduais (Japan International Cooperation Agency, 1981).

Existem algumas diferenças importantes entre o câncer gástrico precoce e o avançado. Diferenças histológicas e lesões simultâneas são mais frequentes no adenocarcinoma primeiro do que no segundo. Partindo dessas observações, alguns autores verificaram que a idade média dos pacientes é pelo menos oito anos menor nos casos precoces do que nos avançados, e os sintomas do câncer precoce assemelham-se mais aos de doenças benignas do que os do câncer avançado; a perda de peso, particularmente, é menos comum (Eckardt et al., 1990).

A longa duração dos sintomas pode também sugerir que a doença é diagnosticada acidentalmente em pacientes que apresentam sintomas não relacionados ao câncer, levando à possível existência de um número significativo de lesões precoces na população em geral. Consideradas em conjunto, essas características sugerem que há uma continuidade biológica de uma doença inicialmente benigna, para uma precoce, e, posteriormente, avançada. O ponto a partir do qual essa sequência torna-se irreversível permanece sem explicação (Everett e Axon, 1998).

Nessa linha de raciocínio, a prevenção secundária do câncer gástrico por mapeamento endoscópico é baseada na suposição de que, se considerado sozinho, o câncer gástrico precoce vai progredir ao avançado, levando, possivelmente, à morte. Uma hipótese razoável é que a neoplasia avançada tem

origem na precoce, mas isso não necessariamente significa que todo câncer precoce irá progredir para o avançado (Everett e Axon, 1998).

Com relação aos índices de infecção pelo *H. pylori*, estes são significativamente maiores nos pacientes com câncer gástrico precoce do que nos pacientes com a doença em estágio avançado (Asaka et al., 1994). Indivíduos com gastrite atrófica grave assim como com câncer gástrico avançado apresentam densidades do *H. pylori* menores devido ao fato de a mucosa gástrica, nessas situações, tornar-se desfavorável ao crescimento bacteriano (Kabir, 2009).

1.2.2- Patologia do câncer gástrico

Os adenocarcinomas são comumente localizados na região pré-pilórica, no antro e na pequena curvatura, sendo menos comuns na cárdia e no corpo gástrico, acompanhando, assim, a mucosa de padrão pilórico (Antonioli e Goldman, 1982).

1.2.2.a- Aspectos macroscópicos do adenocarcinoma gástrico precoce e avançado

A classificação mais utilizada para o adenocarcinoma precoce é a definida pela Sociedade Japonesa de Endoscopia Gastroenterológica (1962). Dessa forma, os adenocarcinomas precoces são classificados macroscopicamente em tipo I (protuso); tipo II (superficial), que, por sua vez, é dividido em três subtipos, tipo IIa (superficial elevado), tipo IIb (superficial plano), tipo IIc (superficial deprimido); e tipo III (escavado) (Japanese Research Society for Gastric Cancer, 1995).

A incidência dos diferentes tipos macroscópicos de câncer gástrico precoce varia consideravelmente em diferentes países e de acordo com os autores, o que é bastante notável quando se comparam dados da Europa e do Japão. Em geral, o tipo I representa de 10 a 15% dos casos da doença no Japão enquanto na Europa figura com mais de 22% dos casos. O tipo II costuma ser mais freqüente

que o tipo I, embora porcentagens dos tipos IIa, IIb e IIc sejam bastante variáveis. O tipo III parece ser o mais comum (Bogomoletz, 1984).

Já a classificação macroscópica do adenocarcinoma avançado foi definida em 1926, sendo adaptada e universalmente aceita. Baseada no aspecto macroscópico e no grau de infiltração das lesões, tem por base quatro tipos: tipo I (tumor polipóide não-ulcerado), tipo II (tumor polipóide com ulceração central), tipo III (tumor infiltrante com ulceração central) e tipo IV (tumor infiltrante, difuso ou não) (Borrmann et al., 1926).

1.2.2.b- Aspectos microscópicos do adenocarcinoma gástrico precoce e avançado

Existem diversas classificações histológicas para o câncer gástrico, sendo duas as principais, a de Lauren e a Japonesa.

A classificação de Lauren, comumente utilizada por patologistas da Europa, América do Norte e Brasil, toma como base o estudo histológico de 1344 peças de gastrectomias examinadas na Universidade de Turku, na Finlândia, entre 1945 e 1964, classificando os adenocarcinomas gástricos em dois grupos principais, o tipo difuso e o tipo intestinal, de acordo com a histologia e a citologia dos tumores, a secreção de mucina e a forma de crescimento tumoral (Lauren, 1965).

Os tumores do tipo intestinal têm um padrão glandular, usualmente acompanhado por formações papilíferas ou componentes sólidos, que são constituídos por células grandes, pleomórficas, com núcleos grandes, hipercromáticos, mostrando mitoses frequentes. As células que revestem os lumens glandulares são células colunares bem polarizadas, com proeminentes bordas ciliadas. Quando a secreção está presente, tende a ocorrer focalmente no citoplasma de células isoladas; ou, se extracelular, está localizada principalmente na luz glandular (Lauren, 1965; Hawley et al. 1970; Ming, 1977).

Por sua vez, os adenocarcinomas do tipo difuso são constituídos de células isoladas ou esparsas ou de pequenas linhas de células; ou, ainda, se têm um aspecto mais sólido, as células individuais estão apenas frouxamente presas uma

às outras. Lumens glandulares são incomuns e, se presentes, são pequenos e pouco definidos. As células individuais são pequenas e uniformes, com citoplasma pouco nítido e núcleos pouco hipercromáticos, frequentemente picnóticos e sem muitas mitoses. Em alguns tumores com formação glandular, as células de revestimento não são polarizadas e a diferenciação da borda ciliada, quando ocorre, é esparsa e irregular. A grande maioria dos tumores mostra secreção de mucina em extensas áreas em quase todas as células tumorais; a secreção intracelular é destruída por todo citoplasma. Se extracelular, a mucina secretada dispersa-se no estroma (Lauren, 1965; Ming, 1977).

O modo de crescimento, nos dois tipos de tumores, difere. Os adenocarcinomas do tipo intestinal geralmente são bem definidos e mostram variação na estrutura do tumor, entre o centro e a periferia. O infiltrado inflamatório é geralmente intenso. Os adenocarcinomas do tipo difuso têm uma estrutura mais uniforme e não são tão bem delimitados, com tendência a se disseminarem amplamente na mucosa. A proliferação do tecido conjuntivo é mais marcada e o infiltrado inflamatório é menos proeminente do que no tipo intestinal (Lauren, 1965).

Na Classificação Japonesa, esses dois tipos de câncer correspondem ao tipo diferenciado e ao tipo indiferenciado de Nakamura, respectivamente (Nakamura, 1982). Essa classificação baseia-se no padrão predominante do tumor, sendo que o exame patológico inclui o exame macroscópico da peça gástrica ressecada, o exame histológico dos blocos de tecido retirados da área com maior profundidade de invasão, com maior comprimento, e o corte do carcinoma com maior espessura, e, finalmente, o exame histológico de todos os linfonodos regionais (Nakamura, 1982).

1.2.3- Adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal, adenocarcinoma gástrico do tipo difuso e *H. pylori*

A infecção pelo *H. pylori* é associada tanto com o desenvolvimento do adenocarcinoma do tipo intestinal quanto do difuso (Uemura et al., 2001), apresentando papel de extrema importância na cascata de eventos composta de lesões pré-cancerosas que ocorre no primeiro tipo.

Assim, o câncer gástrico do tipo intestinal pode ser considerado um processo de múltiplos passos, tendo início com a gastrite crônica ativa e progredindo para a gastrite crônica atrófica, metaplasia intestinal e displasia (Correa, 1975). Essa sequência de eventos é geralmente iniciada pela infecção provocada pelo *H. pylori* e afetada por uma série de fatores genéticos e ambientais, os quais atuam de forma sinérgica (Ming, 1998). Dos dois tipos de câncer, intestinal e difuso, o primeiro é o mais comum e ocorre com grande frequência na região do antro gástrico (Bruckner et al., 2003).

A gastrite atrófica é definida como a perda das estruturas glandulares da mucosa gástrica, sendo associada com a diminuição de células especializadas e com a consequente redução da função secretora gástrica (Dixon et al., 1996). A gastrite atrófica é resultado da inflamação gástrica de longo período induzida pelo *H. pylori* e representa um dos passos mais importantes na histogênese do câncer gástrico (Correa, 1995).

Por exemplo, estudo realizado no Japão com 2455 indivíduos, relatou a presença de gastrite atrófica em 80% dos pacientes infectados pela bactéria, enquanto apenas 10% dos pacientes não infectados apresentaram tal desordem (Asaka et al., 2001).

A gastrite atrófica, particularmente quando afeta uma extensa porção do corpo gástrico, é associada à hipocloridria e com níveis menores de pepsinogênio (Leach et al., 1987). Essa redução da acidez gástrica permite a colonização do *H. pylori* e também de outras bactérias, o que, por sua vez, pode promover a formação de fatores carcinogênicos, os quais podem levar à metilação do DNA (Leach et al., 1987; Ming, 1998). Esse aspecto é de suma importância, pois, na

gastrite crônica atrófica, o aumento da proliferação das células epiteliais resulta na presença de células glandulares relativamente imaturas (Lipkin et al., 1985).

A metaplasia intestinal, que ocorre na sequência da gastrite atrófica, é definida como a substituição das células epiteliais colunares gástricas por células de morfologia intestinal, provavelmente resultando da diferenciação errônea das células-tronco gástricas em células intestinais (de Vries et al., 2007).

Essa alteração histológica é frequentemente identificada em tecido gástrico distal obtido por biópsia, especialmente nas populações de alto risco para o desenvolvimento do câncer gástrico, como as da Ásia Ocidental, Europa Ocidental e América Latina Andina. A metaplasia representa um estágio decorrente de um longo processo e o foco metaplásico parece surgir primeiramente na junção do antro com o corpo do estômago, especialmente na incisura *angularis*. Com o avanço da lesão, esse foco aumenta, estendendo-se para a mucosa ao redor tanto do antro quanto do corpo (Correa et al., 2010).

Por sua vez, a displasia gástrica, que ocorre em decorrência da metaplasia intestinal, é caracterizada pela variação no tamanho, formato e orientação das células epiteliais, na ampliação e na atipia do núcleo celular, e na distorção do arranjo glandular normal (Correa, 1995; de Vries et al., 2007). O diagnóstico da displasia é, muitas vezes, difícil, confundindo-se com a lesão cancerosa propriamente dita, especialmente pelas diferenças de observação que existem entre os patologistas do Japão e do Ocidente. No primeiro caso, o diagnóstico do câncer é feito com base nas anormalidades celulares e estruturais, enquanto, no segundo, considera-se a presença da invasão tecidual como um pré-requisito para o diagnóstico do câncer (de Vries et al., 2007).

De acordo com o entendimento atual, as células displásicas guardam semelhanças com as células malignas e, de fato, em alguns casos, podem realmente ser malignas. A maior parte dos adenocarcinomas encontrada em estudos nos quais houve o acompanhamento de pacientes, e nos quais a lesão foi descoberta no período de um ano após a identificação da displasia, indicam que o câncer estava presente já nessa fase (Ming, 1998).

Apesar dessas alterações, apenas uma pequena porcentagem de indivíduos com essas lesões pré-malignas irá realmente desenvolver o câncer gástrico. O risco da doença aumenta consideravelmente dependendo da persistência da infecção pelo *H. pylori*, da gravidade e da extensão das lesões, da idade, do uso habitual de bebidas alcoólicas e do fumo, dentre outros fatores, que podem ser determinantes para o progresso dessas lesões (Leung et al., 2004; Watabe et al., 2005).

Uma vez que essa cascata de eventos é ativada, provavelmente passa a ser independente da presença da bactéria. Um estudo realizado em uma área de alta incidência do câncer gástrico na China reflete a veracidade dessa informação. De 1994 a 2002 foram acompanhados 1630 indivíduos saudáveis e com resultados de exames positivos para a infecção pelo *H. pylori*. Uma incidência comparável foi encontrada com relação ao desenvolvimento do câncer gástrico entre os indivíduos que foram submetidos ao tratamento de erradicação da bactéria e aqueles que receberam placebo. Entretanto, em um subgrupo do estudo, a erradicação do micro-organismo mostrou diminuir significativamente o risco de desenvolver a doença em pacientes que não apresentavam lesões gástricas pré-cancerosas. Concluiu-se que o tratamento de erradicação do *H. pylori* pode reduzir de imediato o risco de desenvolvimento do câncer gástrico do tipo difuso, enquanto adenocarcinomas do tipo intestinal podem ser menos efetivamente prevenidos quando os pacientes são tratados de forma tardia, durante a evolução do processo carcinogênico (Wong et al., 2004).

O câncer gástrico do tipo difuso, por sua vez, frequentemente associado a características familiares, desenvolve-se no estômago após inflamação crônica, sem a presença dos passos intermediários da gastrite atrófica e da metaplasia intestinal. A gravidade da inflamação da mucosa e as características do hospedeiro podem diretamente induzir eventos mutagênicos que levam ao desenvolvimento do tumor (Asaka et al., 1998; Go, 2002). Além desses determinantes, diversas alterações moleculares são detectadas no adenocarcinoma do tipo difuso, as quais diferem do tipo intestinal. Dentre estas, podem ser citados o fenótipo MSI-H, responsável pelo reparo tanto dos danos

espontâneos quanto dos danos tóxicos ocorridos no DNA, o antígeno SC-1, um receptor da apoptose, e mutações na E-caderina (Tahara, 1995; Ottini et al., 1997; Gayther et al., 1998; Heyden et al., 1998), sendo que a maioria dessas alterações é associada à infecção pelo *H. pylori* (Nardone et al., 2004). O adenocarcinoma difuso, quando comparado ao intestinal, tem um pior prognóstico, com tendência a ocorrer em pacientes mais jovens e pode se desenvolver em qualquer região do estômago, principalmente na cárdia (Bruckner et al., 2003).

Estudo realizado na Nova Zelândia, com três grandes famílias étnicas da região, identificou mutações nas linhas embrionárias da E-caderina, tendo prova direta de que estas possuem relação direta com o desenvolvimento do câncer gástrico difuso (Guilford et al., 1998). Outra pesquisa também encontrou quinze mutações no gene que codifica a expressão da E-caderina em famílias nas quais esse tipo de adenocarcinoma é frequentemente diagnosticado (Caldas et al., 1999). Esses achados demonstram que as mutações que ocorrem nesse gene podem ser causa comum do adenocarcinoma gástrico do tipo difuso.

1.2.4- Associação entre os polimorfismos genéticos do hospedeiro, o gene p53 e o risco de desenvolvimento de câncer gástrico

Os fatores genéticos do hospedeiro são considerados importantes no processo da carcinogênese gástrica. Estudos realizados em populações dos Estados Unidos da América, da Europa e da Ásia demonstraram que o histórico familiar pode ser um fator de risco para o câncer gástrico (Lichtenstein et al., 2000; Dhillon et al., 2001; Yatsuya et al., 2002; García-González et al., 2007).

A infecção pelo *H. pylori* dá início à inflamação crônica mediada por citocinas (Bodger e Crabtree, 1998) e os genes que codificam essas substâncias possuem regiões polimórficas que podem alterar a transcrição gênica e consequentemente influenciar a resposta à infecção (Hurme et al., 1998).

A descoberta de que pacientes com câncer gástrico avançado possuem alto nível sorológico da interleucina-1 β (IL-1 β), uma potente citocina pró-inflamatória

que pode inibir a secreção ácida no estômago levando à atrofia gástrica, conduziu a diversos questionamentos sobre a associação entre os polimorfismos do gene da citocina e o risco de desenvolvimento do câncer gástrico (Kabir et al., 1995).

Com base em estudos realizados em pacientes caucasianos com câncer gástrico e infectados pelo *H. pylori* na Europa, evidenciou-se que dois polimorfismos na região denominada promotora do gene da IL-1 podem aumentar de duas a três vezes o risco de desenvolvimento da doença (El-Omar et al., 2000). Ademais, a combinação entre os genótipos da IL-1 β e os fatores de virulência bacterianos, como *vacA* s1, *vacA* m1 e *cagA* positivo, além de outros polimorfismos determinados com relação ao fator de necrose tumoral (TNF)- α e à IL-10, foram considerados importantes para o elevado risco de desenvolvimento da enfermidade (Figueiredo et al., 2002; El-Omar et al., 2003).

Apesar dos resultados acima relatados, essas investigações devem levar em consideração a falta de reprodutibilidade do estudo dentre diferentes populações. Por exemplo, um polimorfismo existente na IL-8 é associado a um risco elevado de desenvolvimento de câncer gástrico nas populações asiáticas, porém não em indivíduos caucasianos, provavelmente devido às diferenças genéticas existentes entre essas populações (Lu et al., 2005; Taguchi et al., 2005; Savage et al., 2006; Canedo et al., 2008).

Gene protetor contra as mutações que levam ao câncer, o p53 é uma proteína nuclear localizada no braço curto do cromossomo 17 e tem como função regular o ciclo celular, atuando como um gene supressor tumoral. Mutações ocorridas nesse local, como a troca de bases e a deleção ou inserção, exercem um papel de grande importância no desenvolvimento das doenças malignas (Joypaul et al., 1993; Hussain e Harris, 2000). Esse gene é ativado em diversas situações, especialmente quando ocorrem danos no DNA celular, hipóxia e diminuição do conjunto de trifosfato ribonucleosidases (Levine, 1997).

Com relação aos danos provocados no DNA, há duas formas de resposta do gene p53, quais sejam paralisar a divisão celular para reparo ou induzir a célula a cometer suicídio, o que é conhecido como apoptose. Ambas as alternativas

fazem com que seja interrompida a formação tumoral, prevenindo o crescimento das células que sofreram alterações malignas (Carr, 2000).

O próprio gene p53 é susceptível a danos, que são considerados contribuintes para o desenvolvimento de pelo menos metade de todos os tipos de câncer, incluindo os de cólon e de estômago. Para interromper a divisão celular ou promover a apoptose, o gene p53 precisa ligar-se ao DNA de vários genes danificados, o que não ocorre se a sua própria estrutura estiver deformada (Pennisi, 1999; Hagmann, 1999).

De maneira global, estudos do câncer em humanos demonstram que ocorrem mutações no gene p53 em pelo menos 100 diferentes pares de bases nucleotídicas, sendo que os locais e os tipos dessas mutações diferem de acordo com o tecido de origem; a razão para essa especificidade ainda não foi determinada. Uma das hipóteses é a de que essas mutações reflitam a contribuição do agente etiológico que atua nos diferentes tecidos (Puisieux et al., 1991; Hussain e Harris, 2000), como o *H. pylori* nas células gástricas.

1.2.5- Epidemiologia do câncer gástrico

Embora a incidência do câncer gástrico venha declinando nos Estados Unidos da América e na Europa ocidental nos últimos 50 anos, a doença é prevalente em várias partes do mundo, permanecendo como o quarto tipo mais comum de câncer e como a segunda causa mais frequente de mortes pela doença (Parkin, 2004; Fuccio et al., 2007).

Em geral, a incidência é mais elevada nas regiões orientais da Ásia e em algumas partes da América Latina, sendo relativamente baixa na América do Norte e em alguns locais da África (Kabir, 2009).

Com relação ao gênero, é a segunda causa mais frequente de morte por câncer entre os homens e a quarta entre as mulheres, ocorrendo com índices, em geral, duas vezes maiores em homens do que em mulheres (Kabir et al., 2009).

Aproximadamente dois terços dos casos de câncer gástrico ocorrem nos países em desenvolvimento e 42% apenas na China. A distribuição geográfica da doença é caracterizada pelas amplas variações internacionais. Áreas de alto risco incluem o Leste Asiático (China e Japão), a Europa Ocidental, e partes da América Central e do Sul. Incidências baixas da doença são encontradas no Sudeste Asiático, no Norte e no Leste da África, na América do Norte, na Austrália e Nova Zelândia (Parkin et al., 2005).

Embora haja sugestões de que o câncer gástrico seja raro na África (Holcombe, 1992), a incidência da doença na região central do país não é muito baixa, com índice estimado de ocorrência similar ao da Europa Ocidental (Parkin et al., 2003).

A sobrevivência de pacientes com câncer gástrico no Japão é relativamente boa, devido ao diagnóstico precoce da lesão. Também é elevada na América do Norte, provavelmente devido ao alto número de endoscopias realizadas visando o diagnóstico de sintomatologia digestiva alta. Na Europa Ocidental, estima-se uma sobrevivência de 27% e de menos de 6% na África sub-Saariana (Parkin et al., 2005).

Obviamente há um forte componente ambiental no que diz respeito às diferenças relativas ao risco da doença. Populações migrantes de áreas de alto risco para regiões onde este é menor apresentam uma diminuição nos seus índices, embora isso seja gradual e pareça depender da idade de migração (McMichael et al., 1980).

No Brasil, em 2000, as neoplasias ocuparam o segundo lugar entre as causas de morte, sendo superadas apenas pelas doenças do aparelho circulatório. Já em 2006, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 234.570 novos casos de câncer entre brasileiros do sexo masculino e 237.480, do sexo feminino, sendo os mais incidentes os de próstata e os de mama (Boing *et al.*, 2007). No estado de São Paulo, as informações das estatísticas processadas na Fundação Seade acusaram aumento dos óbitos por neoplasias malignas de 110,3% para os homens e de 126,7% para as mulheres, no período de 1980 a 2005. Com relação às taxas de mortalidade por neoplasias

do estômago houve um decréscimo significativo no período de 2000 a 2005, em pacientes masculinos, com mais de 40 anos. À semelhança do que aconteceu entre os homens, houve menor incidência do câncer de estômago no período analisado para as mulheres (SP Demográfico, 2007).

Para os anos de 2010 e 2011, estimativas do INCA relatam que o número de novos casos de câncer de estômago será de 13.820 entre os homens e de 7.680 entre as mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 14 casos novos para cada 100.000 homens e 8 para cada 100.000 mulheres (Instituto Nacional do Câncer, 2010).

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer gástrico em homens é o segundo mais frequente nas regiões Norte e Nordeste (10/100.000). Na região Centro-Oeste (12/100.000) é o terceiro e nas regiões Sul (19/100.000) e Sudeste (17/100.000), o quarto. Para as mulheres, é o terceiro mais frequente na região Norte (6/100.000), o quarto na região Nordeste (6/100.000) e nas demais regiões, Sul (10/100.000), Sudeste (9/100.000) e Centro-Oeste (6/100.000), o quinto (Instituto Nacional do Câncer, 2010).

1.2.6- Úlcera duodenal e câncer gástrico

Embora haja descrições de que o câncer gástrico não se desenvolve em pacientes com diagnóstico de úlcera duodenal (Uemura et al., 2001; Take et al., 2005; Kamada et al., 2005), estudos atuais demonstram que essa hipótese não é exatamente correta.

No Japão, a terapia de erradicação do *H. pylori* para prevenção do câncer gástrico foi avaliada em um grupo de pacientes com úlcera péptica e, entre esses indivíduos, seis com diagnóstico de úlcera duodenal desenvolveram a neoplasia. Nessa avaliação, concluiu-se que, como a infecção crônica pelo *H. pylori* pode resultar em gastrite tanto na região do corpo quanto na do antro gástricos, pacientes, especialmente de meia idade e de idade avançada, com úlcera duodenal, devem ser considerados de alto risco para o desenvolvimento do

câncer, especialmente do corpo gástrico, mesmo após terapia de erradicação bacteriana, dando-se ênfase às regiões de alta incidência da doença neoplásica (Mabe et al., 2009).

Corroborando com essa afirmação, estudo realizado em Taiwan chegou à conclusão de que a erradicação precoce da bactéria diminui consideravelmente o risco de desenvolvimento do câncer gástrico em pacientes com úlcera péptica (Wu et al., 2009).

1.2.7- A carcinogênese gástrica e a hipótese das células-tronco cancerosas

Relata-se que as células-tronco normais existem na maioria dos tecidos, incluindo o cérebro, a medula óssea e, provavelmente, o trato gastrointestinal.

O conceito mais aceito de regeneração tecidual no trato gastrointestinal é denominado de “Hipótese Unitária”, para o qual apenas uma célula tronco origina todas as demais linhagens celulares do epitélio (Cheng e Leblond, 1974; Potten et al., 1997; Brittan e Wright, 2004). Ao contrário, o denominado Conceito de Holzer, determina que a pluri-potencialidade celular possa ter origem em apenas um grupo de células e não em uma célula isolada (Holzer, 1978); porém estudos têm sugerido que a primeira hipótese ainda seja a mais plausível (Saikawa et al., 2010).

As linhagens de células epiteliais do estômago, sob condições normais, estão sob constante renovação, o que é modificado em caso de danos teciduais (Brittan e Wright, 2002). O modelo proposto para as células-tronco epiteliais intestinais pode ser usado similarmente para as gástricas, sugerindo-se que haja um sistema hierárquico de proliferação e diferenciação gerado por células embrionárias multipotentes (Wright, 2000). Diversos estudos sugerem que as células progenitoras estejam presentes na mucosa gástrica humana normal, e que as células-tronco encontram-se na região do pescoço e do istmo, dando origem aos diferentes tipos de células epiteliais (Karam et al., 2003).

Durante o processo de diferenciação, as células derivadas formam um complexo de migração bipolar, indo do pescoço e istmo para as regiões acima e abaixo destes, no organismo humano e, nesse ponto, acredita-se que a infecção pelo *H. pylori* possa modificar a distribuição e a migração dessas células (Takaiashi et al., 2009; Saikawa et al., 2010).

As células-tronco cancerosas, por sua vez, são definidas como aquelas presentes em um determinado tumor e que possuem a capacidade de autorregeneração, podendo originar diferenciações errôneas que levam à formação de células cancerosas constituintes do tumor (Clarke et al., 2006). A origem das células-tronco cancerosas gástricas ainda não foi elucidada, mas estudos realizados em modelos animais sugerem que essas alterações possam ser influenciadas pela infecção induzida pelo *H. pylori* (Saikawa et al., 2010). Dessa forma, mais estudos devem ser realizados na identificação e na caracterização das células-tronco no câncer gástrico, o que pode levar ao melhor diagnóstico e ao encontro do mais adequado tratamento, tornando cada vez melhor o prognóstico da doença (Saikawa et al., 2010).

1.3- Tratamento de erradicação do *H. pylori* e relação com a prevenção do câncer gástrico

1.3.1- Diretrizes de Tratamento

O Consenso de Maastricht de 1997 – “The European *Helicobacter pylori* Study Group” – definiu que a terapêutica foi recomendada eletivamente para os casos de úlcera gástrica ou duodenal, ativa ou não, com ou sem complicações, e linfoma gástrico tipo MALT, podendo ser realizada também para pacientes com gastrite acompanhada de alterações intensas da mucosa e para pacientes após ressecção de adenocarcinoma gástrico. Ao contrário, a terapêutica não foi indicada para erradicação do *H. pylori* em pessoas assintomáticas, em casos de

dispepsia funcional, em indivíduos com história familiar de câncer gástrico e em pacientes que faziam uso prolongado de AINEs (Malfertheiner et al., 1997).

Durante o II Consenso de Maastricht, no ano de 2000, levando-se em consideração os avanços no entendimento do *H. pylori*, foram revistos os citados esquemas terapêuticos e sua aplicabilidade. Dessa forma, assim como no primeiro consenso, a erradicação da bactéria foi fortemente recomendada em todos os pacientes com úlcera péptica, incluindo suas complicações, nos indivíduos com linfoma MALT, gastrite atrófica e após a ressecção de câncer gástrico. Diferente do consenso anterior, a terapêutica passou a ser recomendada para indivíduos com histórico familiar de câncer gástrico. Considerou-se, ainda, que os pacientes com dispepsia funcional também poderiam ser tratados, chegando à conclusão de que a erradicação bacteriana não é associada ao desenvolvimento do refluxo gastro-esofágico (Malfertheiner et al., 2002).

No III Consenso de Maastricht, realizado em 2005, as indicações para erradicação do *H. pylori* se mantiveram as mesmas, sendo sugeridas, ainda, possíveis relações do micro-organismo com doenças extragástricas, com base em diversos estudos. Foi recomendado, portanto, que a infecção pela bactéria fosse erradicada em pacientes com púrpura trombocitopênica imunológica e com anemia por deficiência de ferro de causa não conhecida (Malfertheiner et al., 2007).

Na Itália, as diretrizes para diagnóstico e tratamento da infecção pelo *H. pylori*, reafirmaram que pacientes com úlcera péptica, com ou sem complicações, linfoma MALT, indivíduos submetidos à ressecção de câncer gástrico precoce e pessoas com histórico familiar de câncer gástrico devem receber a terapia para erradicação do micro-organismo (Caselli et al., 2007). Também ficou definido o tratamento de pacientes com dispepsia funcional, diferentemente das primeiras diretrizes italianas (Caselli et al., 2001).

No Brasil, em 2004, o II Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori*, definiu que pacientes com úlcera gastroduodenal ativa ou cicatrizada, linfoma MALT de baixo grau, pós-cirurgia para câncer gástrico avançado (com gastrectomia parcial), pós-ressecção de câncer gástrico precoce (endoscópica ou

cirúrgica) e gastrite histológica intensa devem ser submetidos ao tratamento de erradicação da bactéria (Coelho et al., 2005).

Além das indicações de tratamento já definidas pelos consensos citados, as diretrizes estabelecidas pelo II Consenso da Ásia-Pacífico determinaram a erradicação da bactéria nos casos de pacientes com dispepsia funcional infectados com o *H. pylori*, nos pacientes em tratamento a longo prazo com inibidores da bomba de prótons (PPIs) para doença do refluxo gastroesofágico, e nos casos de anemia por deficiência de ferro de origem desconhecida e púrpura trombocitopênica idiopática (Fock et al., 2009).

Ainda, as diretrizes estabelecidas pela Sociedade Alemã para Doenças Digestivas e Metabólicas indicam a terapia para erradicação bacteriana nos mesmos casos que os demais consensos, sendo que, para pacientes com dispepsia funcional, o tratamento foi considerado facultativo (Fischbach et al., 2009).

No que diz respeito ao câncer gástrico, estudo recente realizado no Japão (Fukase et al., 2008), demonstrou claramente que o tratamento de erradicação da bactéria, sendo este realizado com sucesso, diminui drasticamente a incidência de desenvolvimento do câncer gástrico. Partindo dessas considerações, foi demonstrado também que, mesmo na mucosa próxima ao tecido canceroso, o desenvolvimento subsequente da lesão fora suprimido pela cura da infecção pelo *H. pylori*, confirmando, mais uma vez, a importância do tratamento da gastrite relacionada à bactéria (Shiota e Yamaoka, 2010).

Em Taiwan, uma pesquisa chegou à conclusão de que a erradicação precoce da bactéria diminui consideravelmente o risco de desenvolvimento do câncer gástrico em pacientes com úlcera péptica (Wu et al., 2009). Também, outro estudo considerou que a erradicação bacteriana pode reduzir o risco de desenvolvimento de lesões cancerosas, comparando-se dois grupos de pacientes, tratados e não tratados, e determinando o número de casos de câncer gástrico prescritos em certo período (Fuccio et al., 2009).

Apesar desses dados, é importante reconhecer que a erradicação da infecção em pacientes com lesões pré-cancerosas não irá prevenir a totalidade de

casos de desenvolvimento do câncer (Wong et al., 2004), acrescentando-se que as diretrizes do Consenso Ásia-Pacífico concluíram que o tempo apropriado para erradicação da bactéria no que diz respeito ao câncer é previamente ao aparecimento da atrofia e metaplasia intestinal (Malfertheiner et al., 2007; Shiota e Yamaoka, 2010).

Dessa forma, em populações consideradas de alto risco para o câncer gástrico, como as do Japão e da Coréia, os exames endoscópicos de rotina continuam a ser o melhor esquema de prevenção. Além disso, novas modalidades de tratamento para erradicação do *H. pylori* também deverão ser disponibilizadas e são esperadas, particularmente quando essas terapias forem implementadas para a prevenção do câncer gástrico, especialmente em determinadas regiões do mundo, onde a ocorrência da doença é maior (Kusters et al., 2006).

Atualmente, as terapias antimicrobianas tripla e quádrupla permanecem a principal forma de tratamento para as infecções causadas pelo *H. pylori*, com excelente eficácia na maior parte dos pacientes. A denominada terapia tripla é mundialmente recomendada para o tratamento da infecção pelo *H. pylori*, consistindo de um inibidor da bomba protônica, amoxicilina e claritromicina, duas vezes ao dia, por via oral, durante 7 ou 14 dias, conforme o caso (Magalhães e Zeitune, 1997; Pinheiro et al., 1999; Vieira et al., 2001). Regimes contendo furazolidona também podem ser empregados, sendo bastante úteis para pacientes com impedimento para o uso da amoxicilina (Coelho et al., 2005). A terapia quádrupla, por sua vez, utiliza, em geral, um fármaco inibidor da secreção de ácido, um sal de bismuto, metronidazol e tetraciclina, por um período mínimo de sete dias (Saad et al., 2006).

Finalmente, a vacinação permanece como uma importante estratégia para a infecção pelo *H. pylori*. A disponibilidade de uma vacina tanto profilática quanto terapêutica vem sendo estudada em modelos animais (Ghiara et al., 1997). Entretanto, uma vacina com essas duas propriedades ainda não foi desenvolvida para os seres humanos (Kabir, 2007).

1.3.2- Erradicação do *H. pylori* e prevenção do câncer gástrico

Embora a incidência do câncer gástrico venha diminuindo nas últimas décadas em várias regiões, os índices relativos à sobrevivência dos pacientes permanecem inalterados (Cheung e Wong, 2008).

Apesar de pesquisas realizadas em modelos animais terem revelado que a prevenção primária do câncer gástrico através da erradicação do *H. pylori* pode ser efetiva (Nozaki et al., 2003), os efeitos desse tratamento em seres humanos ainda não foram suficientemente determinados (Mabe et al., 2009).

Há diversos estudos, que refletem resultados muitas vezes conflitantes, no que diz respeito à possibilidade de prevenção do desenvolvimento do câncer gástrico quando a erradicação do *H. pylori* é feita no momento em que lesões pré-cancerosas, como a gastrite atrófica, a metaplasia intestinal e a displasia, ainda estão presentes.

Um estudo realizado na China demonstrou, em determinado grupo de pacientes, a regressão da gastrite crônica tanto do antro quanto do corpo gástricos e a diminuição da metaplasia intestinal no antro após a erradicação bacteriana. Quatro anos após essa análise, acompanhando o mesmo grupo de indivíduos para o qual foi realizada a terapia de erradicação bacteriana, observou-se uma diminuição da gravidade e da atividade da gastrite crônica, mantendo-se no estágio anterior a metaplasia intestinal. Para outro grupo de pacientes do mesmo estudo, que foi tratado com placebo, a infecção pelo *H. pylori* levou à progressão da metaplasia intestinal e da atrofia gástrica (Sung et al., 2000).

Da mesma maneira, estudo realizado em dois grupos de pacientes com gastrite atrófica com ou sem metaplasia intestinal, demonstrou que a terapia de erradicação do *H. pylori*, que foi feita em conjunto ou não com antioxidantes como o ácido ascórbico e o betacaroteno, em comparação com o uso de placebos, levou a uma importante diminuição no desenvolvimento de lesões pré-cancerosas (Correa et al., 2000). Esse mesmo grupo de indivíduos, seguido durante doze anos após a pesquisa, e com efetiva erradicação bacteriana, demonstrou uma

regressão das lesões pré-cancerosas equiparando-se aos resultados encontrados em indivíduos não infectados pelo micro-organismo (Mera et al., 2005).

Nessa mesma linha de raciocínio, estudos prospectivos e retrospectivos realizados no Japão também sugerem que a terapia de erradicação bacteriana previne o desenvolvimento do câncer gástrico (Take et al., 2005; Kamada et al., 2005; Takenaka et al., 2007; Ogura et al., 2008).

Por outro lado, na China, uma pesquisa realizada em larga escala não sustenta essa afirmação. Uma análise prévia de pacientes que não apresentavam lesões pré-cancerosas demonstrou que a erradicação do *H. pylori* pode ser importante na prevenção da doença, entretanto, esse fato não implica em um decréscimo significativo da incidência do câncer na região estudada (Wong et al., 2004; Fuccio et al., 2007).

Com relação ao câncer detectado precocemente, a ressecção da mucosa gástrica através de endoscopia conserva apenas o tecido não canceroso, mas isso não elimina a probabilidade de recorrência do câncer (Ono et al., 2001). Estudo multicêntrico realizado em pacientes submetidos à ressecção endoscópica para tratamento do câncer precoce e que apresentavam alto risco de desenvolvimento de lesões secundárias de câncer, demonstrou que a ocorrência destas foi prevenida de forma significativa através do tratamento de erradicação do *H. pylori* (Fukase et al., 2008).

Assim, todos esses estudos demonstraram que a erradicação do micro-organismo pode induzir a regressão de lesões pré-cancerosas, apesar de uma significativa proporção de pacientes manter a sua progressão, levando ao desenvolvimento do câncer gástrico. Na verdade, esse fato indica que tais lesões devem ter passado de um ponto em que não há retorno, para o qual o câncer gástrico não pode mais ser prevenido pela erradicação do *H. pylori* (Wong et al., 2004; Fuccio et al., 2007; Cheung e Wong, 2008).

Concluindo, embora a erradicação do *H. pylori* seja uma estratégia efetiva na redução do risco de desenvolvimento do câncer gástrico, ela não é suficientemente eficiente para a erradicação da doença. A prevenção da infecção pela bactéria, a imunização contra o *H. pylori*, a erradicação bacteriana na

juventude, a seleção das populações de alto risco para a doença e medidas terapêuticas preventivas devem tornar-se essenciais para o controle das neoplasias de estômago (Tsuji et al., 2006).

1.3.3- Erradicação do *H. pylori* e câncer gástrico em modelos animais

Diversos modelos animais têm sido utilizados para o entendimento da associação entre a infecção pelo *H. pylori* e as doenças gástricas, contudo, encontrando ou não similaridade com a situação dos humanos.

Estudo realizado no Japão com macacos demonstrou que a infecção pelo *H. pylori* pode causar gastrite atrófica, aumento da proliferação celular, e a mutação do gene p53 nas células gástricas epiteliais. Apesar disso, o câncer gástrico não se desenvolveu nesses animais, indicando a necessidade de um longo período de infecção (Oda et al., 2002).

Dentre os roedores, um estudo induziu, por um longo período, a infecção pelo *H. pylori*, encontrando alterações histológicas semelhantes às que ocorrem em humanos (Hirayama et al., 1996). Duas abordagens, com ou sem a administração de carcinógenos, foram feitas para demonstrar o desenvolvimento do câncer gástrico nesses animais. Quando esses animais foram infectados pelo *H. pylori* concomitantemente ao uso de um carcinógeno, houve o desenvolvimento do câncer gástrico, tanto do tipo difuso quanto do intestinal, com frequência significativamente maior do que nos animais infectados apenas com a bactéria ou somente com o carcinógeno (Sugiyama et al., 1998; Shimizu et al., 1999; Tokieda et al., 1999). Esses resultados refletem a importância da erradicação do micro-organismo para a prevenção da carcinogênese, especialmente nos seus estágios iniciais, apesar de não estabelecerem uma associação direta da bactéria com o câncer.

Outros estudos, usando como cobaias o mesmo tipo de roedores, demonstraram, após infecção pelo *H. pylori*, o aparecimento de gastrite crônica ativa, seguida de gastrite atrófica, metaplasia intestinal e displasia, além de câncer

gástrico do tipo intestinal na região distal do estômago dos animais estudados, assim como ocorre em humanos. O câncer gástrico não foi observado nos animais que receberam terapia antimicrobiana antes da inoculação da bactéria. Por sua vez, nos animais que receberam a terapia após oito semanas da infecção, houve uma diminuição da inflamação, porém não a completa prevenção de lesões pré-malignas e malignas, indicando que a erradicação bacteriana pode ser efetiva quando administrada em uma fase precoce da infecção (Watanabe et al., 1998; Zheng et al., 2004).

Apesar dessas conclusões, sugere-se que o potencial carcinogênico do *H. pylori* seja dependente da cepa e que muitos dos resultados negativos para a neoplasia obtidos nesses modelos animais possam ser devidos ao uso de uma cepa bacteriana com baixo ou nenhum potencial carcinogênico (Franco et al., 2005).

1.4- Biologia molecular para o diagnóstico

A infecção pelo *H. pylori* pode ser diagnosticada através de vários métodos, que são classificados em diretos ou invasivos e indiretos ou não-invasivos, dependendo ou não da necessidade de realização de endoscopia digestiva alta e retirada de fragmentos do tecido gástrico por biópsia para análise (Mégraud, 1996; Thijs et al., 1996, Czinn, 2005).

Dentre os métodos invasivos, que, portanto, requerem amostras de fragmentos gástricos, estão o teste rápido da urease, o exame histológico, a cultura e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Já os principais métodos não-invasivos são o teste respiratório da uréia marcada, a sorologia e a pesquisa do antígeno nas fezes.

Diversos estudos realizados na última década têm demonstrado claramente que múltiplas alterações genéticas são responsáveis pelo desenvolvimento e pelo avanço do câncer gástrico, sendo evidente que diferentes caminhos genéticos

podem determinar a doença, tanto do tipo difuso quanto intestinal (Thompson et al., 1993; Tahara, 1995, Fuch e Mayer, 1995, Becker et al., 2000).

Assim, a patologia molecular, que permite um melhor entendimento da patogênese de diversas doenças, juntamente com a genotipagem de micro-organismos é uma ferramenta bastante útil, especialmente, para estudos epidemiológicos, podendo definir a origem e a rota das infecções, para o estudo dos índices de persistência e de reinfecções, e para a seleção clonal no hospedeiro e na evolução bacteriana (Colding et al., 1999; Becker et al., 2000).

Especificamente no que diz respeito aos micro-organismos, os métodos de tipagem, que se classificam em fenotípicos e genotípicos (Struelens et al., 1996), têm grande importância para a compreensão das cepas mais prevalentes em determinada doença, o que, juntamente com outros fatores, pode levar à melhor compreensão da patogênese das enfermidades provocadas por eles (Colding et al., 1999).

A PCR é um procedimento *in vitro*, extremamente sensível e específico, que objetiva à amplificação de uma região específica do DNA localizada entre duas regiões de uma sequência conhecida dessa estrutura, sendo bastante útil para identificação e detecção de micro-organismos.

As vantagens da PCR são diversas, sendo citadas como as principais a relativa simplicidade de execução, o tempo utilizado para obtenção dos resultados e a possibilidade de genotipagem dos produtos obtidos. Além disso, a PCR possibilita a utilização de materiais retrospectivos em pesquisas e mesmo o uso de amostras que contenham pequena quantidade de DNA, fornecendo resultados compatíveis com os esperados (Newton e Graham, 1998).

Estudo realizado no Brasil, por exemplo, avaliando possíveis diferenças genéticas entre cepas do *H. pylori* provenientes de amostras de tecido gástrico de pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica corrobora a importância do uso da PCR no diagnóstico de micro-organismos e, conseqüentemente, no entendimento da enfermidade decorrente da presença destes. Essa pesquisa, que fez a análise de duas regiões genômicas da bactéria, urease C e urease B, encontrou resultados não significativos entre as cepas presentes nas doenças avaliadas,

porém permitiu que fosse traçado um perfil genético do *H. pylori* nos pacientes estudados (Roesler et al., 2009).

Dessa maneira, devido à importância da infecção pelo *H. pylori* no desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico, a determinação das cepas prevalentes na doença é de vital importância, especialmente se houver a possibilidade de ser identificado um perfil genético da bactéria presente nos casos de câncer precoce e avançado, para os quais pode haver uma diferença importante ou não. Tal identificação pode, inclusive, servir como base para um programa de genotipagem das cepas bacterianas, identificando, em conjunto com outros fatores, indivíduos com maior probabilidade de desenvolverem a doença.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho foi realizar a comparação de cepas do *H. pylori* encontradas em amostras de tecido gástrico obtidas de dois grupos de pacientes, um com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico distal do tipo intestinal precoce e outro com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico distal do tipo intestinal avançado, com a finalidade de se avaliar possíveis e importantes diferenças entre as cepas da bactéria presentes em um estágio da enfermidade ou no outro. Para tanto, foram utilizadas técnicas de biologia molecular para análise de diversas regiões genômicas da bactéria, as quais foram, então, comparadas estatisticamente de forma individual e, posteriormente, conjunta, ou seja, com a comparação dos genótipos estudados.

CASUÍSTICA

3- CASUÍSTICA

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Patologia do Centro de Diagnóstico de Doenças do Aparelho Digestivo (Gastrocentro) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da mesma universidade.

A pesquisa foi aprovada e acompanhada, através de relatórios anuais, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, sob processo nº. 704/2006 (Anexo 01).

Ainda, em conformidade com as Resoluções 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde, há a autorização do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia para o armazenamento das amostras de DNA (Anexo 02). As amostras de tecido gástrico fixadas e emblocadas em parafina, após o uso, permaneceram arquivadas no Laboratório de Patologia do Gastrocentro.

Os pacientes foram escolhidos aleatoriamente no banco de dados e no arquivo de lâminas do Laboratório de Patologia do Gastrocentro, sendo avaliados, em primeiro plano, indivíduos com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico de forma geral.

Dessa forma, um total de 89 pacientes foi selecionado, de forma aleatória, após rigorosa análise, para que se conseguissem dois grupos homogêneos, inclusive entre si, um com diagnóstico de câncer gástrico distal do tipo histológico intestinal precoce, composto por 31 pacientes (Apêndice I), e outro, com diagnóstico de câncer gástrico distal do tipo histológico intestinal avançado, com 58 pacientes (Apêndice II).

Foram revisados todos os prontuários desses pacientes no Serviço de Arquivo Médico (SAM) do Hospital das Clínicas da UNICAMP, sendo verificados os dados de cada um deles e analisados os diagnósticos clínico, endoscópico e

histopatológico das amostras de tecido que foram coletadas por endoscopia e/ou após tratamento cirúrgico da neoplasia.

Dessa maneira, em primeiro plano, foram avaliados os resultados da endoscopia digestiva alta (EDA) realizada em todos os pacientes pelo Serviço de Endoscopia Digestiva do Gastrocentro. Foram considerados como casos para esse estudo todos aqueles que apresentaram lesão compatível com adenocarcinoma de localização distal. Indivíduos com o mesmo tipo de lesão, porém localizada em cárdia, corpo ou fundo gástricos foram automaticamente excluídos. Amostras do tecido da lesão, assim como de sua região periférica, foram coletadas por biópsia para avaliação histopatológica no momento do exame endoscópico. Os resultados das endoscopias encontram-se descritos nas tabelas 01 e 02, respectivamente, com relação ao diagnóstico de adenocarcinoma precoce e avançado.

Tabela 01 – Dados obtidos na endoscopia digestiva alta realizada pelos pacientes com diagnóstico prévio de adenocarcinoma gástrico distal precoce; data de coleta do tecido por biópsia e resultado da endoscopia.

Amostra	Paciente	DATA E.D.A.	RESULTADO E.D.A.
P 01	R P M	19/11/1998	neoplasia gástrica precoce II-c de antro
P 03	F C	4/5/2005	neoplasia gástrica precoce II-c de antro
P 04	J S O	25/4/2001	neoplasia gástrica precoce de antro
P 05	P C	6/8/2001	neoplasia gástrica precoce de antro
P 06	A M A	4/4/1994	neoplasia gástrica precoce de antro
P 07	R F	1/4/1998	neoplasia gástrica precoce de antro
P 08	M A A	17/6/2002	neoplasia gástrica precoce II-a + II-c de antro
P 09	A S A	10/10/1994	neoplasia gástrica precoce II-c de antro
P 10	E L O	9/10/1998	neoplasia gástrica precoce de antro
P 12	J A	10/2/2003	neoplasia gástrica precoce de antro
P 13	A V A	27/5/1999	neoplasia gástrica precoce II-c + III de antro
P 14	L G F L N	22/3/1993	neoplasia gástrica precoce de antro
P 15	E G P	23/4/2004	neoplasia gástrica precoce de antro
P 16	E C Z	27/3/2000	neoplasia gástrica precoce II-c + III de antro
P 17	S K	4/5/2001	neoplasia gástrica precoce II-a de antro
P 18	S M P	11/12/2000	neoplasia gástrica precoce I de antro
P 19	Z A A	6/10/1993	neoplasia gástrica precoce II-c + III de antro
P 20	C S	10/8/2005	neoplasia gástrica precoce II-c de antro
P 21	G D	20/7/2005	neoplasia gástrica precoce de antro

P 22	M O O G	16/8/2005	neoplasia gástrica precoce de antro
P 24	J L D	3/5/2005	neoplasia gástrica precoce de antro
P 25	F D S	4/4/2005	neoplasia gástrica precoce II-c de antro
P 28	S R	31/7/2006	neoplasia gástrica precoce de antro
P 29	A S	6/6/2007	neoplasia gástrica precoce II-c de antro
P 30	G T	9/4/2007	neoplasia gástrica precoce de antro
P 31	C G G	12/6/1995	neoplasia gástrica precoce II-c de antro
P 32	N P S S	7/8/2000	neoplasia gástrica precoce de antro
P 33	P P S	18/8/2008	neoplasia gástrica precoce II-a + II-c de antro
P 34	L B	7/11/2002	neoplasia gástrica precoce
P 35	I C S	21/9/2006	neoplasia gástrica precoce
P 36	V J S	11/6/2008	neoplasia gástrica precoce

TOTAL = 31 Pacientes

E.D.A. = Endoscopia Digestiva Alta

Tabela 02 – Dados obtidos na endoscopia digestiva alta realizada pelos pacientes com diagnóstico prévio de adenocarcinoma gástrico distal avançado; data de coleta do tecido por biópsia e resultado da endoscopia.

Amostra	Paciente	DATA E.D.A.	RESULTADO E.D.A.
A 01	W C	21/12/2006	neoplasia avançada de antro gástrico Borrmann III
A 03	A A B	16/11/2006	neoplasia gástrica avançada de antro
A 04	R A M	5/1/2006	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 05	J F	1/11/2006	lesão gástrica avançada de antro
A 06	G B	19/7/2006	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 07	R C T E	4/7/2006	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 08	V P	6/7/2006	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 09	C Z	7/6/2006	neoplasia gástrica avançada de antro
A 10	O Z	13/6/2006	neoplasia gástrica avançada de antro
A 11	J D M	5/6/2006	lesão ulcerada infiltrativa de antro Borrmann III
A 12	S L L	24/5/2006	neoplasia gástrica avançada em antro
A 13	M C F	29/5/2006	lesão gástrica sugestiva de neoplasia avançada
A 14	J F N	27/4/2006	lesão ulcerada obstrutiva de antro Borrmann V
A 15	J G S	25/4/2006	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 16	M S C	6/4/2006	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 17	A A G	1/2/2006	neoplasia gástrica avançada de antro
A 18	S F R	22/02/2006	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 19	T J B	8/2/2006	lesão ulcerada infiltrativa de antro gástrico
A 20	A C B	18/1/2006	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 24	M C	11/1/2006	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 25	A E P	4/1/2006	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 26	J M C	16/1/2006	lesão ulcerada de antro Borrmann III

A 27	O M	4/1/2006	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 28	N L P M	9/1/2006	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 29	M P	9/1/2006	lesão ulcerada de antro Borrmann III
A 30	V A S	27/11/2006	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 31	A B G	26/10/2007	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 32	R B O	26/10/2007	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 33	M M D	25/10/2007	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 34	J C P	23/10/2007	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 35	N S S S	15/10/2007	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 37	L A	3/8/2007	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 38	M M O	16/7/2007	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 40	E M	26/4/2007	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 41	A O	29/3/2007	neoplasia gástrica invasiva de antro Borrmann V
A 42	E S	9/4/2007	neoplasia gástrica avançada Borrmann IV
A 43	L C M	28/3/2007	lesão úlcero-infiltrativa em antro Borrmann III
A 44	J R L	26/3/2007	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 45	Y Y	26/3/2007	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 46	J A S	12/3/2007	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 48	H A	8/2/2007	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 49	Z D A G	29/1/2007	neoplasia gástrica avançada antral Borrmann III
A 51	I B M	3/10/2005	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 52	R A F	28/9/2005	lesão úlcero-infiltrativa em antro
A 53	M B N	16/9/2005	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 54	J R A	2/8/2005	neoplasia gástrica avançada antral Borrmann IV
A 56	B G S	4/7/2005	lesão antral avançada
A 57	B L	9/6/2005	lesão ulcerada de antro
A 58	A J S	8/6/2005	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 59	E P H	1/6/2005	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 60	J L	20/5/2005	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 62	D P S	4/4/2005	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 63	S F O	29/4/2005	neoplasia gástrica avançada de antro
A 64	B A R	14/12/2005	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann III
A 65	C R A F	12/12/2005	neoplasia gástrica avançada de antro
A 66	P M	5/1/1995	neoplasia gástrica avançada de antro Borrmann IV
A 67	E M C	4/2/2008	lesão úlcero-infiltrativa em antro Borrmann IV
A 68	R S	24/3/2008	lesão ulcerada em antro

TOTAL = 58 Pacientes

E.D.A. = Endoscopia Digestiva Alta

Em seguida a essa observação, foram analisados os dados histológicos das amostras de tecido gástrico provenientes da lesão e suas margens, coletadas por biópsia endoscópica, confirmando, assim, os casos de adenocarcinoma gástrico distal, precoce ou avançado.

Com relação ao tipo histológico, todos os pacientes, tanto de um grupo quanto do outro, foram diagnosticados com adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal. Os indivíduos que tiveram diagnóstico de adenocarcinoma do tipo difuso foram automaticamente excluídos do estudo.

Tanto o tecido gástrico obtido na endoscopia quanto as amostras de tecido do tumor retirado dos pacientes que foram submetidos à cirurgia foram fixados e emblocados em parafina, armazenados no Laboratório de Patologia do Gastrocentro.

No que diz respeito às amostras de tecido tumoral, estas foram armazenadas em diversos blocos, com cortes histológicos diferentes, uns contendo apenas este e outros contendo, além deste tecido propriamente dito, as margens de ressecção livres de células cancerosas.

Todas as amostras, durante a análise do tecido obtido por biópsia endoscópica, apresentaram, em geral, resultados positivos na avaliação histológica realizada em microscópio óptico para a presença do *H. pylori*. Em alguns casos, a bactéria também foi encontrada nas amostras obtidas após cirurgia, porém não exatamente no tecido tumoral, mas sim em suas margens.

As tabelas 03 e 04 mostram os dados histopatológicos obtidos com relação à análise da presença ou não do *H. pylori* nas amostras de tecido gástrico coletadas tanto na biópsia endoscópica quanto na cirurgia, para os pacientes com adenocarcinoma precoce e avançado, respectivamente. Também estão discriminadas as datas das coletas de cada tecido, para cada paciente, que teve uma ou mais amostras coletadas, e os respectivos números das lâminas e dos blocos de parafina armazenados. Nos casos de mais de um bloco, as amostras foram classificadas em “A”, “B”, “C” e assim por diante. As amostras que não tiveram esse resultado descrito foram classificadas como “não avaliado” (N.A.).

Tabela 03 – Dados histopatológicos das amostras dos pacientes com adenocarcinoma gástrico precoce.

Amostra	Paciente	Data das coletas	Número dos blocos / lâminas	<i>H. pylori</i>
P 01	R P M	20/11/1998	P 01-A - 23389	N.A.
		09/03/2001	P 01-B - 30855	N.A.
		10/12/2001	P 01-C - 33340	positivo
		14/07/2005	P 01-D - 40767	positivo
		04/05/2005	P 03-A - 43153	positivo
P 03	F C	13/06/2005	P 03-B - 43527	positivo
P 04	J S O	06/07/2005	P 03-C - 43779	N.A.
P 05	P C	25/04/2001	P 04 - 31292	positivo
		06/08/2001	P 05-A - 32391	N.A.
P 06	A M A	08/08/2001	P 05-B - 32431	positivo
P 07	R F	05/04/1994	P 06 - 7403	positivo
		02/04/1998	P 07-A - 21263	positivo
P 08	M A A	05/03/1999	P 07-B - 24240	N.A.
P 09	A S A	18/06/2002	P 08 - 34957	positivo
		10/10/1994	P 09-A - 9518	positivo
		09/01/1995	P 09-B - 10342	N.A.
P 10	E L O	06/02/1995	P 09-C - 10535	N.A.
P 12	J A	09/10/1998	P 10 - 23013	positivo
		10/02/2003	P 12-A - 36789	positivo
P 13	A V A	12/02/2003	P 12-B - 36821	N.A.
P 14	L G F L N	28/05/1999	P 13 - 25125	positivo
		22/03/1993	P 14-A - 3182	positivo
		05/05/1993	P 14-B - 3610	N.A.;
		09/11/1995	P 14-C - 13492	N.A.
		12/04/2000	P 14-D - 28076	positivo
P 15	E G P	26/05/2003	P 14- E - 37533	N.A.
P 16	E C Z	23/04/2004	P 15 - 40122	positivo
		14/03/2000	P 16-A - 27767	positivo
P 17	S K	29/03/2000	P 16-B - 27925	N.A.
		10/05/2001	P 17-A - 31464	positivo
P 18	S M P	03/04/2003	P 17-B - 37219	N.A.
		17/11/2000	P 18-A - 29995	positivo
		13/12/2000	P 18-B - 30220	N.A.
P 19	Z A A	06/10/1993	P 19-A - 5307	positivo
		16/11/1993	P 19-B - 5771	N.A.;
P 20	C S	13/10/2004	P 19-C - 41499	positivo
P 21	G D	24/08/2005	P 20 - 44249	positivo
		03/08/2005	P 21-A - 44021	positivo
P 22	M O O G	24/08/2005	P 21-B - 44250	N.A.
P 24	J L D	16/08/2005	P 22-A - 44158	positivo
		17/08/2005	P 22-B - 44181	N.A.
P 25	F D S	03/05/2005	P 24-A - 43144	N.A.
		10/06/2005	P 24-B - 43520	positivo
		04/04/2005	P 25-A - 42850	positivo
P 25	F D S	19/05/2005	P 25-B - 43318	positivo
		15/06/2005	P 25-C - 43554	positivo

		21/09/2005	P 25-D - 44516	positivo
		19/10/2005	P 25-E - 44817	positivo
		08/03/2006	P 25-F - 45916	N.A.
P 28	S R	13/07/2006	P 28-A - 47234	positivo
		31/07/2006	P 28-B - 47417	N.A.
		11/06/2007	P 29-A - 50577	positivo
		19/12/2007	P 29-B - 52555	positivo
P 29	A S	13/02/2008	P 29-C - 53044	N.A.
		10/04/2007	P 30-A - 49924	positivo
P 30	G T	20/04/2007	P 30-B - 50070	N.A.
		26/01/1996	P 31-A - 14227	positivo
		20/11/1997	P 13-B - 20401	positivo
P 31	C G G	22/10/1998	P 13-C - 23089	positivo
		07/08/2000	P 32-A - 28953	N.A.
		30/10/2002	P 32-B - 36086	positivo
P 32	N P S S	24/03/2003	P 32-C - 37129	positivo
		18/08/2008	P 33-A - 55176	N.A.
P 33	P P S	12/09/2008	P 33-B - 55438	positivo
		07/11/2002	P 34-A - 36181	positivo
P 34	L B	18/08/2003	P 34-B - 38159	positivo
		21/09/2006	P 35-A - 48005	positivo
		14/03/2008	P 35-B - 53416	N.A.
P 35	I C S	11/06/2008	P 35-C - 54313	positivo
P 36	V J S	11/06/2008	P 36 - 54294	positivo

TOTAL = 70 amostras

N. A. = Não avaliado.

Tabela 04 – Dados histopatológicos das amostras dos pacientes com adenocarcinoma gástrico avançado.

Amostra	Paciente	Data das coletas	Número dos blocos / lâminas	<i>H. pylori</i>
A 01	W C	21/12/2006	A 01 - 48873	positivo
A 03	A A B	16/11/2006	A 03 - 48563	positivo
		05/01/2006	A 04-A - 45354	positivo
		24/01/2006	A 04-B - 45554	N.A.
A 04	R A M	14/11/2006	A 04-C - 48546	N.A.
A 05	J F	01/11/2006	A 05 - 48436	positivo
		19/07/2006	A 06-A - 47307	positivo
A 06	G B	04/09/2006	A 06-B - 47808	positivo
		06/07/2006	A 07-A - 47159	positivo
A 07	R C T E	11/07/2006	A 07-B - 47198	N.A.
A 08	V P	07/07/2006	A 08 - 47176	positivo
		08/06/2006	A 09-A - 46874	positivo
A 09	C Z	14/06/2006	A 09-B - 46958	N.A.
A 10	O Z	13/06/2006	A 10 - 46944	positivo
		05/06/2006	A 11-A - 46833	positivo
A 11	J D M	09/06/2006	A11-B - 46910	N.A.

		24/05/2006	A 12-A - 46702	positivo
A 12	S L L	02/06/2006	A 12-B - 46824	N.A.
A 13	M C F	29/05/2006	A 13 - 46748	Positivo
A 14	J F N	09/05/2006	A 14 - 46522	Positivo
A 15	J G S	26/04/2006	A 15 - 46416	Positivo
		06/04/2006	A 16-A - 46249	positivo
A 16	M S C	28/11/2006	A 16-B - 52306	N.A.
		01/02/2006	A 17-A - 46523	positivo
A 17	A A G	01/02/2006	A 17-B - 46524	positivo
A 18	S F R	22/02/2006	A 18 - 45827	Positivo
A 19	T J B	08/02/2006	A 19 - 45682	Positivo
		07/02/2006	A 20-A - 45497	positivo
A 20	A C B	07/02/2006	A 20-B - 45667	N.A.
		11/01/2006	A 24-A - 45435	positivo
A 24	M C	19/01/2006	A 24-B - 45489	N.A.
A 25	A E P	05/01/2006	A 25 - 45360	Positivo
A 26	J M C	16/01/2006	A 26 - 45467	Positivo
		05/01/2006	A 27-A - 45361	positivo
A 27	O M	12/01/2006	A 27-B - 45440	N.A.
A 28	N L P M	10/01/2006	A 28 - 45404	Positivo
A 29	M P	09/01/2006	A 29 - 45391	Positivo
		28/11/2007	A 30-A - 52304	positivo
A 30	V A S	05/12/2007	A 30-B - 52388	N.A.
A 31	A B G	26/10/2007	A 31 - 52033	Positivo
		26/10/2007	A 32-A - 52034	positivo
A 32	R B O	05/11/2007	A 32-B - 52114	N.A.
A 33	M M D	25/10/2007	A 33 - 52015	Positivo
		24/10/2007	A 34-A - 52001	positivo
A 34	J C P	09/11/2007	A 34-B - 52168	N.A.
		16/10/2007	A 35-A - 51912	positivo
A 35	N S S S	31/10/2007	A 35-B - 52090	N.A.
		03/08/2007	A 37-A - 51156	positivo
A 37	L A	28/08/2007	A 37-B - 51424	N.A.
A 38	M M O	16/07/2007	A 38 - 50985	Positivo
A 40	E M	27/04/2007	A 40 - 50167	Positivo
		30/03/2007	A 41-A - 49847	positivo
A 41	A O	20/04/2007	A 41-B - 50072	N.A.
		11/04/2007	A 42-A - 49936	positivo
A 42	E S	12/04/2007	A 42-B - 49955	N.A.
		28/03/2007	A 43-A - 49809	positivo
A 43	L C M	28/03/2007	A 43-B - 49915	N.A.
		28/03/2007	A 44-A - 49817	positivo
A 44	J R L	04/04/2007	A 44-B - 49905	N.A.
		27/03/2007	A 45-A - 49786	positivo
A 45	Y Y	02/04/2007	A 45-B - 49856	N.A.
		13/03/2007	A 46-A - 49612	positivo
A 46	J A S	14/03/2007	A 46-B - 49625	N.A.
A 48	H A	12/02/2007	A 48 - 49318	Positivo
		30/01/2007	A 49-A - 49167	positivo
A 49	Z D A G	09/03/2007	A 49-B - 49260	N.A.
		04/10/2007	A 51-A - 44649	positivo
A 51	I B M	05/10/2007	A 51-B - 44670	N.A.
A 52	R A F	28/09/2005	A 52 - 44600	Positivo
A 53	M B N	06/09/2005	A 53-A - 44362	N.A.

		16/09/2005	A 53-B - 44483	positivo
		22/09/2005	A 53-C - 44538	positivo
A 54	J R A	03/08/2005	A 54 - 44022	Positivo
A 56	B G S	04/07/2005	A 56 - 43752	Positivo
A 57	B L	09/06/2005	A 57 - 43501	Positivo
		08/06/2005	A 58-A - 43495	positivo
A 58	A J S	17/06/2005	A 58-B - 43610	N.A.
		03/06/2005	A 59-A - 43449	positivo
A 59	E P H	13/01/2006	A 59-B - 45441	N.A.
		20/05/2005	A 60-A - 43339	positivo
A 60	J L	01/06/2005	A 60-B - 43409	N.A.
A 62	D P S	04/05/2005	A 62 - 43155	Positivo
A 63	S F O	29/04/2005	A 63 - 43115	Positivo
		14/12/2005	A 64-A - 45249	positivo
A 64	B A R	11/01/2006	A 64-B - 45414	N.A.
A 65	C R A F	12/12/2005	A 65 - 45207	Positivo
A 66	P M	05/01/1995	A 66 - 10332	Positivo
		07/02/2008	A 67-A - 52968	positivo
A 67	E M C	20/02/2008	A 67-B - 53108	N.A.
		26/03/2008	A 68-A - 53502	positivo
A 68	R S	26/03/2008	A 68-B - 53519	N.A.

TOTAL = 91 amostras

N. A. = Não avaliado.

Assim, as amostras de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal distal precoce, como demonstrado na tabela 03, foram coletadas no período de 1993 a 2008, totalizando, para os 31 pacientes, 70 amostras. Entretanto, houve pacientes com apenas uma amostra, a do tecido obtido na biópsia endoscópica.

Já as amostras de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal distal avançado, como demonstrado na tabela 04, foram coletadas durante os anos de 2005 a 2008, ressaltando que a amostra de um dos pacientes foi coletada em 1995. No total, portanto, de 58 pacientes, foram usadas 91 amostras, sendo que alguns pacientes possuem apenas uma amostra, a do tecido obtido na biópsia endoscópica.

Com relação à escolha das amostras provenientes da peça cirúrgica, os blocos de parafina nos quais estas foram armazenadas foram determinados pelo patologista responsável, a fim de que, após serem cortadas devidamente em tiras e colocadas em *ependorfs* para posterior extração do DNA tecidual, contivessem, além do tecido tumoral propriamente dito, tecido sadio proveniente das margens

do tumor, que seria o local de maior probabilidade para se encontrar o *H. pylori*. Cabe ressaltar que, das peças cirúrgicas, foram obtidos, em média, 35 blocos de parafina contendo diferentes cortes do tecido, sendo que todos estes foram separados para que se pudesse escolher o mais indicado para a pesquisa em questão.

Finalmente, foram considerados apenas pacientes com adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal tubular distal, precoce ou avançado, que tiveram a determinação desse câncer como primário. Todos os pacientes que tiveram esse tipo de tumor de forma secundária, isto é, como metástase de tumores de outros órgãos, foram excluídos da pesquisa. Para isso, também foram avaliadas, nas pastas dos pacientes, as informações obtidas com a análise imuno-histoquímica.

Na leitura dos prontuários dos pacientes também foi verificado que, em ambos os grupos, eles não eram tabagistas nem faziam uso habitual de bebidas alcoólicas, dois fatores externos importantes que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer gástrico; também não faziam uso rotineiro de AINEs.

Em resumo, foram então estudados dois grupos de pacientes: o primeiro com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal distal precoce e o segundo com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal distal avançado.

Enfim, foram utilizadas, como grupo controle para todas as reações, oito amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia endoscópica positivas para *H. pylori* pela histologia e pelo teste da urease, sendo quatro delas provenientes de pacientes com diagnóstico de gastrite crônica e quatro de pacientes com úlcera duodenal. Tais amostras foram coletadas nos anos de 2003 e 2004, e tiveram seu DNA extraído e armazenado no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infeciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia da Unicamp (**tabela 05**). As amostras de úlcera duodenal, em especial, foram utilizadas como controle positivo para as reações do gene *dupA*. Como controle negativo, foi usada a água destilada.

Tabela 05 – Amostras provenientes dos pacientes do grupo controle.

Amostra	Paciente	HC	Idade (anos)	Data da coleta	Diagnóstico
C 01	T A L	647132-4	72	12/09/2003	gastrite crônica
C 02	T P D P	735213-1	17	12/09/2003	gastrite crônica
C 03	A A D	127321-6	41	12/09/2003	gastrite crônica
C 04	J O S	387071-9	73	23/03/2004	gastrite crônica
C 05	R L O	860712-5	38	30/03/2004	úlcera duodenal
C 06	F F C	855431-0	58	30/03/2004	úlcera duodenal
C 07	D L B G	841727-1	57	06/04/2004	úlcera duodenal
C 08	F G	764002-7	61	06/04/2004	úlcera duodenal

MÉTODOS

4- Métodos

No presente trabalho, os métodos utilizados para a caracterização das cepas do *H. pylori* encontradas nas amostras de DNA extraídas de tecido gástrico foram:

- 1 extração do DNA das amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia endoscópica, fixadas em formalina e conservadas em parafina;
- 2 quantificação do DNA extraído das amostras de tecido com o uso de nanodrop;
- 3 reação de betaglobina para confirmação da extração do DNA e da sua qualidade;
- 4 amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para a região do gene urease C (*glmM*) do *H. pylori*, com a finalidade de identificar o DNA bacteriano;
- 5 amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para a região do gene *vacA* do *H. pylori* e suas subregiões *s* e *m*;
- 6 amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase tipo nested (nested PCR) para a região do gene *cagA* do *Helicobacter pylori*;
- 7 amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para a região do gene *cagT*;
- 8 amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para a região do gene *dupA* do *H. pylori*, com o uso de dois pares de *primers* diferentes – *jhp 0917* e *jhp 0918*.

Todas as PCRs foram realizadas em duplicata a fim de se garantir, mais uma vez, a qualidade do experimento.

Além disso, controles positivos, provenientes das amostras já descritas na casuística do presente trabalho, foram usados em todas as reações como parâmetro para os resultados encontrados, assim como controles negativos.

4.1- Extração de DNA de tecidos fixados e emblocados em parafina

A técnica tomada como base para a extração do DNA de tecidos fixados e emblocados em parafina foi descrita por Goelz e col. (1985).

Foram utilizados cortes de fitas de parafina de dez mm contendo o tecido conservado e mantido em tubos *eppendorf* de 1,5 mL.

A cada uma das amostras foi adicionado um mL de xilol, agitando-a e deixando-a em repouso por cinco minutos, colocando-a, em seguida, para centrifugar a 14000 rpm por cinco minutos e descartando, posteriormente, o sobrenadante. Esse passo foi repetido de três a cinco vezes, conforme a amostra, para completa retirada da parafina, mantendo-se apenas o tecido.

Às amostras foram, então, adicionados 500 μ L de etanol a 100%, sendo estas centrifugadas a 14000 rpm por cinco minutos. Na seqüência, o etanol absoluto foi descartado com o auxílio de uma pipeta e adicionaram-se às amostras 500 μ L de etanol a 95%, centrifugando-as a 14000 rpm novamente por cinco minutos. O sobrenadante foi, mais uma vez, descartado e, a cada amostra, adicionaram-se 500 μ L de etanol a 70%, centrifugando-a a 14000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi, finalmente, descartado, e as amostras deixadas para secagem em temperatura ambiente.

Em seqüência à secagem, à cada amostra foram adicionados 11 μ L de uma solução de proteinase K (10 mg/mL) e 419 μ L de uma solução tampão de Tris HCl 1 M pH 7,5 e SDS 1%, permanecendo, essa mistura, *overnight* em banho de 55° C.

Após esse período, as amostras foram retiradas do banho e a elas foram acrescentados 430 μ L de fenol, homogeneizando-as e centrifugando-as por 30 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante, fração contendo o DNA, foi transferido, assim, para um novo tubo, adicionando-se a ele 430 μ L de uma solução contendo fenol e clorofórmio na proporção 1:1, centrifugando a mistura obtida por cinco minutos a 14000 rpm. O sobrenadante resultante foi retirado e transferido para outro tubo, adicionando-se a ele 430 μ L de uma solução contendo fenol e clorofórmio na proporção 24:1, homogeneizando-se a mistura e novamente

centrifugando-a por 30 minutos a 14000 rpm. O novo sobrenadante obtido foi, enfim, transferido para outro tubo e, a ele, foram adicionados 75 µL de acetato de amônia 3M e 750 µL de etanol a 100%, invertendo-se os tubos contendo a amostras e incubando-as, logo em seguida, a - 70° C pelo tempo de 40 minutos.

Findo esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos, descartando-se o sobrenadante. O precipitado restante foi lavado cuidadosamente com etanol a 70% mantido a - 20° C, sendo as amostras centrifugadas por cinco minutos a 14000 rpm. O etanol foi descartado após centrifugação e o material – DNA extraído – contido no tubo foi mantido para secagem em temperatura ambiente. Após secagem completa, ao material foi adicionada uma solução tampão de Tris HCl EDTA pH 8,0.

Finalmente, a amostra obtida (DNA) foi armazenada em tubos *eppendorf* de 1,5 mL à temperatura de - 20° C para posterior análise.

4.2- Controle de qualidade do experimento

4.2.1- Quantificação do DNA extraído

Todas as amostras de DNA foram submetidas à quantificação em nanodrop (NANODROP ND-1000 Full – Spectrum UV/Vis Spectrophotometer – Wilmington, DE 19810 – USA), para confirmação da extração.

Foi utilizado um volume de 1.3 µL da solução de DNA extraído para cada amostra, os quais foram submetidos à leitura em absorbância (λ) de 230 nm.

4.2.2- PCR para detecção do gene da betaglobina humano

A reação em cadeia da polimerase para detecção do gene da betaglobina humano seguiu o método utilizado por Saiki e col. (1988), com algumas alterações.

Essa amplificação teve como objetivo, junto com a quantificação, analisar a presença e a qualidade do DNA extraído das amostras de tecido gástrico, garantindo-se um controle interno da qualidade do experimento, o que foi indispensável para a segurança dos resultados obtidos.

Os primers utilizados foram os denominados PCO3 e PCO4, obtendo-se um produto final de amplificação de 110 pares de bases (tabela 06).

Tabela 06 – Primers para detecção do gene da betaglobina humana

Primer	Seqüência (5' → 3')	Sentido
PCO3	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC	<i>forward</i>
PCO4	CAA CTT CAT CCA CGT TTC ACC	<i>reverse</i>

Foram realizados 40 ciclos de amplificação para cada amostra em termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA), obedecendo-se às seguintes temperaturas e seus respectivos tempos: desnaturação inicial a 94º C por cinco minutos, desnaturação a 94º C por trinta segundos, anelamento a 55º C por um minuto, extensão a 72º C por dois minutos e extensão final a 72º C por oito minutos.

Os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta, sendo fotografados em programa computacional próprio.

4.3- PCR para a região do gene urease C (*glmM*) do *H. pylori*

A amplificação gênica da região do gene urease C, também denominado *glmM*, seguiu o método descrito por Lage e col. (1995), com algumas modificações.

O volume total para cada reação de amplificação foi de 25 µL, contendo 1.0 µL do DNA extraído, 2,5 µL de buffer, 0,8 µL de MgCl₂, 4,0 µL de dntp, 0,4 µL de cada primer (ureC1 e ureC2) e 0,25 µL de Taq polimerase, completando-se o volume com água destilada. O produto final da reação foi de 294 pares de bases, sendo os primers descritos na tabela 07.

Foram realizados 35 ciclos em termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer / Cetus, Norwalk, Conn., EUA), submetendo-se as amostras a 94º C por cinco minutos, 94º C por dois minutos, 57º C por um minuto e trinta segundos (anelamento), 72º C por um minuto e trinta segundos e 72º C por sete minutos.

Tabela 07 – primers para PCR da região do gene urease C do *H. pylori*

Primer	Seqüência (5´ → 3´)	Sentido
urease C 1	AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T	<i>forward</i>
urease C 2	AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC	<i>reverse</i>

Os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta, sendo fotografados em programa computacional próprio.

4.4- PCR para a região do gene vacA do *H. pylori*.

A região do gene vacA foi analisada em suas duas subunidades: s (s1 e s2) e m (m1 e m2).

Tanto os primers para a região s quanto para a região m1 foram utilizados por Atherton et al., respectivamente, em 1997 e 1999 (tabela 08 e tabela 09). Já os primers para a região m2 foram usados por Thomazini et al. (2006) (tabela 10).

A PCR para a região s foi padronizada utilizando-se 1.0 µL do DNA extraído das amostras de tecido, 2.0 µL de *buffer*, 0.8 µL de MgCl₂, 4.0 µL de dntp, 0.5 µL

de cada primer e 0.25 µL de Taq polimerase, completando-se o volume com água destilada até 20.0 µL para cada amostra.

Foram realizados 30 ciclos de amplificação em termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA), obedecendo-se às seguintes temperaturas e seus respectivos tempos: 94º C por dois minutos, 94º C por um minuto, 56º C por um minuto e trinta segundos, 72º C por um minuto e 72º C por sete minutos.

Tabela 08 – primers para a PCR do gene *vacA* região *s* do *H. pylori*

Primer	Seqüência (5´ → 3´)	Sentido
<i>vacA s F</i>	ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC	<i>Forward</i>
<i>vacA s R</i>	CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	<i>Reverse</i>

Para a região *s* do gene *vacA* os produtos amplificados foram de 259 pares de bases (genótipo *s1*) ou de 286 pares de bases (genótipo *s2*).

No caso da região *m* do gene *vacA* foram usados dois pares de primers, um para a região *m1* e outro para *m2*. Para ambas as reações, que foram realizadas simultaneamente para todas as amostras, foi utilizado 1.0 µL do DNA extraído, 2.0 µL de buffer, 0.8 µL de MgCl₂, 4.0 µL de dntp, 0.5 µL de cada primer (*vacA m1 F* e *R*, e *vacA m2 F* e *R*) e 0.25 µL de Taq polimerase, completando-se o volume com água destilada, totalizando 20.0 µL para cada reação.

Foram realizados 30 ciclos de amplificação em termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA), obedecendo-se às seguintes temperaturas e seus respectivos tempos: 94º C por dois minutos, 94º C por um minuto, 56º C por um minuto e trinta segundos, 72º C por um minuto e 72º C por sete minutos.

Tabela 09 – primers da PCR para o gene *vacA* região *m1* do *H. pylori*

Primer	Seqüência (5´ → 3´)	Sentido
<i>vacA m1 F</i>	GGT CAA AAT GCG GTC ATG G	<i>forward</i>
<i>vacA m1 R</i>	CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC	<i>reverse</i>

Tabela 10 – primers da PCR para o gene *vacA* região m2 do *H. pylori*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Sentido
<i>vacA</i> m2 F	ATG CTT TAA TAT CGT TGA GA	<i>forward</i>
<i>vacA</i> m2 R	GAA CAT GTT TTA GTG AAA GC	<i>reverse</i>

Para a região m1 do gene *vacA* os produtos amplificados foram de 290 pares de bases e para a região m2 os produtos foram de 198 pares de bases.

Os produtos amplificados foram, então, visualizados sob luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio.

Após essas duas amplificações, os produtos foram classificados em s1m1, s1m2, s2m1 ou s2m2.

4.5- Nested PCR para a região do gene *cagA* do *H. pylori*

A presença do gene *cagA* foi analisada com o uso de dois pares de primers (tabela 11), descritos por Husson e col. (1995), Yamaoka e col. (1999) e Faundez e col. (2002), com algumas alterações.

Tanto a primeira PCR quanto a nested PCR foram padronizadas utilizando-se, respectivamente, 1.0 µL do DNA extraído das amostras de tecido ou 1.0 µL do produto da primeira reação, com 2.5 µL de *buffer*, 0.8 µL de MgCl₂, 4.0 µL de dntp, 0.5 µL de cada primer (*cagA* 1 F e *cagA* 1 R para a primeira PCR e *cagA* 2 F e *cagA* 2 R, para a nested PCR) e 0.25 µL de Taq polimerase, completando-se o volume de 25 µL com água destilada.

Foram realizados 35 ciclos de amplificação para cada amostra em termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA), obedecendo-se às seguintes temperaturas e seus respectivos tempos: 94º C por cinco minutos, 94º C por um minuto, 55º C por um minuto e trinta segundos, 72º C por um minuto e 72º C por sete minutos.

Tabela 11 – primers da primeira PCR (cagA 1 F e 1 R) e da nested PCR (cagA 2 F e 2 R) para o gene cagA do *H. pylori*

Primer	Seqüência (5´ → 3`)	Sentido
cagA 1 F	GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG AGG GA	<i>forward</i>
cagA 1 R	CCA TGA ATT TTT GAT CCG TTC GG	<i>reverse</i>
cagA 2 F	GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G	<i>forward</i>
cagA 2 R	CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A	<i>reverse</i>

A primeira reação resultou em um fragmento de 393 pares de bases e a nested PCR em um fragmento de 349 pares de bases.

Os produtos amplificados foram observados sob luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em programa computacional próprio.

4.6- PCR para a região do gene cagT do *H. pylori*

A amplificação gênica (PCR) para a região do gene cagT seguiu o método usado por Mattar e col. (2007), com algumas modificações.

O volume total para cada reação de amplificação foi de 20.0 µL, contendo 1.0 µL do DNA extraído, 2.0 µL de *buffer*, 0.8 µL de MgCl₂, 4.0 µL de dntp, 0.4 µL de cada primer (tabela 12) e 0.25 µL de Taq polimerase, completando-se o volume com água destilada.

Foram realizados 35 ciclos em termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer / Cetus, Norwalk, Conn., EUA), submetendo as amostras a 94º C por cinco minutos, 94º C por um minuto, 55º C por um minuto e trinta segundos, 72º C por um minuto e 72º C por sete minutos.

Tabela 12 – primers da PCR para região do gene *cagT* do *H. pylori*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Sentido
cagT 1	CCA TGT TTA TAC GCC TGT GT	<i>forward</i>
cagT 2	CAT CAC CAC ACC CTT TTG AT	<i>reverse</i>

Os produtos obtidos, de 301 pares de bases, foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta, sendo fotografados em programa computacional próprio.

4.7- PCR para a região do gene *dupA* do *H. pylori*

A amplificação gênica (PCR) da região do gene *dupA* seguiu o método descrito por Lu e col. (2005), com algumas modificações, sendo analisada através de dois pares de primers, com reações independentes (tabelas 13 e 14).

O volume total para cada reação de amplificação será de 20.0 µL, contendo 1.0 µL do DNA extraído, 2.0 µL de buffer, 0.8 µL de MgCl₂, 4.0 µL de dntp, 0,5 µL de cada primer (jhp 0917 F e jhp 0917 R para uma reação, e jhp 0918 F e jhp 0918 R, para uma segunda reação) e 0.25 µL de Taq polimerase, completando-se o volume com água destilada.

O produto final da PCR usando o par de primers denominado jhp0917 foi de 307 pares de bases e o produto do par de primers denominado jhp0918 foi de 276 pares de bases.

Foram realizados, tanto para uma reação quanto para a outra, 35 ciclos em termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer / Cetus, Norwalk, Conn., EUA), submetendo as amostras a 94º C por dois minutos, 94º C por trinta segundos, 57º C por trinta segundos, 72º C por um minuto e 72º C por sete minutos.

Tabela 13 – primers da PCR para a região do gene dupA jhp 0917 do *H. pylori*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Sentido
dupA jhp0917 F	TGG TTT CTA CTG ACA GAG CGC	<i>forward</i>
dupA jhp0917 R	AAC ACG CTG ACA GGA CAA TCT CCC	<i>reverse</i>

Tabela 14 – primers da PCR para a região do gene dupA jhp 0918 do *H. pylori*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Sentido
dupA jhp0918 F	CCT ATA TCG CTA ACG CGC GCT C	<i>forward</i>
dupA jhp0918 R	AAG CTG AAG CGT TTG TAA CG	<i>reverse</i>

Os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta, sendo fotografados em programa computacional próprio.

4.8- Análise estatística

Após todas as reações de amplificação, os resultados obtidos para cada região genômica foram relacionados aos dois estágios da doença estudada na presente pesquisa, e foram analisados pelo teste do qui-quadrado, a fim de serem observadas as possíveis diferenças entre as cepas de *H. pylori* responsáveis pelo desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico distal intestinal precoce e do adenocarcinoma gástrico distal intestinal avançado. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$). A análise dos resultados como um todo, considerando-se a doença adenocarcinoma gástrico, também foi realizada.

Ainda, para descrever o perfil das amostras segundo as variáveis em estudo, foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas (combinação

dos genótipos), com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%). Com o objetivo de comparar a combinação dos genótipos entre os dois grupos de pacientes, com adenocarcinoma precoce e avançado, foi utilizado o teste exato de Fischer. O nível de significância para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0.05$). especificamente, o gene dupA foi considerado presente quando suas duas regiões genômicas (jhp0917 e jhp0918) demonstraram resultados positivos concomitantemente.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para a estatística da idade dos pacientes e o teste do qui-quadrado para estatística relativa ao gênero dos pacientes.

Todas as análises estatísticas descritas acima foram feitas pelo Serviço de Estatística da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, com a utilização do programa computacional *SAS for Windows*[®] (*Statistical Analysis System*), versão 9.1.3 (*SAS Institute Inc*, 2002-2003, Cary, NC, USA).

4.9- Normas de biossegurança

Durante todos os procedimentos e técnicas utilizados para o desenvolvimento da presente pesquisa foram tomados diversos cuidados a fim de evitar qualquer tipo de contaminação das amostras e mesmo dos pesquisadores e alunos do laboratório. Abaixo estão relacionados os principais cuidados tomados:

- a-) manipulação em locais diferentes para extração do DNA, preparo das amostras para amplificação e amplificação propriamente dita;
- b-) reagentes e materiais preparados e utilizados em ambientes diferentes daquele destinado à amplificação da sequência alvo;
- c-) uso de bancadas com fluxo laminar para manipulação das amostras a serem amplificadas;
- d-) uso de vórtex e centrífuga antes da abertura de quaisquer tubos *ependorf* contendo amostras a fim de se evitar a dispersão de aerossóis;

- e-) materiais plásticos novos e estéreis utilizados para o preparo das amostras para amplificação, incluindo as ponteiros e os tubos *eppendorf*;
- f-) trocas constantes de luva durante todo o processo de manipulação;
- g-) uso de hipoclorito a 10% e etanol a 70% nos períodos anteriores e posteriores ao uso das bancadas;
- h-) uso de ponteiros com filtro;
- i-) uso de jogos de pipetas diferentes para cada local;
- j-) uso de luvas, máscara, avental, óculos e capacete de proteção;
- k-) prática laboratorial meticulosa.

RESULTADOS

5- RESULTADOS

5.1- Extração e quantificação do DNA

O DNA foi extraído das 70 amostras de adenocarcinoma precoce e das 91 amostras de adenocarcinoma avançado obtidas para o presente trabalho, totalizando, assim, 161 amostras (apêndices I e II, respectivamente).

Para garantia da qualidade da técnica, a extração do DNA foi sempre realizada com 24 amostras a cada vez.

A quantificação do DNA foi realizada em todas as amostras de câncer precoce e avançado, utilizando-se o volume de 1.3 µL para cada uma delas, fazendo-se a leitura em nanodrop com absorbância de 230 nm. Nenhuma das amostras demonstrou, pelos gráficos gerados após leitura, estar degradada e nem ter quantidades de fenol ou de RNA que pudessem influenciar ou provocar qualquer tipo de interação com o DNA extraído.

5.2- PCR para a região do gene da betaglobina humana

Após extração e quantificação do DNA, em todas as 161 amostras foi realizada a reação em cadeia da polimerase para a região da betaglobina humana, outra forma de se garantir a qualidade do experimento e do material final. Todas as amostras (100.0%) apresentaram resultados positivos para essa reação, com a amplificação de fragmentos de 110 pares de bases.

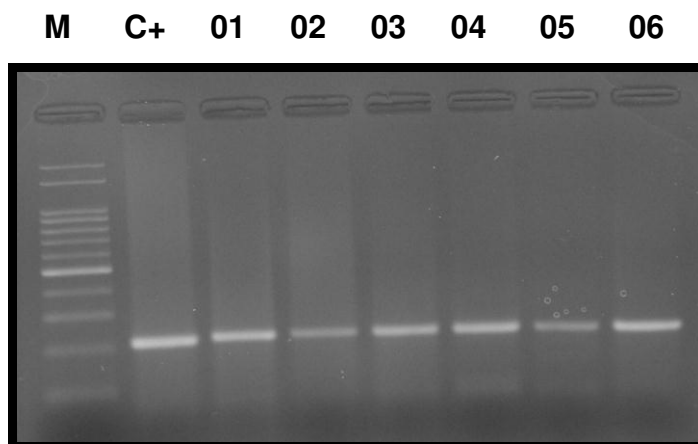


Figura 01 – Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. PCR para gene da betaglobina humana (110 pb). M – marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb. C+ controle positivo. 01 a 06 – amostras positivas.

5.3- PCR para a região do gene urease C (*glmM*) do *H. pylori*

Com a realização da PCR para o gene urease C, com amplificação de fragmentos de 294 pares de bases, foram identificadas 89 amostras positivas do total de 161 para o *H. pylori*, sendo 31 de adenocarcinoma precoce e 58 de adenocarcinoma avançado.

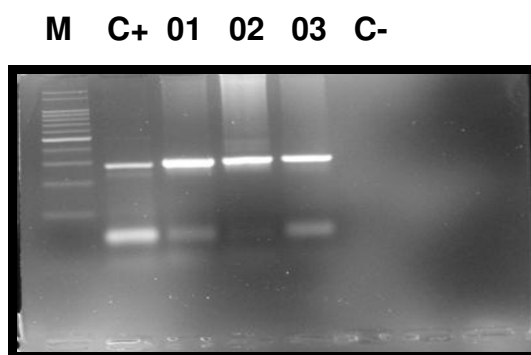


Figura 02 – Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. PCR para gene urease C do *H. pylori*. (294 pb). M – marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb. C+ controle positivo. 01 a 03 – amostras positivas. C- controle negativo.

Dessa forma, para cada paciente, foi utilizada uma amostra de DNA, a qual está especificada nas tabelas 15 e 16, para os casos precoces e avançados, respectivamente, juntamente com a quantificação.

Tabela 15 - Amostras positivas para *H. pylori* nos pacientes com adenocarcinoma gástrico precoce.

Amostra	Nome do Paciente	Amostra e Histologia	Quantificação (ng/uL)
P 01	R P M	P 01-C – G: 33340	337.6
P 03	F C	P 03-A – G: 43153	1005.5
P 04	J S O	P 04 – G: 31292	271.4
P 05	P C	P 05-B – G: 32431	854.4
P 06	A M A	P 06 – G: 7403	211.5
P 07	R F	P 07-A – G: 21263	232.4
P 08	M A A	P 08 – G: 34957	531.9
P 09	A S A	P 09-A - G: 9518	167.6
P 10	E Lopes O	P 10 – G: 23013	2117.6
P 12	J A	P 12-A - G: 36789	557.7
P 13	A Vaz A	P 13 – G: 25125	1483.7
P 14	L G F L N	P 14-A - G: 3182	978.2
P 15	E G P	P 15 – G: 40122	2314.2
P 16	E C Z	P 16-B – G: 27925	344.7
P 17	S K	P 17-A – G: 31464	4045.3
P 18	S M P	P 18-A – G: 29995	480.7
P 19	Z A A	P 19-C – G: 41499	358.5
P 20	C S	P 20 – G: 44249	381.5
P 21	G D	P 21-A – G: 44021	385.2
P 22	M O O G	P 22-A – G: 44158	628.8
P 24	J L D	P 24-B – G: 43520	1543.8
P 25	F D S	P 25-A – G: 42850	1305.0
P 28	S R	P 28-A – G: 47234	214.6
P 29	A S	P 29-A – G: 50577	222.5
P 30	G T	P 30-A – G: 49924	332.6
P 31	C G G	P 31-A – G: 14227	208.5
P 32	N P S S	P 32-B – G: 28953	77.7
P 33	P P S	P 33-B – G: 55176	197.9
P 34	L B	P 34-A – G: 36181	559.4
P 35	I C S	P 35-A – G: 48005	318.3
P 36	V J S	P 36 – G: 54294	683.9

Tabela 16 - Amostras positivas para *H. pylori* nos pacientes com adenocarcinoma gástrico avançado.

Amostra	Nome do Paciente	Amostra e Histologia	Quantificação (ng/uL)
A 01	W C	A 01 - G: 48873	946.7
A 03	A A B	A 03 - G: 48563	226.9
A 04	R A M	A 04-A – G: 45354	185.8
A 05	J F	A 05 - G: 48436	211.2
A 06	G B	A 06-A – G: 47307	307.4
A 07	R C T E	A 07-A – G: 47159	50.0
A 08	V P	A 08 - G: 47176	146.2
A 09	C Z	A 09-A – G: 46874	117.0
A 10	O Z	A 10 - G: 46944	45.9
A 11	J D M	A 11-A – G: 46833	51.5
A 12	S L L	A 12-A – G: 46702	147.8
A 13	M C F	A 13 - G: 46748	300.3
A 14	J F N	A 14 - G: 46522	1959.0
A 15	J G S	A 15 - G: 46416	392.4
A 16	M S C	A 16-A – G: 46249	12.4
A 17	A A G	A 17-B – G: 46524	1448.9
A 18	S F R	A 18 - G: 45827	340.2
A 19	T J B	A 19 - G: 45682	280.7
A 20	A C B	A 20-A – G: 45497	52.3
A 24	M C	A 24-A – G: 45435	360.3
A 25	A E P	A 25 - G: 45360	72.5
A 26	J M C	A 26 - G: 45467	214.7
A 27	O M	A 27-A – G: 45361	1235.2
A 28	N L P M	A 28 - G: 45404	85.5
A 29	M P	A 29 - G: 45391	338.5
A 30	V A S	A 30-A – G: 52304	343.1
A 31	A B G	A 31 - G: 52033	423.1
A 32	R B O	A 32-A – G: 52034	455.2
A 33	M M D	A 33 - G: 52015	362.4
A 34	J C P	A 34-A – G: 52001	578.9
A 35	N S S S	A 35-A – G: 51912	586.5
A 37	L A	A 37-A – G: 51156	305.7
A 38	M M O	A 38 - G: 50985	198.4
A 40	E M	A 40 - G: 50167	459.2
A 41	A O	A 41-A – G: 49847	395.0
A 42	E S	A 42-A – G: 49936	1236.4
A 43	L C M	A 43-A – G: 49809	544.6
A 44	J R L	A 44-A – G: 49817	819.7
A 45	Y Y	A 45-A – G: 49786	723.9
A 46	J A S	A 46-A – G: 49612	781.9
A 48	H A	A 48 - G: 49318	1241.6
A 49	Z D A G	A 49-A – G: 49167	761.0
A 51	I B M	A 51-A – G: 44649	1092.7
A 52	R A F	A 52 - G: 44600	675.6
A 53	M B N	A 53-B – G: 44483	145.7

A 54	J R A	A 54 - G: 44022	86.6
A 56	B G S	A 56 - G: 43752	366.3
A 57	B L	A 57 - G: 43501	382.0
A 58	A J S	A 58-A - G: 43495	365.8
A 59	E P H	A 59-A - G: 43449	326.3
A 60	J L	A 60-A - G: 43339	278.5
A 62	D P S	A 62 - G: 43155	282.8
A 63	S F O	A 63 - G: 43115	1414.1
A 64	B A R	A 64-A - G: 45249	475.0
A 65	C R A F	A 65 - G: 45207	243.7
A 66	P M	A 66 - G: 10332	484.8
A 67	E M C	A 67-A - G: 52968	1622.4
A 68	R S	A 68-A - G: 53502	880.6

A mediana dos valores de quantificação do DNA dos pacientes com adenocarcinoma gástrico precoce foi de 385.200 ng/μL, com valor mínimo de 77.7 ng/μL e máximo de 4045.3 ng/μL e a mediana da quantificação das amostras obtidas dos pacientes com adenocarcinoma gástrico avançado foi de 361.350 ng/μL, com valor mínimo de 12.4 ng/μL e máximo de 1959.0 ng/μL, conforme tabela 17.

Tabela 17 - Estatística da quantificação das amostras de DNA positivas para *H. pylori*.

Quantificação (ng/μL)	N	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
Precoce	31	385.200	77.7	4045.3
Avançado	58	361.350	12.4	1959.0
Total	89	365.800	12.4	4045.3

5.4- Estatística descritiva da idade dos pacientes

A mediana da idade do total de pacientes foi de 63.00 anos e, isoladamente, dos pacientes com adenocarcinoma gástrico precoce foi de 61.00 anos, com idade mínima de 24 e máxima de 81 anos, e dos pacientes com adenocarcinoma gástrico avançado, de 64.50 anos, com idade mínima de 37 e máxima de 88 anos (tabela 18). Para avaliação das possíveis diferenças entre os dois grupos de pacientes foi usado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Tabela 18 – Dados referentes à estatística descritiva da idade dos pacientes.

Idade	N	mediana	valores	valores
Classificação			mínimos	máximos
Precoce	31	61.00	24	81
Avançado	58	64.50	37	88
Total	89	63.00	24	88

5.5- Estatística descritiva do gênero dos pacientes

Quanto ao gênero, dos pacientes com adenocarcinoma precoce, 64.5% (20 casos) eram homens e 35.5% (11 casos), mulheres. Já para os pacientes com adenocarcinoma avançado, 69.0% (40 casos) eram homens e 31.0% (18 casos), mulheres. No grupo como um todo, esses valores são representados por 67.4% para o gênero masculino e 32.6% para o feminino (tabela 19). Não houve, portanto, um valor significativo que pudesse diferenciar os pacientes quanto ao gênero, demonstrando-se, tanto em um grupo quanto no outro, a prevalência da doença no gênero masculino.

Tabela 19 – Estatística descritiva do gênero dos pacientes.

		Classificação		total
		precoce	avançado	
Gênero	feminino	11	18	29
		35.5%	31.0%	32.6%
	masculino	20	40	60
		64.5%	69.0%	67.4%
	Total	31	58	89
		100.0%	100.0%	100.0%

p = 0.670

5.6 – PCR para a região do gene *vacA* do *H. pylori*

O gene *vacA* foi analisado por PCR para suas duas sub-regiões, *vacA* s, e *vacA* m, sendo que, com os resultados obtidos, cada paciente foi qualificado com cepas do *H. pylori vacA* s/m.

5.6.1- Gene *vacA* região s

As amostras, após PCR para a região do gene *vacA* s, foram classificadas em dois subtipos, s1 e s2, com amplificação de fragmentos de 258 e 286 pares de bases, respectivamente.

Assim, das 31 amostras de adenocarcinoma gástrico precoce, 71.0% (22 casos) foram s1 e 29.0% (9 casos) s2. Para as 58 amostras de adenocarcinoma avançado, 70.7% (41 casos) foram s1 e 29.3% (17 casos) s2, obtendo-se um valor de p igual a 0.978, não estatisticamente significativo (tabela 20). O *odds ratio* calculado foi de 1.014, com intervalo de confiança de 95% (0.388-2.646).

Tabela 20 - Resultados estatísticos obtidos para o gene *vacA* região s.

		Classificação		total
		precoce	avançado	
<i>vacA</i> s (s1/s2)	s1	22 71.0%	41 70.7%	63 70.8%
	s2	9 29.0%	17 29.3%	26 29.2%
Total		31 100.0%	58 100.0%	89 100.0%

p = 0.978

OR = 1.014 / intervalo de confiança 95% (0.388-2.646)

De forma geral, 63 (70.8%) amostras apresentaram o subtipo s1 do gene *vacA* s e 26 (29.2%) amostras, o subtipo s2 do gene *vacA*, totalizando as 89 amostras utilizadas no estudo.

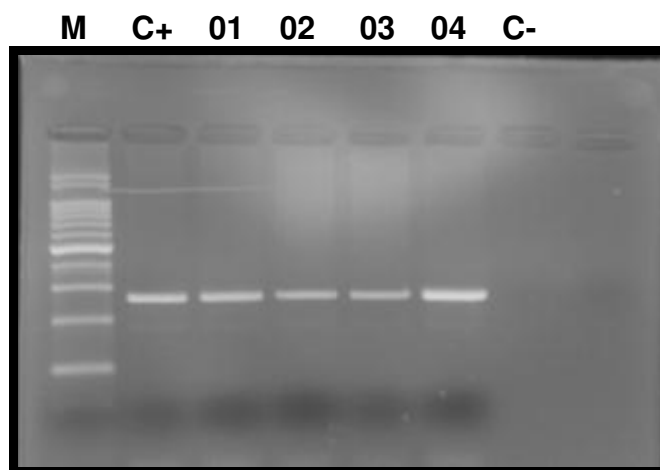


Figura 03 – Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. PCR para gene *vacA* região s do *H. pylori* - *vacA* s1 (259 pb). M – marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb. C+ controle positivo. 01 a 04 – amostras positivas. C- controle negativo.

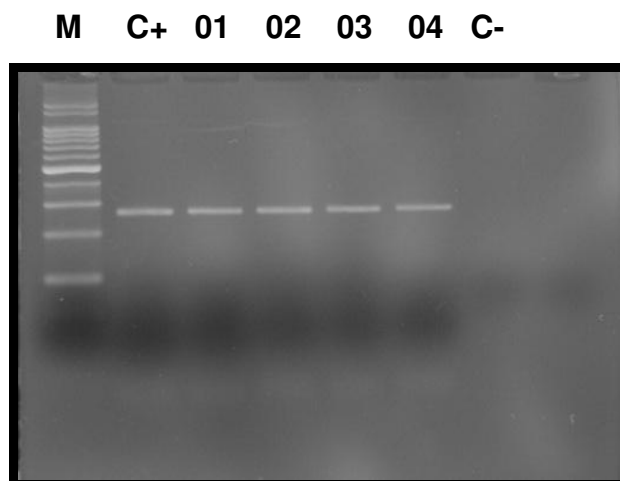


Figura 04 – Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. PCR para gene *vacA* região s do *H. pylori* - *vacA* s2 (286 pb). M – marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb. C+ controle positivo. 01 a 04 – amostras positivas. C- controle negativo.

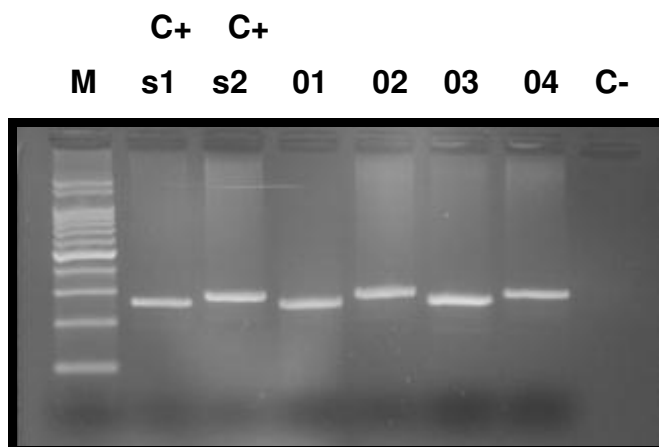


Figura 05 – Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. PCR para gene *vacA* região s do *H. pylori* - *vacA* s1 (259 pb); *vacA* s2 (286 pb). M – marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb. C+ s1 controle positivo para *vacA* s1; C+ s2 controle positivo para *vacA* s2. 01, 03 – amostras positivas para *vacA* s1; 02, 04 – amostras positivas para *vacA* s2. C- controle negativo.

5.6.2- Gene *vacA* região m

As amostras, após PCR para a região do gene *vacA* m, foram classificadas em dois subtipos, m1 e m2, com amplificação de fragmentos de 290 e 189 pares de bases, respectivamente.

Para ambos os grupos estudados, não houve resultados positivos para a região m2 do gene *vacA* m. Todas as amostras foram do tipo m1, amplificando 290 pares de bases (tabela 21).

Tabela 21 - Resultados estatísticos obtidos para o gene *vacA* região m.

		Classificação		total
		precoce	avanzado	
<i>vacA</i> m (m1/m2)	m1	31 100.0%	58 100.0%	89 100.0%
	m2	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%
Total		31 100.0%	58 100.0%	89 100.0%

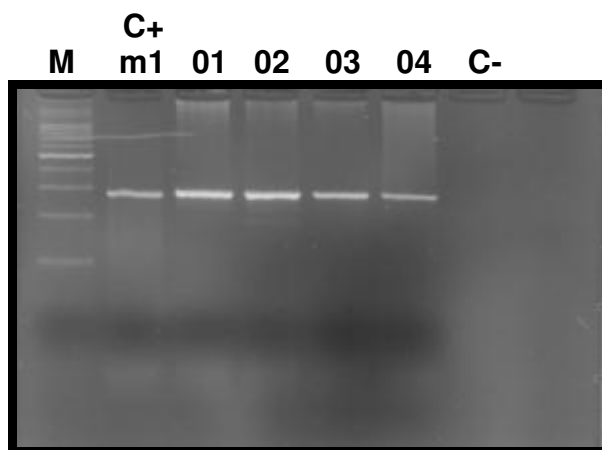


Figura 06 – Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. PCR para gene *vacA* região m do *H. pylori* - *vacA* m1 (290 pb). M – marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb. C+ controle positivo. 01 a 04 – amostras positivas para *vacA* m1. C- controle negativo.

5.6.3- Gene *vacA* s/m

Após análise dos subtipos s e m, foi realizada a tipagem de todas as amostras, classificando-as em s/m da seguinte forma: s1m1, s1m2, s2m1 e s2m2.

No presente estudo, como não houve resultados para o subtipo m2, as amostras foram classificadas em s1m1 e s2m1.

Para as amostras de adenocarcinoma precoce, 71.0% (22 casos) foram s1m1 e 29.0% (9 casos) foram s2m1. Já para as amostras de adenocarcinoma avançado, 70.7% (41 casos) foram s1m1 e 29.3% (17 casos) foram s2m1, obtendo-se um p valor igual a 0.978, estatisticamente não significante (tabela 22). O *odds ratio* calculado foi de 1.014, com intervalo de confiança de 95% (0.388-2.646).

Tabela 22 - Resultados estatísticos obtidos para o gene *vacA* classificação s/m.

		Classificação		total
		precoce	avançado	
<i>vacA</i> s/m	s1m1	22 71.0%	41 70.7%	63 70.8%
	s2m1	9 29.0%	17 29.3%	26 29.2%
Total		31 100.0%	58 100.0%	89 100.0%

p = 0.978

OR = 1.014 / intervalo de confiança 95% (0.388-2.646)

5.7 – Nested PCR para a região do gene *cagA* do *H. pylori*

Para o gene *cagA*, das amostras provenientes de pacientes com adenocarcinoma precoce, 61.3% (19 casos) apresentaram resultados positivos e 38.7% (12 casos), negativos. Para as amostras de adenocarcinoma avançado, 82.8% (48 casos) foram positivas e 17.2% (10 casos) negativas (tabela 23). O p

valor foi igual a 0.025, o que se reflete em um resultado estatisticamente significativo. O *odds ratio* foi igual a 3.023, com intervalo de confiança de 95% (1.123-8.185).

Tabela 23 - Resultados estatísticos obtidos para o gene *cagA*.

		Classificação		total
		precoce	avançado	
cagA	positivo	19	48	67
		61.3%	82.8%	75.3%
	negativo	12	10	22
		38.7%	17.2%	24.7%
Total		31	58	89
		100.0%	100.0%	100.0%

p = 0.025

OR = 3.023 / intervalo de confiança 95% (1.123-8.185)

No grupo como um todo, houve 67 casos (75.3%) positivos para o gene *cagA* e 22 casos (24.7%) com resultados negativos para esse gene.

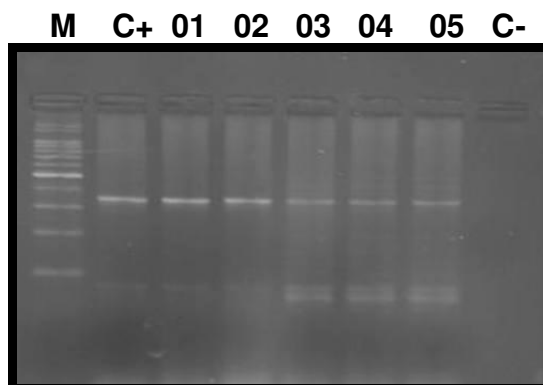


Figura 07 – Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Nested PCR para gene *cagA* do *H. pylori* (349 pb). M – marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb. C+ controle positivo. 01 a 05 – amostras positivas. C- controle negativo.

5.8 – PCR para a região do gene *cagT* do *H. pylori*

Para o gene *cagT*, das amostras de adenocarcinoma precoce, 54.8% (17 casos) foram positivas e 45.2% (14 casos) negativas. Nas amostras de pacientes com adenocarcinoma avançado, 65.5% (38 casos) demonstraram resultados positivos, enquanto 34.5% (20 casos), negativos (tabela 24), obtendo-se um *p* valor igual a 0.323, estatisticamente não significativo. O *odds ratio* foi igual a 1.565, com intervalo de confiança de 95% (0.642-3.813).

Tabela 24 - Resultados estatísticos obtidos para o gene *cagT*.

		Classificação		total
		precoce	avançado	
cagT	positivo	17	38	55
		54.8%	65.5%	61.8%
	negativo	14	20	34
		45.2%	34.5%	38.2%
Total		31	58	89
		100.0%	100.0%	100.0%

p = 0.323

OR = 1.565 / intervalo de confiança 95% (0.642-3.813)

No grupo como um todo, 55 amostras (61.8%) tiveram resultado positivo e 34 (38.2%), negativo.

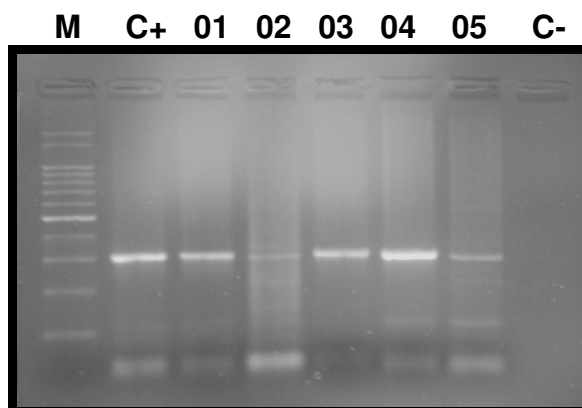


Figura 08 – Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. PCR para gene *cagT* do *H. pylori* (301 pb). M – marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb. C+ controle positivo. 01 a 05 – amostras positivas. C- controle negativo.

5.9 – PCR para a região do gene *dupA* do *H. pylori*

5.9.1 – Gene *dupA* jhp 0917

Com relação à região denominada *dupA* jhp 0917, das amostras de adenocarcinoma precoce, 35.5% (11 casos) tiveram resultados positivos e 64.5% (20 casos) resultados negativos. Para as amostras de adenocarcinoma avançado, 39.7% (23 casos) mostraram resultados positivos e 60.3% (35 casos), resultados negativos, obtendo-se um p valor igual a 0.700, estatisticamente não significativo. O *odds ratio* calculado foi igual a 1.195, com intervalo de confiança de 95% (0.484-2.952).

No total de amostras, 38.2% (34 amostras) tiveram resultados positivos e 61.8% (55 casos), negativos (tabela 25).

Tabela 25 - Resultados estatísticos obtidos para o gene dupA jhp 0917.

		Classificação		total
		precoce	avanzado	
dupA jhp0917	positivo	11	23	34
		35.5%	39.7%	38.2%
	negativo	20	35	55
		64.5%	60.3%	61.8%
Total		31	58	89
		100.0%	100.0%	100.0%

p = 0.700

OR = 1.195 / intervalo de confiança 95% (0.484-2.952)

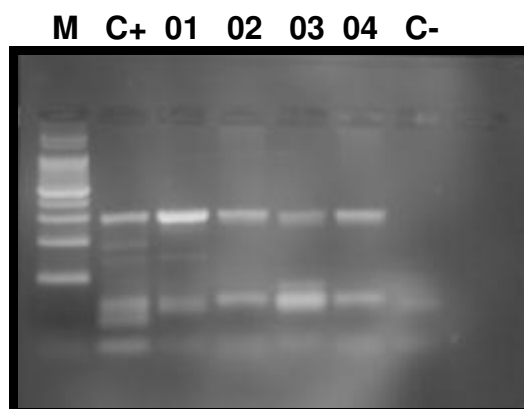


Figura 09 – Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. PCR para gene dupA do *H. pylori* região jhp 0917 (307 pb). M – marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb. C+ controle positivo. 01 a 04 – amostras positivas. C- controle negativo.

5.9.2 – Gene dupA jhp 0918

Por sua vez, com relação à região denominada dupA jhp 0918, das amostras de adenocarcinoma precoce, 51.6% (16 casos) tiveram resultados positivos e 48.4% (15 casos), resultados negativos. Para as amostras de adenocarcinoma avançado, 55.2% (32 casos) tiveram resultados positivos e

44.8% (26 casos), resultados negativos. O p valor foi de 0.748, estatisticamente não significativo. O *odds ratio* foi de 1.154, com intervalo de confiança de 95% (0.481-2.765).

No total de amostras, 53.9% (48 amostras) tiveram resultados positivos e 46.1% (41 casos), negativos (tabela 26).

Tabela 26 - Resultados estatísticos obtidos para o gene *dupA* jhp 0918.

		Classificação		total
		precoce	avançado	
dupA jhp0918	positivo	16	32	48
		51.6%	55.2%	53.9%
	negativo	15	26	41
		48.4%	44.8%	46.1%
Total		31	58	89
		100.0%	100.0%	100.0%

p = 0.748

OR = 1.154 / intervalo de confiança 95% (0.481-2.765)

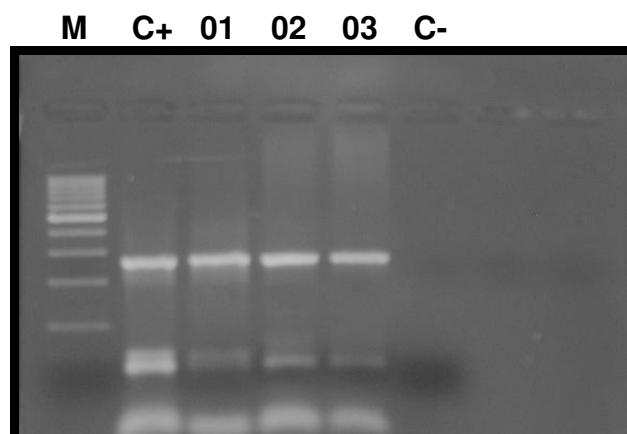


Figura 10 – Análise direta dos fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. PCR para gene *dupA* do *H. pylori* região jhp 0918 (276 pb). M – marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb. C+ controle positivo. 01 a 03 – amostras positivas. C- controle negativo.

Tabela 27 – Resultados gerais obtidos após reações para o gene urease C, vacA regiões s e m, cagA, cagT e dupA jhp0917 e jhp0918 do *H. pylori*.

Classificação	Adenocarcinoma gástrico Precoce	Adenocarcinoma gástrico avançado	Total	p valor
urease C	31 (100.0%)	58 (100.0%)	89 (100.0%)	p = 0.978
s1	22 (71.0%)	41 (70.7%)	63 (70.8%)	
s2	9 (29.0%)	17 (29.3%)	26 (29.2%)	
m1	31 (100.0%)	58 (100.0%)	89 (100.0%)	
m2	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
s1/m1	22 (71.0%)	41 (70.7%)	63 (70.8%)	p = 0.978
S2/m1	9 (29.0%)	17 (29.3%)	26 (29.2%)	
cagA positivo	19 (61.3%)	48 (82.8%)	67 (75.3%)	p = 0.025
cagA negativo	12 (38.7%)	10 (17.2%)	22 (24.7%)	
cagT positivo	17 (54.8%)	38 (65.5%)	55 (61.8%)	p = 0.323
cagT negativo	14 (45.2%)	20 (34.5%)	34 (38.2%)	
dupA jhp0917 positivo	11 (35.5%)	23 (39.7%)	34 (38.2%)	p = 0.700
dupA jhp0917 negativo	20 (64.5%)	35 (60.3%)	55 (61.8%)	
dupA jhp0918 positivo	16 (51.6%)	32 (55.2%)	48 (53.9%)	
dupA jhp0918 negativo	15 (48.4%)	26 (44.8%)	41 (46.1%)	p = 0.748
Total	31 (100.0%)	58 (100.0%)	89 (100.0%)	

Como observado nas tabelas acima, para cada gene, foi realizada também a análise do risco, levando-se em consideração um intervalo de confiança de 95%. Os resultados contidos na tabela 28 mostram que apenas para o gene cagA houve um valor importante, indicando que pacientes infectados por cepas cagA positivas apresentam um risco três (3.032) vezes maior de desenvolver o adenocarcinoma gástrico avançado (intervalo de confiança de 95%, 1.123-8.185), do que pacientes infectados com cepas cagA negativas.

Tabela 28 – Análise do risco (OR) com intervalo de confiança de 95% para as regiões genômicas do *H. pylori* estudadas.

Classificação	OR	Intervalo de confiança 95%	
		mínimo	máximo
s1/s2	1.014	0.388	2.646
m1/m2	-	-	-
s/m	1.014	0.388	2.646
cagA	3.032	1.123	8.185
cagT	1.565	0.642	3.813
dupA jhp0917	1.195	0.484	2.952
dupA jhp0918	1.154	0.481	2.765

Na sequência das análises acima relatadas, com a finalidade de descrever o perfil das amostras de acordo com as variáveis em estudo, foi feita a tabela de frequência das variáveis categóricas, com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%) (Tabela 29) e a tabela de combinação dos genótipos, também com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%) (Tabela 30). O gene dupA, reiterando-se, foi considerado positivo quando as duas regiões contínuas que o compõem demonstraram resultados positivos, ou seja, dupA presente quando jhp0917 e jhp0918 foram positivos simultaneamente. O genótipo mais freqüente da combinação entre os genes estudados foi s1m1 cagA positivo cagT positivo dupA (jhp0917/0918) negativo, apresentado por 29.21% (26 casos) do total de amostras (precoce e avançado, conjuntamente). Em segundo lugar, cepas s1m1 cagA positivo cagT negativo dupA (jhp0917/0918) negativo e s1m1 cagA positivo cagT positivo dupA (jhp0917/0918) positivo foram encontradas, de forma igual, em 10.11% (9 casos) das amostras (precoce e avançado).

Tabela 29 – Análise descritiva das variáveis categóricas para o total de amostras.

Região genômica		Frequência (n)	Porcentagem (%)
Gene vacA s/m	s1m1	63	70.79
	s2m1	26	29.21
Gene cagA	positivo	67	75.28
	negativo	22	24.72
Gene cagT	positivo	55	61.80
	negativo	34	38.20
Gene dupA jhp0917	positivo	34	38.20
	negativo	55	61.80
Gene dupA jhp0918	positivo	48	53.93
	negativo	41	46.07
Gene dupA jhp0917/0918	positivo	28	31.46
	negativo	61	68.54

Tabela 30 – Análise descritiva das variáveis categóricas para as combinações de resultados do total de amostras.

Combinação:	Frequência	Porcentagem
vacA s/m, cagA, cagT, dupA (jhp0917/0918)	(n)	(%)
s1m1 neg neg neg	8	8.99
s1m1 neg neg pos	1	1.12
s2m1 neg neg neg	3	3.37
s2m1 neg neg pos	2	2.25
s1m1 neg pos neg	3	3.37
s1m1 neg pos pos	1	1.12
s2m1 neg pos neg	2	2.25
s2m1 neg pos pos	2	2.25
s1m1 pos neg neg	9	10.11
s1m1 pos neg pos	6	6.74
s2m1 pos neg neg	4	4.49
s2m1 pos neg pos	1	1.12
s1m1 pos pos neg	26	29.21
s1m1 pos pos pos	9	10.11
s2m1 pos pos neg	6	6.74
s2m1 pos pos pos	6	6.74

Finalmente, para comparação dos genótipos acima relacionados entre os dois grupos de pacientes, com adenocarcinoma precoce e avançado, obteve-se um p valor igual a 0.116, estatisticamente não significativo (Tabela 31), demonstrando-se que, apesar dos dados isoladamente avaliados terem resultado no gene cagA como um importante fator ($p = 0.025$) para o desenvolvimento do câncer avançado, as cepas encontradas tanto em um estágio quanto no outro da doença possuem um mesmo perfil, sendo, de forma global, no grupo de 89 pacientes estudados, s1m1 cagA positivo cagT positivo dupA (jhp0917/0918) negativo.

Tabela 31 – Análise comparativa da combinação dos genótipos entre os dois grupos de pacientes estudados.

Combinação:	Precoce	Avançado	Total
VacA s/m, cagA, cagT, dupA (jhp0917/0918)			
s1m1 neg neg neg	4	4	8
	12.90	6.90	
s1m1 neg neg pos	1	0	1
	3.23	0.00	
s2m1 neg neg neg	1	2	3
	3.23	3.45	
s2m1 neg neg pos	0	2	2
	0.00	3.45	
s1m1 neg pos neg	2	1	3
	6.45	1.72	
s1m1 neg pos pos	1	0	1
	3.23	0.00	
s2m1 neg pos neg	2	0	2
	6.45	0.00	
s2m1 neg pos pos	1	1	2
	3.23	1.72	
s1m1 pos neg neg	3	6	9
	9.68	10.34	
s1m1 pos neg pos	2	4	6
	6.45	6.90	
s2m1 pos neg neg	2	2	4
	6.45	3.45	
s2m1 pos neg pos	1	0	1
	3.23	0.00	
s1m1 pos pos neg	5	21	26
	16.13	36.21	
s1m1 pos pos pos	4	5	9
	12.90	8.62	
s2m1 pos pos neg	2	4	6
	6.45	6.90	
s2m1 pos pos pos	0	6	6
	0.00	10.34	
Total	31	58	89

p = 0.116

DISCUSSÃO

6- DISCUSSÃO

Apesar do decréscimo nas taxas de incidência e mortalidade observado nos últimos cinquenta anos, o câncer gástrico permanece como um grave problema de saúde mundial, ocupando o quarto lugar com relação aos tipos de câncer e o segundo em causas de morte relacionadas à doença.

O entendimento acerca da carcinogênese gástrica avançou consideravelmente nas últimas décadas, especialmente no que diz respeito ao papel do *H. pylori* no desenvolvimento das lesões pré-cancerosas e na neoplasia propriamente dita. Obviamente, o desenvolvimento do câncer gástrico é um processo multifatorial, e dependente das características genéticas do hospedeiro e do meio ambiente, que, associadas às particularidades das cepas bacterianas, influenciam na gravidade da resposta inflamatória.

Apesar disso, permanece sem explicação o motivo pelo qual a maioria dos indivíduos infectados pelo *H. pylori* permanece assintomática e sem manifestar qualquer doença do trato digestivo, enquanto, em alguns pacientes, a infecção pela bactéria leva à inflamação tecidual, com o possível e conseqüente desenvolvimento da gastrite crônica, das úlceras pépticas e, com maior gravidade, do câncer gástrico.

Dentre as neoplasias malignas do estômago, o adenocarcinoma gástrico é o mais comum, sendo classificado em dois tipos, o intestinal, decorrente de uma cascata de alterações teciduais provocada principalmente pela infecção pelo *H. pylori*, e o difuso, mais relacionado a causas genéticas e independente dessa cascata de eventos.

O *H. pylori* é uma bactéria que apresenta uma alta diversidade genética e diversos genes codificadores da expressão de vários fatores de virulência, sugerindo-se que esses possam ser responsáveis pela diferente gravidade da infecção provocada nos indivíduos. Cepas consideradas mais virulentas, como as cagA positivas e vacA s1m1, tendem a ser encontradas em pacientes com enfermidades gastroduodenais mais graves, como o adenocarcinoma gástrico.

Dessa forma, devido à importância dessa bactéria no desenvolvimento do câncer gástrico, o presente estudo analisou e identificou possíveis e essenciais diferenças entre as cepas do *H. pylori* encontradas em amostras de tecido gástrico fixadas e emblocadas em parafina, provenientes de pacientes com adenocarcinoma gástrico distal do tipo intestinal precoce e avançado, fazendo a comparação dos dados obtidos através do uso do teste estatístico do qui-quadrado entre esses dois grupos. Para tanto, técnicas de biologia molecular foram usadas a fim de identificar o DNA bacteriano nessas amostras e amplificar produtos específicos do seu genoma, que atuam como fatores de virulência, como os genes *vacA*, *cagA*, *cagT* e *dupA*.

Em primeiro lugar, com relação à técnica utilizada no presente trabalho, deve-se considerar a possibilidade, com sucesso, da utilização de amostras de tecido fixado e conservado em parafina, as quais apresentam DNA de qualidade adequada para amplificação pela PCR, após sua extração. Assim, conforme relatos da literatura e comprovação em nosso estudo, a capacidade de amplificar regiões específicas de DNA por essa técnica trouxe e continua a trazer inúmeras vantagens, especialmente para a pesquisa, demonstrando-se, como ponto primordial, o potencial para analisar material de arquivo, o que permite acesso a vastas quantidades de tecido, provenientes de diversos órgãos do corpo humano (Saiki et al., 1988; Rogers et al., 1990).

Dessa forma, a vantagem da sensibilidade da técnica combinada com o uso desse tipo de material, permite a realização de estudos retrospectivos em grande escala, sendo que a eficácia da PCR depende, de maneira importante, do método de fixação e da posterior técnica utilizada para a extração do DNA (Vince et al., 1998).

O segundo aspecto importante que possibilita o uso dessas amostras, consideradas por alguns autores como improváveis para a realização da PCR, por conterem DNA fragmentado e de pouca quantidade (Morera-Brenes et al., 1994), é a escolha dos primers e das regiões genômicas de amplificação. Como o DNA de amostras fixadas pode realmente apresentar-se fragmentado e em menor quantidade do que o existente nos tecidos obtidos a fresco e apenas congelados,

devem ser escolhidos primers que amplifiquem regiões pequenas (Scholte et al., 1997), de 100 a 400 pares de bases.

Dessa maneira, para o desenvolvimento do presente estudo, foram selecionados primers que possibilitaram a amplificação de produtos pequenos das regiões genômicas dos genes urease C, *vacA*, *cagA*, *cagT* e *dupA* do *H. pylori*, sem que houvesse uma variação muito grande entre o tamanho de um produto e o de outro. Para que esse padrão pudesse ser mantido, para o gene *cagA* foi realizada a nested PCR, que utiliza como amostra o produto obtido em uma primeira reação de amplificação.

No que diz respeito aos dois períodos de coleta das amostras já mencionados na casuística, um problema que não se discute no presente trabalho, mas que não deve deixar de ser mencionado, é o fato de o número de diagnósticos de adenocarcinoma gástrico avançado ainda permanecer maior que o de precoce, o que pode ser verificado na pesquisa em pauta, já que o total de amostras provenientes de pacientes com câncer precoce foi obtido durante os anos de 1993 a 2008 e os de câncer avançado, de 2005 a 2008.

Isso se deve, talvez, à falta de acesso adequado da população economicamente menos favorecida aos serviços básicos de saúde, ou à própria falta de informação da população em geral, ao procurar por assistência médica somente quando nota a presença ou mesmo a exacerbação de determinados sintomas.

Assim, após a obtenção do total de 161 amostras de tecido gástrico, foi feita a extração do DNA e sua posterior quantificação, assim como a PCR para avaliar a presença do gene da betaglobina humana, duas técnicas que permitiram a garantia da qualidade de todos os passos posteriores da pesquisa, que foram realizados com o DNA extraído.

Após essas reações, todas as amostras foram submetidas à PCR para a região do gene urease C do *H. pylori*, sendo que, do total de 161 amostras de tecido, o DNA bacteriano foi verificado em 89, sendo 31 de pacientes com adenocarcinoma gástrico distal do tipo intestinal precoce e 58 de pacientes com a

doença no estágio avançado. Reitera-se, nesse ponto, que foi usada uma amostra de tecido de cada um dos 89 pacientes.

O gene urease C foi escolhido para a identificação primária do DNA do micro-organismo nas amostras de tecido por ser específico do *H. pylori*. Essa especificidade foi, inclusive, comprovada por alguns estudos que utilizaram cepas do *H. pylori* e de outras bactérias produtoras de urease, sendo que, para essas últimas, não foi possível a obtenção de produtos de amplificação por PCR para o gene em questão (Moore et al., 1993; Owen et al., 1998). Além disso, esse gene é presente em todas as cepas da bactéria, sendo que a atividade da urease é considerada um fator determinante para a sua patogenicidade, além de estar contido em uma região genômica altamente conservada (Owen et al., 1998, Lage et al., 1995; Lu et al., 1999; Marais et al., 1999).

Na sequência, as 89 amostras positivas para o DNA bacteriano, cada uma proveniente de um paciente, foram submetidas à PCR para a região do gene *vacA*, analisando suas duas sub-regiões, s e m.

Para a região s, das 31 amostras de adenocarcinoma precoce, 71.0% (22 casos) foram positivas para s1 e 29.0% (9 casos) para s2, e, das amostras de adenocarcinoma avançado, 70.7% (41 casos) foram positivas para s1 e 29.3% (17 casos) para s2 ($p = 0.978$), não havendo resultados estatisticamente significantes entre os dois grupos de pacientes. No total de amostras, considerando-se a doença câncer gástrico, 70.8% (60 casos) foram s1 e 29.2% (26 casos) foram s2.

Com relação à região m, não foram encontrados resultados positivos para m2, sendo, portanto, todas as amostras de câncer precoce e avançado, positivas para m1.

Em sequência à obtenção desses resultados, as amostras foram classificadas nos genótipos s1m1 e s2m1, sendo que, para os casos precoces, 71.0% das amostras foram s1m1 e 29.0% s2m1 e, para os casos avançados, 70.7% foram s1m1 e 29.3% s2m1 ($p = 0.978$), refletindo um resultado não estatisticamente significativo. No total de 89 amostras, 70.8% (63 casos) foram s1m1 e 29.2% (26 casos) s2m1.

O gene *vacA*, assim como o urease C, é presente em todas as cepas do *H. pylori* e o mosaicismismo existente entre as suas subregiões s e m é importante na determinação da produção da citotoxina VacA, sendo, portanto, associado à patogenicidade bacteriana (Atherton et al., 1995). A literatura relata que cepas *vacA* s1 produzem maiores quantidades da toxina VacA, enquanto as *vacA* s2 apresentam menor toxicidade (Peek e Blaser, 2002; Björkholm et al., 2003). Além disso, cepas com mosaicismismo s1m1 parecem ser mais tóxicas do que as s1m2, sendo associadas à gastrite crônica em atividade, à gastrite atrófica e à metaplasia intestinal, lesões precursoras do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (Nogueira et al., 2001).

Ainda, uma importante relação entre as cepas *vacA* s1m1 e a presença do gene *cagA* também é relevantemente mencionada (Covacci et al., 1993; Tummuru et al 1993). Embora localizados em regiões genômicas diferentes, o gene *cagA* é fortemente associado com a atividade citotóxica da VacA (Höcker e Hohenberger, 2003) e cepas que expressam a combinação desses alelos e da CagA provocam danos epiteliais mais graves (Guiara et al., 1995; Atherton et al., 1997). No presente trabalho, nas amostras de adenocarcinoma avançado, a presença do gene *cagA* foi encontrada em 82.8% das cepas, juntamente com 70.7% de cepas s1m1, corroborando os resultados de outros estudos e demonstrando que essa combinação pode resultar em cepas de maior virulência (Miehlke et al., 2000; Leanza et al., 2004).

Os resultados obtidos no presente trabalho são similares aos de um estudo realizado na China (Qiao et al., 2003) com pacientes diagnosticados com câncer gástrico, provavelmente em estágio avançado, no qual 95% das amostras estudadas demonstraram resultados positivos para o gene *cagA* e tiveram a expressão do alelo s1 em maior porcentagem do que a do s2. Entretanto, diferentemente dos resultados aqui relatados, nos quais não foi encontrada nenhuma cepa m2 positiva, foram verificadas porcentagens similares dos alelos m1 e m2 nesses pacientes chineses.

Outro estudo, realizado no Brasil, mas utilizando amostras de pacientes com gastrite, verificou que, na análise de cepas do *H. pylori* provenientes de

pacientes com gastrite crônica, foi encontrada uma porcentagem maior do genótipo m2 do que m1 (Kague et al., 2010). Consequentemente, partindo dessas informações, assim como das encontradas no presente estudo, considera-se, de forma importante, que as cepas m2 sejam menos virulentas do que as m1, devendo ser analisadas não de forma isolada, mas sim conjunta com os resultados s1, estando presentes em doenças gástricas menos graves, apesar do genótipo m2 ter sido encontrado, como já descrito, em condições similares ao m1 nas amostras de câncer estudadas por Qiao et al. (2003). Ainda, no citado estudo brasileiro, diferentemente dos resultados do presente trabalho, não foram encontradas cepas s2m1 (Kague et al., 2010).

Nessa mesma linha de pesquisa, estudo realizado em Portugal (Figueiredo et al., 2002), demonstrou uma importante associação entre a presença de cepas bacterianas *cagA* positivas *vacA* s1m1 e o câncer gástrico, sem estágio definido, sendo que esses genótipos foram encontrados com uma frequência bem menor em pacientes com gastrite crônica, assim como determinado em outras pesquisas prévias (Atherton et al., 1997; Figueiredo et al., 2001; Nogueira et al., 2001)

Especificamente com relação às amostras provenientes dos pacientes com adenocarcinoma precoce, apesar de elas apresentarem o mesmo perfil genético das cepas de *H. pylori* encontradas nos casos avançados, uma proporção, que pode ser considerada significativa, apresentou o mosaico s2m1 (29.0%), sugerindo-se que esse seja um fator que contribua para a manutenção da doença no estágio precoce, já que cepas com alelo s2 demonstram ter menos atividade citotóxica do que as s1, mesmo quando associadas ao genótipo m1.

Por sua vez, a análise do gene *cagA* de forma isolada, demonstrou um resultado estatisticamente significativo entre os dois grupos de amostras estudados. As cepas determinadas nos casos de adenocarcinoma precoce foram *cagA* positivas em 61.3% dos casos (19 amostras) e negativas em 38.7% deles (12 amostras). Já as cepas dos casos de adenocarcinoma avançado foram *cagA* positivas em 82.8% (48 amostras) e negativas em apenas 17.2% (10 amostras) dos casos, originando um valor de p igual a 0.025. No grupo câncer gástrico como todo, 67 das amostras (75.3%) foram positivas para o *cagA* enquanto apenas 22

(24.7%) foram negativas. Ainda, os resultados obtidos demonstraram que pacientes infectados com cepas *cagA* positivas apresentam risco três vezes maior de desenvolvimento do câncer avançado em comparação com os pacientes com câncer precoce (*odds ratio* = 3.023, intervalo de confiança de 95%, 1.123-8.185).

Há indícios de que o adenocarcinoma precoce possa permanecer nesse estágio durante anos, mesmo sem tratamento, sugerindo-se que passe por um ciclo de ulcerações, cicatrização e reulcerações. Assim, a influência da bactéria nesse estágio da doença pode ou não ser importante. Do mesmo modo que as lesões pré-cancerosas, como a gastrite atrófica e a metaplasia intestinal, são interrompidas após o tratamento de erradicação da bactéria, isso também pode acontecer com as lesões cancerosas precoces. Hipotetiza-se, dessa forma, que a erradicação do *H. pylori* possa mantê-las sem progressão, em um estado latente, que permaneça durante anos, sem alterações que conduzam a lesões em estágio avançado. Esses dados são de extrema importância na avaliação futura de quais seriam os pacientes mais indicados para a terapia de erradicação do micro-organismo.

Ainda, sugere-se que possa ocorrer algum mecanismo de mutação gênica relativo ao gene *cagA* nas cepas provenientes das amostras de adenocarcinoma precoce que possa levar à manutenção desse estágio da doença, sem progressão para o câncer avançado. Também pode ser que os polimorfismos existentes no próprio gene e que têm por base os domínios EPIYA, possam influenciar na virulência bacteriana e, portanto, no desenvolvimento da doença. Nesse ponto, apesar de não ter sido objeto da pesquisa em questão, devem ser relacionados os estudos de Nguyen et al (2009) e de Truong et al. (2009), que identificaram genótipos diferentes do gene *cagA* em pacientes com câncer gástrico de diferentes países.

Além desses aspectos, embora haja muita pesquisa e, consequentemente, conhecimento acerca de como o gene *cagA* contribui para o desenvolvimento da infecção e para a patogenicidade bacteriana, ainda permanece necessária a investigação de como o *H. pylori* pode beneficiar a si próprio com a expressão da CagA e de sua entrada nas células hospedeiras. Uma possível resposta a essa

questão foi sugerida por Tan et al. (2009), que demonstraram que a bactéria pode crescer diretamente na superfície apical de células epiteliais polarizadas cultivadas sob condições adequadas. Foi proposto, então, que o *H. pylori* pode potencialmente usar os efeitos que a CagA provoca na polaridade celular do hospedeiro, criando um nicho replicativo na superfície das células hospedeiras.

O gene *cagA*, mais comum nos pacientes com adenocarcinoma avançado, no presente estudo, demonstrou ser um fator de virulência importante que pode atuar como marcador genético específico das cepas mais virulentas da bactéria, as quais devem ser erradicadas, especialmente quando os pacientes avaliados apresentam diagnóstico de lesões pré-cancerosas.

Portanto, os resultados obtidos na presente tese são semelhantes aos de outros trabalhos que consideram que pacientes infectados com cepas *cagA* positivas apresentam riscos três vezes maiores de desenvolvimento do câncer gástrico (Parsonnet et al., 1997; Huang et al., 2003) do que aqueles infectados com cepas *cagA* negativas (Husson et al., 1995; Dunn et al., 1997; Yamaoka et al., 1999; Podzorski et al., 2003). Além desses, estudos mais antigos, conduzidos em países ocidentais (Crabtree et al., 1994; Blaser et al., 1995) e asiáticos (Mizushima et al., 2001), também reportaram que a grande maioria dos pacientes com câncer gástrico, porém, sem definição de estágio precoce ou avançado, são infectados por cepas *cagA* positivas.

Da mesma forma que o *cagA*, o gene *cagT* pertence à *cagPAI* e parece desempenhar papel importante no funcionamento desse sistema de secreção tipo IV, sendo responsável pela ligação celular a receptores, pela indução da produção de IL-8 e por atuar na injeção da proteína CagA na célula hospedeira (Rohde et al., 2003).

No presente estudo, nas amostras de adenocarcinoma precoce, 54.8% (17 casos) das cepas foram *cagT* positivas e 45.2% (14 casos) negativas. Já nas amostras de adenocarcinoma avançado, 65.5% (38 casos) das cepas foram positivas e 34.5% (20 casos) negativas ($p = 0.323$), resultados não estatisticamente significativos. Considerando-se os pacientes como um todo, 55 casos (61.8%) foram positivos para o gene *cagT* e 34 (38.2%) negativos.

Uma primeira pesquisa realizada no Brasil relatou uma possível associação do gene *cagT* com o desenvolvimento da úlcera péptica, sugerindo ser um gene de alta virulência e um componente essencial do sistema de secreção do tipo IV presente na *cagPAI* do *H. pylori* (Mattar et al., 2007). Nesse trabalho, 98% das cepas provenientes de pacientes com úlcera péptica foram positivos para esse gene, mostrando que pode haver uma associação importante entre o genótipo e a doença.

Corroborando esses resultados, um segundo estudo brasileiro detectou a presença do gene *cagT* em 65.8% das cepas estudadas. Embora não tenha sido possível observar uma associação entre o genótipo e a gastrite crônica e a úlcera duodenal, uma significativa relação foi encontrada com a úlcera gástrica (Pacheco et al., 2008).

Outros trabalhos também afirmam essa relação. Na Inglaterra, foi observada uma possível associação entre a presença do *cagT* e a úlcera péptica (Kaiser et al., 2005) e, no Japão, estudo relatou que cepas *cagT* negativas são mais comumente encontradas em indivíduos com gastrite crônica do que em pacientes com úlcera péptica ou câncer gástrico (Ikenoue et al., 2001).

O gene *cagT*, assim como o *cagA*, é significativamente associado com outros fatores de virulência, como o próprio *cagA* e o *vacA* s1, o *vacA* m1 e o *vacA* mosaico s1m1 (Proença-Módena et al., 2007), ocorrendo em menores porcentagens concomitantemente com cepas *vacA* s2, *vacA* m2 e *vacA* s2m2 (Pacheco et al., 2008).

No presente trabalho, as cepas *cagT* positivas, tanto de um grupo de amostras quanto do outro, foram prevalentes na maior parte dos casos, e, em conjunto com o gene *cagA* e o genótipo *vacA* s1m1, pode ser sugerido como um importante fator de virulência para o desenvolvimento do câncer gástrico.

Finalmente, na presente pesquisa, com relação à região jhp0917 do gene *dupA*, das amostras de adenocarcinoma precoce, 35.5% dos casos foram positivos e 64.5% negativos. Para os casos avançados, foram encontrados resultados positivos em 39.7% das amostras e negativos em 60.3% das amostras, o que se reflete em um resultado não estatisticamente significativo ($p = 0.700$). No

grupo câncer gástrico como todo, 38.2% das amostras foram positivas para essa região genômica.

Já para a região jhp0918, das amostras de adenocarcinoma precoce, 51.6% dos casos foram positivos enquanto 48.4% foram negativos. Das amostras de adenocarcinoma avançado, 55.2% das amostras foram positivas e 44.8% negativas, demonstrando-se, entre os casos precoces e avançados, um valor de p não estatisticamente significativo ($p = 0.748$). No grupo câncer gástrico como todo, 53.9% das amostras foram positivas para essa região.

Esses resultados foram diferentes dos obtidos por Lu et al. (2005), que encontraram a prevalência do gene dupA em apenas 9% das amostras de câncer gástrico, enquanto houve positividade de 42% para os casos de úlcera duodenal e de 21% dos casos de gastrite avaliados. Nesse estudo, as prevalências dos dois genes foram próximas, com apenas dez (2%) de 500 cepas sendo jhp0917 negativo e jhp0918 positivo. Para todos os outros casos, as cepas foram ou jhp0917/jhp0918 positivas ou jhp0917/jhp0918 negativas. Diferentemente desses resultados, na presente tese, considerando-se o grupo câncer gástrico como todo, com 89 amostras, foram encontradas 34 cepas (38.2%) positivas para a região jhp0917 e 48 cepas (53.9%) positivas para a região jhp0918.

Sendo essas duas regiões genômicas consideradas contínuas, há trabalhos (Pachecco et al., 2008) que avaliam o gene dupA como presente apenas se as duas regiões, jhp0917 e jhp0918, forem positivas. Dessa forma, considerando-se esse fator, nossa pesquisa revelou resultados positivos para o gene dupA nos pacientes com adenocarcinoma gástrico em apenas 38.2% das amostras e, para os demais estudos estatísticos, as cepas foram consideradas positivas para esse gene quando dupA jhp0917 e jhp0918 foram positivas simultaneamente.

No citado trabalho (Pachecco et al., 2008), foram encontrados resultados positivos para a região jhp0917 em 92.4% das amostras estudadas e para a região jhp0918 em 67.0% das cepas, considerando-se, assim, o gene dupA em 67.0% das amostras. Não foi encontrada, portanto, nenhuma associação entre a presença de uma ou de outra região genômica nem do gene dupA (ambas as regiões) com nenhuma das doenças estudadas, que foram a dispepsia funcional,

a úlcera gástrica e a úlcera duodenal. Esse trabalho, assim como a presente tese, considera que o gene *dupA* não é um marcador específico para a doença úlcera duodenal.

Por sua vez, na Índia, estudo de Arachchi et al. (2007), afirma os resultados de Lu et al. (2005), considerando o gene *dupA* como um marcador para a doença úlcera duodenal, sendo encontrado em 37.5% dos pacientes com esse diagnóstico.

No mesmo sentido, pesquisa realizada por Zhang et al. (2008), demonstrou, nas amostras analisadas, a presença do gene *dupA* em 35.3% das cepas de *H. pylori* isoladas, sendo significativamente maior em amostras de úlcera duodenal (45.5%) quando comparadas com amostras de pacientes com câncer gástrico (24.1%) ou úlcera gástrica (23.4%).

Os resultados obtidos nesse estudo também demonstraram, ao contrário de Pacheco et al. (2008), que a presença dos genes *jhp0917* e *jhp0918* é fortemente relacionada, já que apenas 2.5% das amostras resultaram no genótipo *jhp0917* positivo *jhp0918* negativo, sendo classificadas como *dupA* negativo. Além disso, cepas com genótipo *jhp0917* negativo *jhp0918* positivo não foram identificadas, divergindo dos resultados obtidos para essas regiões na presente pesquisa, na qual foi encontrado, em maior quantidade, o genótipo *jhp0917* negativo *jhp0918* positivo. Como conclusão, Zhang et al. (2008) consideraram que o gene *dupA* é associado ao desenvolvimento da úlcera péptica na população chinesa, não confirmando, porém, os possíveis efeitos protetores que as cepas positivas para esse gene possuem contra a gastrite atrófica e o câncer gástrico.

Gomes et al. (2008), no Brasil, também encontraram resultados conflitantes aos de Lu et al. (2005), não associando o gene *dupA* com a úlcera duodenal ou com o adenocarcinoma gástrico, considerando, assim como Gressmann et al. (2005), que deve haver uma diversidade no conteúdo gênico que pode contribuir para a adaptação bacteriana a indivíduos geneticamente diferentes dos diversos grupos étnicos presentes na população humana.

Esse estudo também relatou que a presença do gene *dupA* foi associada à do gene *cagA* em cepas isoladas de pacientes adultos com diagnóstico de úlcera

duodenal, mas não em pacientes com gastrite ou câncer gástrico. O gene dupA foi presente em 92.32% do total de amostras, sendo presente em 87.3% das amostras de pacientes com úlcera duodenal e em 87.65% das amostras de indivíduos com câncer gástrico, mostrando, nesse grupo de indivíduos estudado, ser um gene altamente freqüente, apesar de não poder ser associado à úlcera duodenal ou ao câncer gástrico de forma específica (Gomes et al., 2008).

Douraghi et al. (2008) confirmaram que os genes jhp0917 e jhp0918 são contínuos, constituindo o gene dupA como um todo. Apesar do pequeno número de amostras usado nesse estudo e dos resultados obtidos entre os grupos não serem estatisticamente significativos, houve uma prevalência maior do gene dupA em pacientes com úlcera duodenal do que em indivíduos com câncer gástrico. Os resultados desse estudo são consistentes com os de nosso trabalho, assim como os de Argent et al. (2007), que demonstraram uma ausência de associação entre a presença do gene dupA e a doença úlcera duodenal em amostras provenientes de quatro regiões, Bélgica, África do Sul, China e Estados Unidos da América.

Estudo realizado com pacientes do Iraque e do Irã encontrou uma alta associação do gene dupA com a úlcera duodenal (60% de cepas positivas para o gene), enquanto, para os casos de úlcera gástrica estudados, essa proporção foi um pouco menor (40%), resultando em dados não estatisticamente significantes, mas sugerindo uma importante relação entre esse gene e o desenvolvimento da doença ulcerosa.

Por sua vez, trabalho realizado por Schmidt et al. (2009), demonstrou uma grande variabilidade na prevalência do gene dupA não apenas entre as regiões geográficas como também entre grupos étnicos residentes em um mesmo país. Pacientes suecos apresentaram os maiores índices de cepas dupA positivas (65.0%), enquanto amostras de indivíduos da Austrália (26.3%), da China (28.9%), da Índia (7.1%) e de indivíduos malásios (35.7%) residentes na Malásia ou em Singapura apresentaram índices menores.

Demonstrou-se, com os resultados obtidos, que a associação entre o gene dupA e as doenças gastroduodenais mais graves é inconsistente entre as populações da Suécia e da China. Já nos pacientes dos grupos étnicos chineses

estudados, a prevalência desse gene foi significativamente maior nos pacientes diagnosticados com úlcera duodenal (62.5%) ou câncer gástrico (54.6%) quando comparados com pacientes com dispepsia funcional. Essa informação contrasta com a de Lu et al. (2005) e Zhang et al. (2008), que relataram uma associação negativa desse gene com o câncer. No presente estudo, pode-se considerar, da mesma forma, uma associação negativa do gene *dupA* com o câncer gástrico.

Em contraste, na população sueca desse mesmo estudo, não foi encontrada uma diferença significativa na prevalência do gene *dupA* em pacientes com úlcera duodenal, câncer gástrico e dispepsia funcional, resultados estes similares aos de Pacheco et al. (2008) e Gomes et al. (2008).

Em outro aspecto, considerando-se a relação entre a presença dos genes *dupA* e *cagA*, também existem controvérsias. Estudo de Arachchi et al. (2007) envolvendo pacientes com úlcera duodenal e gastrite relatou que a presença do gene *dupA* foi significativamente associada aos genótipos *cagA* positivos. Ainda, dois outros estudos reportaram a presença concomitante dos genes *dupA* e *cagA* em pacientes adultos com úlcera duodenal, mas não em pacientes com outras doenças ou em crianças (Douraghi et al., 2008; Gomes et al., 2008). Entretanto, essa relação não foi encontrada nos estudos de Argent et al. (2007) e de Lu et al. (2005). No presente trabalho, a maioria das cepas encontradas foi *cagA* positiva e *dupA* negativa, tanto para os casos de adenocarcinoma precoce quanto de avançado.

Portanto, o gene *dupA*, constituído por duas regiões contínuas, *jhp0917* e *jhp0918*, parece ter importância no desenvolvimento das doenças gastroduodenais, de forma isolada ou conjunta aos outros fatores de virulência do *H. pylori*, porém, como comprova o presente estudo, não pode ser associado ao desenvolvimento do câncer gástrico, sendo encontrado em pequena proporção nas cepas provenientes desses pacientes, tanto com adenocarcinoma gástrico precoce quanto avançado.

Assim, existem inúmeros trabalhos que fizeram investigações acerca dos fatores de virulência do *H. pylori*, com o objetivo de relacioná-los ao desenvolvimento das diferentes doenças gástricas. O presente trabalho

demonstrou uma interação importante entre os genótipos encontrados e o adenocarcinoma gástrico distal do tipo intestinal, tanto precoce quanto avançado, especialmente com relação ao gene *cagA*, mais prevalente nas amostras de adenocarcinoma avançado, e, portanto, podendo ser sugerido e considerado um marcador das doenças mais graves do trato digestivo.

As cepas prevalentes em ambos os estágios da enfermidade mostrou ter o genótipo *vacA* s1m1, *cagA* positivo, *cagT* positivo e *dupA* negativo, o que corresponde a uma importante informação para estudos posteriores, principalmente para a determinação das cepas mais virulentas dessa bactéria, as quais mereceriam obrigatoriedade do tratamento de erradicação. Cepas do *H. pylori* *cagA* positivas, em particular, demonstraram ter uma importante associação com o desenvolvimento do câncer gástrico, sendo encontradas com maior prevalência nos casos avançados da enfermidade (como descrito, pacientes infectados por cepas *cagA* positivas apresentam risco três vezes maior de desenvolvimento do estágio avançado do adenocarcinoma).

Portanto, a identificação de um fator de virulência específico que atue como marcador molecular de uma determinada doença pode tornar-se uma ferramenta usual e importante na prática clínica e diagnóstica, auxiliando a identificar os pacientes com maiores probabilidades de desenvolver enfermidades mais graves, como o adenocarcinoma.

CONCLUSÕES

7- CONCLUSÕES

No presente trabalho, que foi o primeiro a determinar um perfil genético do *H. pylori* em pacientes da região de Campinas, São Paulo, foram identificadas características importantes dessa bactéria com relação às cepas presentes em amostras de tecido gástrico provenientes de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico distal do tipo intestinal precoce e avançado, especialmente com referência ao gene *cagA*.

Em primeiro plano, na sequência das análises feitas, o gene *vacA*, em suas duas subregiões, *s* e *m*, demonstrou ser um importante fator de virulência para o desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico, porém sem guardar uma relação específica com o estágio precoce ou avançado da doença. O genótipo *s1m1*, prevalente em ambos os casos, foi determinado como o mais virulento pela literatura mundial, o mesmo ocorrendo no presente trabalho. No entanto, considerando-se apenas os casos de câncer gástrico precoce do presente trabalho, 29.0% das cepas apresentaram o genótipo *s2m1*, o que pode ser representativo para uma menor virulência bacteriana, e, conseqüentemente, para a manutenção, junto com outros fatores, da doença no estágio precoce nesses pacientes. O genótipo *m2*, relatado como prevalente em amostras de tecido obtidas de pacientes com gastrite crônica em alguns trabalhos, não foi encontrado nas amostras aqui estudadas, corroborando a análise de que as cepas *m2* apresentam baixo ou praticamente nenhum grau de virulência. Dessa forma, pelo menos teoricamente, não seria mesmo encontrado em amostras de câncer gástrico.

Estudos referentes à interação bactéria-hospedeiro e o fator de virulência *CagA*, juntamente com o sistema de secreção do tipo IV, que contém o gene que o codifica, o *cagA*, têm trazido informações fundamentais sobre a biologia e a fisiologia do *H. pylori*. Muitas das interações induzidas pela *CagA* demonstram estar altamente correlacionadas à patogênese bacteriana, fazendo com que essa proteína atue como uma “chave mestra” capaz de induzir ou inibir diversos caminhos de sinalização nas células hospedeiras.

No presente trabalho, o gene *cagA* demonstrou ser, efetivamente, um importante marcador para o desenvolvimento das enfermidades gástricas mais severas, sendo encontrado, com valor estatisticamente significativo, nas amostras de adenocarcinoma avançado. Apesar de também prevalente no câncer precoce, cepas *cagA* positivas foram encontradas com menos frequência na enfermidade nesse estágio, sugerindo que, possivelmente junto a outros fatores, intrínsecos à bactéria ou do próprio hospedeiro, possa ocorrer um ou mais eventos que não determinem a evolução da doença. Uma possibilidade de explicação para esse fato poderiam ser os próprios polimorfismos existentes no gene *cagA*, os quais, apesar de não terem sido objeto do presente trabalho, não devem deixar de ser considerados importantes. Além disso, com relação ao estágio da doença, pacientes infectados com cepas *cagA* positivas apresentam um risco três vezes maior de desenvolver o adenocarcinoma em sua forma avançada (OR = 3.023, intervalo de confiança de 95%).

Assim como o gene *cagA*, o *cagT* foi prevalente em ambos os grupos de amostras, precoce e avançado, porém, sem guardar semelhanças com o *cagA*, não houve diferenças estatisticamente significativas entre esses dois grupos. Em geral, de acordo com a literatura existente, a presença de cepas positivas para esse gene foi associada ao desenvolvimento das úlceras pépticas, porém, no presente trabalho, não pode ser descartada a hipótese da interação desse gene com o desenvolvimento do câncer gástrico.

Finalmente, o gene *dupA*, inicialmente considerado um marcador específico da úlcera duodenal, não foi prevalente em uma alta porcentagem das amostras de adenocarcinoma, tanto nos casos precoces quanto avançados, mas foi observado em uma pequena proporção das amostras. Esse fato indica que, se considerado juntamente com outros fatores de virulência presentes em determinadas cepas, pode influenciar no desenvolvimento do câncer gástrico.

O genótipo mais freqüente da combinação entre os genes avaliados foi *s1m1 cagA* positivo *cagT* positivo *dupA* (jhp0917/0918) negativo, encontrado, de forma global, em 26 casos (29.21%). Em segundo lugar, cepas *s1m1 cagA* positivo *cagT* negativo *dupA* (jhp0917/0918), juntamente com cepas *s1m1 cagA*

positivo cagT positivo dupA (jhp0917/0918) positivo, foram encontradas, igualmente, em 10.11% (9 casos) das amostras. Na comparação entre os dois grupos de pacientes, o valor $p = 0.116$ demonstrou não existir uma diferença estatisticamente significativa, porém, havendo a determinação de um genótipo para ambos os estágios da doença.

Dessa forma, com base em todos os resultados descritos e decorrentes da presente pesquisa, pode-se inferir que:

1- foi determinado, assim, um perfil das cepas de *H. pylori* presentes em amostras de tecido gástrico fixado e embocado em parafina de pacientes do Gastrocentro da UNICAMP, com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico distal do tipo intestinal precoce e avançado; esse perfil, portanto, é composto de cepas vacA s1m1, cagA positivas, cagT positivas e dupA negativas.

2- o gene cagA pode ser considerado um marcador de virulência para o desenvolvimento das doenças gástricas mais graves, como o adenocarcinoma, sendo encontrado principalmente no estágio avançado dessa doença; dessa inferência resulta a conclusão de que pacientes infectados com cepas cagA positivas devem obrigatoriamente ser submetidos à terapia de erradicação do micro-organismo, especialmente quando já diagnosticadas as alterações teciduais pré-cancerosas;

3- o gene dupA, que deve ser considerado presente quando suas duas regiões contínuas (jhp0917 e jhp0918) forem positivas, não pode ser considerado um marcador exclusivo da úlcera duodenal, sendo encontrado, apesar de em pouca proporção, nas amostras de adenocarcinoma gástrico;

Considerando-se, portanto, todos os aspectos decorrentes da presente pesquisa, pode-se inferir que a identificação de fatores de virulência do *H. pylori* que possam ser considerados marcadores de determinadas enfermidades pode tornar-se uma ferramenta bastante útil na prática clínica, assim como já ocorre com outros patógenos, auxiliando o diagnóstico de pacientes que apresentem maior probabilidade de desenvolver doenças mais severas, como o adenocarcinoma gástrico.

Ainda, não se pode deixar de considerar a importância do diagnóstico precoce, que pode levar à obtenção de índices de sobrevida estatisticamente maiores, além de aumentar o sucesso do tratamento sem reincidência dessas lesões.

As descobertas e as recentes informações trazidas por estas sobre os fatores de virulência do *H. pylori* despertaram, entre a comunidade médica e científica, novas teorias e melhores perspectivas sobre as doenças do aparelho digestivo, especialmente no que diz respeito à carcinogênese gástrica, processo de múltiplas fases e de longa duração, dependente da interação de três fatores primordiais, as características da própria bactéria, as do hospedeiro e os fatores ambientais.

Claramente, o assunto não se encerra e novas descobertas são feitas a cada dia, fazendo com que mais estudos relativos às doenças gastroduodenais devam ser realizados, dando continuidade, portanto, ao presente trabalho, com a finalidade de se determinar um melhor entendimento da relação entre o *H. pylori* e seus mecanismos de agressão ao hospedeiro. Especialmente, por todo o exposto, deve-se considerar o fator de virulência *cagA*, que irá continuar a ser fascinante e compensador como objeto de pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achtman M, Azuma T, Berg D E, Ito Y, Morelli G, Pan Z J et al. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. Mol Microbiol 1999; 32: 459-470.

Ahmad S, Banville D, Zhao Z, Fischer E H, Shen S H. A widely expressed human protein-tyrosine phosphatase containing src homology 2 domains. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 2197-2201.

Ahmed N, Sechi L A. *Helicobacter pylori* and gastroduodenal pathology: New threats of the old friend. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2005; 4: 1-10.

Akopyants N S, Clifton S W, Kersulyte D, Crabtree J E, Youree B E, Reece C A et al. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol 1998; 28: 37-53.

Albenque M, Tall F, Dabis F, Mégraud F. Epidemiological study of *Helicobacter pylori* transmission from mother to child in Africa. Rev Esp Enferm Dig 1990; 78: 4-8.

Allaker R P, Young K A, Hardie J M, Domizio P, Meadows N J. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. J Med Microbiol 2002; 51: 312-317.

Alm R A, Trust T J. Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. J Mol Med 1999; 77: 834-846.

Alm R A, Ling L S, Moir D T, King B L, Brown E D, Doig P C et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1999; 397: 176-180.

Alvarenga E C, Montes C G, Guerrazzi F, Zeitune J M R, Grotto H Z. *Helicobacter pylori* infection and the severity of gastritis are not associated with iron deficiency in a group of Brazilian patients. Clin Chem Lab Med 2010; 48: 1809-1812.

Amieva M R, Vogelman R, Covacci A, Tompkins L S, Nelson W J, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. Science 2003; 300: 1430-1434.

Ando T, Tsuzuki T, Mizuno T, Minami M, Ina K, Kusugami K et al. Characteristics of *Helicobacter pylori*-induced gastritis and the effect of *H. pylori* eradication in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Helicobacter 2004; 9: 443-452.

Antonioli D A, Goldman H. Changes in the location and type of gastric adenocarcinoma. Cancer 1982; 50: 775.

Arachchi H S J, Kalra V, Lal B, Bhatia V, Baba C S, Chakravarthy S et al. Prevalence of duodenal ulcer-promoting gene (dupA) of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer in North Indian population. Helicobacter 2007; 12: 591-597.

Argent R H, Burette A, Miendje Deyi V Y, Atherton J C. The presence of dupA in *Helicobacter pylori* is not significantly associated with duodenal ulceration in Belgium, South Africa, China or North America. Clin Infect Dis 2007; 45: 1204-1206.

Asahi M, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagai Y et al. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. J Exp Med 2000; 191: 593-602.

Asaka M, Kimura T, Kato M. Possible role of *Helicobacter pylori* infection in early gastric cancer development. *Cancer* 1994; 73: 2691-2694.

Asaka M, Kudo M, Kato M, Sugiyama T, Takeda H. Review article: Long-term *Helicobacter pylori* infection – from gastritis to gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 9-15.

Asaka M, Sugiyama T, Nobuta A, Kato M, Takeda H, Graham D Y. Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in Japan: results of a large multicenter study. *Helicobacter* 2001; 6: 294-299.

Atherton J C, Cao P, Peek R M Jr, Tummuru M K, Blaser M J, Cover T L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-17777.

Atherton J C, Peek R M, Tham K T, Cover T L, Blaser M J. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997; 112: 92-99.

Atherton J C, Cover T L, Twells R J, Morales M R, Hawkey C J, Blaser M J. Simple and accurate PCR – based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2979-2982.

Azuma T. *Helicobacter pylori* CagA protein variation associated with gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol* 2004; 39: 97-103.

Azuma T, Yamazaki S, Yamakawa A, Ohtani M, Muramatsu A, Suto H et al. Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer. *J Infect Dis* 2004; 189: 820-827.

Backert S, Tegtmeyer N, Selbach M. The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: the master key hypothesis. *Helicobacter* 2010; 15: 163-176.

Baltrus D A, Amieva M R, Covacci A, Lowe T M, Merrell D S, Ottemann K M et al. The Complete Genome Sequence of *Helicobacter pylori* Strain G27. *J Bacteriol* 2009; 191: 447-448.

Basso D, Zambon C F, Letley D P, Stranges A, Marchet A, Rhead J L et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008; 135: 91-99.

Bauerfeind P, Garner R, Dunn B E, Mobley H L T. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut* 1997; 40: 25-30.

Becker K F, Keller G, Hoefler H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surgical Oncology* 2000; 9: 5-11.

Berg D E, Hoffman P S, Appelmek B J, Kusters J G. The *Helicobacter pylori* genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol* 1997; 5: 468-474.

Bernersen B, Johnsen R, Bostad L, Straume B, Sommer A, Burhol P. Is *Helicobacter pylori* the cause of dyspepsia? *BMJ* 1992; 304: 1276-1279.

Björkholm B, Falk P, Engstrand L, Nyren O. *Helicobacter pylori*: resurrection of the cancer link. *J Intern Med* 2003; 253: 102-119.

Blaser M J. *Helicobacter pylori*: microbiology of a slow bacterial infection. *Trends Microbiol* 1993; 1: 255-260.

Blaser M J, Perez-Perez G I, Kleanthous H, Cover T L, Peek R M, Chyou P H et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-2115.

Blaser M J, Berg D E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 2001; 107: 767-773.

Blaser M J, Atherton J C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 321-333.

Blaser M J. An endangered species in the stomach. *Scientific American* 2005; 24-31.

Bode G, Rothenbacher D, Brenner H. *Helicobacter pylori* colonization and diarrhoeal illness: results of a population-based cross-sectional study in adults. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 823-827.

Bodger K, Crabtree J E. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. *Br Med Bull* 1998; 54: 139-150.

Bogomoletz W V. Early gastric cancer. *Am J Surg Pathol* 1984; 8: 381-391.

Boing A F, Vargas S A L, Boing A C. A carga das neoplasias no Brasil: mortalidade e morbidade hospitalar entre 2000-2004. *Rev Assoc Med Bras* 2007; 53: 2.

Borrmann R, Henke F, Lubarsch O. Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie and Histologie. Berlin: Springer, 1926. 865 p. vol. 4.

Brandt S, Kwok T, Hartig R, König W, Backert S. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 9300-9305.

Brenner H, Weyermann M, Rothenbacher D. Clustering of *Helicobacter pylori* infection in couples : differences between high- and low-prevalence population groups. Ann Epidemiol 2006; 16: 516-520.

Brittan M, Wright N A. Gastrointestinal stem cells. J Pathol 2002; 197: 492-509.

Brittan M, Wright N A. Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development. Gut 2004; 53: 899-910.

Brown L M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. Epidemiol Rev 2000; 22: 283-297.

Brown L M, Thomas T L, Ma J L, Chang Y S, You W C, Liu W D et al. *Helicobacter pylori* infection in rural China: exposure to domestic animals during childhood and adulthood. J Infect Dis 2001; 33: 686-691.

Bruce M G, Maaroos H I. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2008; 13 (Suppl. 1): 1-6.

Bruckner H W, Morris J C, Mansfield P. In: Kufe D W, Pollock R E, Weichselbaum R R et al., editors. Cancer Medicine. 6th ed. Ontario: BC Decker; 2003.

Caldas C, Carneiro F, Lynch H T, Yokota J, Wiesner G L, Powell S M et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. J Med Genetics 1999; 36: 873-880.

Cammarota G, Tursi A, Montalto M, Papa A, Branca G, Vecchio F M et al. Prevention and treatment of low-grade B-cell primary gastric lymphomaby anti-*H. pylori* therapy. J Clin Gastroenterol 1995; 21: 118-122.

Cammarota G, Fedeli P, Bianchi A, Cianci R, Martino A, Fedeli G et al. Regression of E12-stage low-grade gastric MALT-lymphoma after *H. pylori* eradication. Hepatogastroenterology 2005; 52: 975-977.

Canedo P, Castanheira-Vale A J, Lunet N, Pereira F, Figueiredo C, Gioia-Patricola L et al. The interleukin-8-251*T/*A polymorphisms is not associated with risk for gastric carcinoma development in a Portuguese population. Eur J Cancer Prev 2008; 17: 28-32.

Cao P, Cover T L. Two different families of hopQ alleles in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 2002; 40: 4504-4511.

Capurso G, Lahner E, Marcheggiano A, Caruana P, Carnuccio A, Bordi C et al. Involvement of the corporal mucosa and related changes in gastric acid secretion characterize patients with iron deficiency anemia associated with *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 2001; 15: 1753-1761.

Carr A M. Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle. Science 2000; 287: 1765-1766.

Cascales E, Christie P J. The versatile bacterial type IV secretion systems. Nat Rev Microbiol 2003; 1: 137-149.

Caselli M, Parente F, Palli D, Covacci A, Alvisi V, Gasbarrini G et al. "Cervia Working Group Report: guidelines on the diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection. Digest Liver Dis 2001; 33: 75-80.

Caselli M, Zullo A, Maconi G, Parente F, Alvisi V, Casetti T et al. "Cervia II Working Group Report 2006": Guidelines on diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection in Italy. Digest Liver Dis 2007; 39: 782-789.

Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree J E, Ghiara P, Borodovsky M et al. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci 1996; 93: 14648-14653.

Chen Y, Blaser M J. Inverse association of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy. Arch Intern Med 2007; 167: 821-827.

Cheng H, Leblond C P. Origin, differentiation and renewal of the four main cell types in the mouse small intestine. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. Am J Anat 1974; 141: 537-562.

Cheung T K, Wong B C. Treatment of *Helicobacter pylori* and prevention of gastric cancer. J Dig Dis 2008; 9: 8-13.

Christie P J, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. Annu Rev Microbiol 2005; 59: 451-485.

Clarke M F, Dick J E, Dirks P B, Eaves C J, Jamieson C H, Jones D L et al. Cancer stem cells: perspectives on current status and future directions – AACR Workshop on Cancer Stem Cells. Cancer Res 2006; 66: 9339-9344.

Clemens J, Albert M J, Rao M, Qadri F, Huda S, Kay B et al. Impact of infection by *Helicobacter pylori* on the risk and severity of endemic cholera. J Infect Dis 1995; 171: 1653-1656.

Coelho L G V, Zaterka S e Representantes indicados pela Federação Brasileira de Gastroenterologia e Núcleo Brasileiro para Estudo do *Helicobacter*. II Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. Arq Gastroenterol 2005; 42: 128-132.

Colding H, Hartzen S H, Roshanisehat H, Andersen L P, Krogfelt K A. Molecular methods for typing of *Helicobacter pylori* and their applications. Immunol Med Microbiol 1999; 24: 193-199.

Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. Lancet 1975; 2: 58-60.

Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. First American Cancer Society Award Lecture on cancer epidemiology and prevention. Cancer Res 1992; 52: 6735-6740.

Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. Am J Surg Pathol 1995; 19: S37-S43.

Correa P, Fontham E T, Bravo J C, Bravo L E, Ruiz B, Zarama G et al. Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 1881-1888.

Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 2007; 133: 659-672.

Correa P, Piazzuelo M B, Wilson K T. Pathology of gastric intestinal metaplasia: clinical implications. Am J Gastroenterol 2010; 105: 493-498.

Cover T L, Blaser M J. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention. Adv Int Med 1996; 41: 85-117.

Crabtree J E, Farmery S M, Lindley K D, Figura N, Tompkins D S. CagA cytotoxin strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. J Clin Pathol 1994; 47: 945-950.

Costa A C, Figueiredo C, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2009; 14: 15-20.

Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G et al. Molecular characterization of the 128-kDA immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 5791-5795.

Czajkowsky D M, Iwamoto H, Cover T L, Shao Z. The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 2001-2006.

Czinn S J. *Helicobacter pylori* infection: detection, investigation and management. J Pediatr 2005; 146: 21-26.

de Luis D A, Varela C, de La Calle H, Canton R, de Argila C M, San Roman A L et al. *Helicobacter pylori* infection is markedly increased in patients with autoimmune atrophic thyroiditis. J Clin Gastroenterol 1998; 26: 259-263.

de Vries A C, Haringsma J, Kuipers E J. The detection, surveillance and treatment of premalignant gastric lesions related to *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2007; 12: 1-15.

Dev A T, Lambert J R. Diseases associated with *Helicobacter pylori*. MJA 1998; 169: 220-225.

Devi S M, Ahmed I, Francalacci P, Hussain M A, Akhter Y, Alvi A et al. Ancestral European roots of *Helicobacter pylori* in India. BMC Genomics 2007; 8: 184.

Dhillon P K, Farrow D C, Vaughan T L, Chow W H, Risch H A, Gammon M D et al. Family history of cancer and risk of esophageal and gastric cancers in the United States. Int J Cancer 2001; 93: 148-152.

Di Campli C, Gasbarrini A, Nucera E. Beneficial effects of *Helicobacter pylori* eradication on idiopathic chronic urticaria. Dig Dis Sci 1998; 143: 1226-1229.

Dixon M F, Genta R M, Yardley J H, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol 1996; 20: 1161-1181.

Doenges J L. Spirochetes in gastric glands of *Macacus rhesus* and humans without definite history of related disease. Proc Soc Exp Biol Med 1938; 38: 536-538.

Doig P, de Jonge B L, Alm R A, Brown M, Uria-Nickelsen M, Noonan B et al. *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. Microbiol Mol Biol Rev 1999; 63: 675-707.

Dominici P, Bellentani S, Di Biase A R, Saccoccio G, Le Rose A, Masutti F et al. Familial clustering of *Helicobacter pylori* infection: population based study. BMJ 1999; 319: 537-541.

Dong Q J, Wang Q, Xin Y N, Li N, Xuan S Y. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol 2009; 15: 3984-3991.

Dore M P, Sepulveda A R, El-Zimaity H, Yamaoka Y, Osato K, Mototsugu K et al. Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep – implications for transmission to humans. Am J Gastroenterol 2001; 96: 1396-1401.

Douraghi M, Mohammadi M, Oghalaie A, Abdirad A, Mohagheghi M A, Hosseini M E et al. dupA as a risk determinant in *Helicobacter pylori* infection. J Med Microbiol 2008; 57: 554-562.

Dunn B E, Cohen H, Blaser M J. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Reviews 1997; 10: 720-741.

Eckardt V F, Giebler W, Kanzler G, Remmele W, Bernhard G. Clinical and morphological characteristics of early gastric cancer. Gastroenterology 1990; 98: 708-714.

El-Omar E M, Carrington M, Chow W H, McColl K E, Bream J H, Young H A. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature 2000; 404: 398-402.

El-Omar E M, Rabkin C S, Gammon M D, Vaughan T L, Risch H A, Schoenberg J B et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. Gastroenterology 2003; 124: 1193-1201.

Emilia G, Longo G, Luppi M, Gandini G, Morselli M, Ferrara L et al. *Helicobacter pylori* eradication can induce platelet recovery in idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 2001; 97: 812-814.

Endo S, Ohkusa T, Saito Y, Fujiki K, Okayasu I, Sato C. Detection of *Helicobacter pylori* infection in early stage gastric cancer. A comparison between intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. Cancer 1995; 75: 2203-2208.

Enroth H, Engstrand L. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. J Clin Microbiol 1995; 33: 2162-2165.

Erdman S E, Correa P, Coleman L A, Schrenzel M D, Li X, Fox J G. *Helicobacter mustelae*-associated gastric MALT lymphoma in ferrets. Am J Pathol 1997; 151: 273-280.

Eskandarian R, Malek M, Mousavi S H, Babaei M. Association of *Helicobacter pylori* infection with cardiac syndrome X. Singapore Med 2006; 47: 704-706.

Everett S M, Axon A T R. Early gastric cancer: disease or pseudo-disease? Lancet 1998; 351: 1350-1352.

Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard J K, Stephens M, Kidd M et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. Science 2003; 299: 1582-1585.

Faundez G, Troncoso M, Figueroa G. *cagA* and *vacA* in strains of *Helicobacter pylori* from ulcer and non-ulcerative dyspepsia patients. BMC Gastroenterology 2002; 2: 20-24.

Fiedorek S C, Malaty H M, Evans D L, Pumphrey C L, Casteel H B, Evans D J Jr. Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. Pediatrics 1991; 88: 578-582.

Figueiredo C, van Doorn L J, Nogueira C, Soares J M, Pinho C, Figueira P et al. *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and reveal a high prevalence of infections with multiple strains. Scand J Gastroenterol 2001; 36: 128-135.

Figueiredo C, Machado J C, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R et al. *Helicobacter pylori* and interleukin I genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. J Natl Cancer Inst 2002; 94: 1680-1687.

Figueiredo C, Machado J C, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2005; 10: 14-20.

Fischbach W, Malfertheiner P, Hoffmann J C, Bolten W, Bornschein J, Götze O et al. S3-Guideline “*Helicobacter pylori* and gastroduodenal ulcer disease” of the German Society for Digestive and Metabolic Diseases (DGVS) in cooperation with the German Society for Hygiene and Microbiology, Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition e. V., German Society for Rheumatology, AWMF-Registration-no.021/01. Z Gastroenterol 2009; 47: 1230-1263.

Fock K M, Katelaris P, Sugano K, Ang T L, Hunt R, Talley N J et al. Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection. J Gastroenterol Hepatol 2009; 24: 1587-1600.

Fox J G, Batchelder M, Marini R, Yan L, Handt L, Li X et al. *Helicobacter pylori* induced gastritis in the domestic cat. Infect Immunol 1995; 63: 2674-2681.

Fox J G. Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther 1995; 9: 93-103.

Franco A T, Israel D A, Washington M K, Krishna U, Fox J G, Rogers A B et al. Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 10646-10651.

Freedberg A S, Barron L E. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. Am J Dig Dis 1940; 7: 443-445.

Friesen G, Dockerty M B, Remine W H. Superficial carcinoma of the stomach. Surgery 1983; 300-312.

Fuccio L, Zagari R M, Minardi M E, Bazzoli F. Systematic review: *Helicobacter pylori* eradication for the prevention of gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther 2007; 25: 133-141.

Fuccio L, Zagari R, Eusebi L, Laterza L, Cennamo V, Ceroni L et al. Meta-analysis: can *Helicobacter pylori* eradication treatment reduce the risk for gastric cancer? Ann Intern Med 2009; 151: 121-128.

Fuch C S, Mayer R J. Gastric carcinoma. N Engl J Med 1995; 333: 32-41.

Fujimoto S, Olaniyi O O, Arnquist A, Wu J Y, Odenbreit S, Haas R et al. *Helicobacter pylori* BabA expression, gastric mucosal injury, and clinical outcome. Clin Gastroenterol Hepatol 2007; 5: 49-58.

Fukase K, Kato M, Kikuchi S, Inoue K, Uemura N, Okamoto S et al. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomized controlled trial. Lancet 2008; 372: 392-397.

Fulkerson J F Jr, Garner R M, Mobley H L. Conserved residues and motifs in the NixA protein of *Helicobacter pylori* are critical for the high affinity transport of nickel ions. J Bio Chem 1998; 273: 235-241.

Fujii T, Yoshida S, Abe K, Saito D, Yamaguchi H, Oguro Y et al. Very well differentiated tubular adenocarcinoma of the stomach: its endoscopic and histopathological characteristics. Jpn J Clin Oncol 1994; 24: 128-134.

Galadari I H, Sheriff M O. The role of *Helicobacter pylori* in urticaria and atopic dermatitis. *Skinmed* 2006; 5: 172-176.

Gangwer K A, Shaffer C L, Suerbaum S, Lacy D B, Cover T L, Bordenstein S R. Molecular evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin gene (vacA). *J Bacteriol* 2010; 192: 6126-6135.

García-González M A, Lanas A, Quintero E, Nicolás D, Parra-Blanco A, Strunk M et al. Gastric cancer susceptibility is not linked to pro- and anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms in whites: a nationwide multicenter study in Spain. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1878-1892.

Gasbarrini A, Franceschi F, Armuzzi A, Ojetti V, Candelli M, Sanz Torre E et al. Extradigestive manifestations of *Helicobacter pylori* gastric infection. *Gut* 1999; 45 (Suppl 1): 9-12.

Gayther S A, Goringe K L, Ramus S J, Huntsman D, Roviello F, Grehan N et al. Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res* 1998; 58: 4086-4089.

Ge Z, Taylor D E. *Helicobacter pylori* genes hpcopA and hpcopP constitute a cop operon involved in copper export. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 145: 181-188.

Ghiara P, Marchetti M, Blaser M J, Tummuru M K, Cover T L, Segal E D. Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in a mouse model of disease. *Infect Immunol* 1995; 63: 4154-4160.

Ghiara P, Rossi M, Marchetti M, Di Tommaso A, Vindigni C, Ciampolini F et al. Therapeutic intragastric vaccination against *Helicobacter pylori* in mice eradicates an otherwise chronic infection and confers protection against reinfection. *Infect Immunol* 1997; 65: 4996-5002.

Go M F. Review article: Natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 3-15.

Gobert A P, McGee D J, Akhtar M, Mendz J C, Newton Y, Cheng H L et al. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 13844-13849.

Goelz S E, Hamilton S R, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. Biochem Biophys Res Commun 1985; 130: 118-126.

Gomes L I, Rocha G A, Rocha A M C, Soares T F, Oliveira C A, Bittencourt P F S et al. Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with dupA-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients. Int J Med Microbiol 2008; 298: 223-230.

Goodwin C S, McCulloch R K, Armstrong J A, Wee S H. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. J Med Microbiol 1987; 19: 257-267.

Goodwin C S. *Campylobacter pylori* become *Helicobacter pylori*. Int J Bacteriol 1989; 39: 353-405.

Graham D Y, Adam E, Reddy G T, Agarwal J P, Agarwal R, Evans D J Jr et al. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* in India. Comparison of developing and developed countries. Dig Dis Sci 1991; 36: 1084-1088.

Gramley W A, Ashgar A, Frierson H F Jr, Powell S M. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. J Clin Microbiol 1999; 37: 2236-2240.

Gressmann H, Linz B, Ghai R, Pleissner K P, Schlapbach R, Yamaoka Y et al. Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. PLoS Genet 1, e43.

Grimm W, Fischbach W. *Helicobacter pylori* infection in children and juveniles: an epidemiological study on prevalence, socio-economic factors and symptoms. Dtsch Med Wochenschr 2003; 128: 1878-1883.

Grubel P, Hoffman J S, Chong F K, Burstein N A, Mepani C, Cave D R. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1997; 35: 1300-1303.

Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. Nature 1998; 392: 402-405.

Hagmann M. Checkpoint gene linked to human cancer. Science 1999; 286: 2528-2531.

Hampson L, Shennib H, Lough J, Fried G. Early gastric cancer: is it a distinct clinical entity? Can Assoc Gen Surg 1990; 33: 349-352.

Handt L X, Fox J G, Dewhirst F E, Fraser G J, Paster B J, Yan L L et al. *Helicobacter pylori* isolated from domestic cat: public health implications. Infect Immunol 1994; 62: 2367-2374.

Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* cagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. Cancer Sci 2005; 96: 835-843.

Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA: a bacterial intruder conspiring gastric carcinogenesis. Int J Cancer 2006; 119: 1217-1223.

Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. J Gastroenterol 2009; 44: 239-248.

Hawley P R, Westerholm P, Morson B C. Pathology and prognosis of carcinoma of the stomach. Br J Surg 1970; 57: 877.

Hegarty J P, Dowd M T, Baker K H. Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. J Appl Microbiol 1999; 87: 697-701.

Herrera V, Parsonnet J. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. Clin Microbiol Infect 2009; 15: 971-976.

Heyden J D, Martin I G, Cawkwell L. The role of microsatellite instability in gastric carcinoma. Gut 1998; 42: 300-303.

Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. Science 2002; 295: 683-686.

Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T et al. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 14428-14433.

Hirata Y, Maeda S, Mitsuno Y, Takeishi K, Yanai A, Akanuma M et al. *Helicobacter pylori* CagA protein activates serum response element-driven transcription independently of tyrosine phosphorylation. Gastroenterology 2002; 123: 1962-1971.

Hirayama F, Takagi S, Kusuhaara H, Iwao E, Yokoyama Y, Ikeda Y. Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. J Gastroenterol 1996; 31: 755-757.

Höcker M, Hohenberger P. *Helicobacter pylori* virulence factors – one part of a big picture. Lancet 2003; 362: 1231-1233.

Holcombe C. *Helicobacter pylori*: the African enigma. Gut 1992; 33: 429-431.

Holzer H. Cell lineages stem cells and the “quantal cell cycle concept”. In: Potten C S, Lord B I, Schofield R, editors. Stem cells and tissue homeostasis. Cambridge: Cambridge University Press; 1978.

Huang J Q, Zheng G F, Sumanac K, Irvine E J, Hunt R H. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. Gastroenterology 2003; 125: 1636-1644.

Hurme M, Lahdenpohja N, Santtila S. Gene polymorphisms of interleukins 1 and 10 in infectious and autoimmune diseases. Ann Med 1998; 30: 469-473.

Hussain S P, Harris C C. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. Mutation Research 2000; 462: 311-322.

Hussein N R, Mohammadi M, Talebkhan Y, Doraghi M, Letley D P, Muhammad M K et al. Differences in virulence markers between *Helicobacter pylori* strains from Iraq and those from Iran: potential importance of regional differences.in *H. pylori*-associated disease. J Clin Microbiol 2008; 46: 1774-1779.

Husson M O, Gottrand F, Vachee A, Dhaenens L, de Salle E M, Turck D et al. Importance in diagnosis of gastritis of detection by PCR of the cagA gene in

Helicobacter pylori strains isolated from children. J Clin Microbiol 1995; 33: 3300-3303.

Ikenoue T, Maeda S, Ogura K, Akanuma M, Mitsuno Y, Imai Y et al. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the cag pathogenicity island. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8: 181-186.

Instituto Nacional do Câncer. Câncer de estômago. [Acesso em 29 de Nov de 2010] Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br>.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010. Incidência de câncer no Brasil. [Acesso em 08 de agosto de 2010] Disponível em URL: Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>.

Internacional Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human, vol. 61: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyons, France: IARC, 1994.

Isaeva GSh, Abuzarova E R, Valeeva IuV, Pozdeev O K, Murav'eva E V. *Helicobacter pylori* in patients with disorders of hepatobiliary system. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2009; 2: 96-101.

Ivie S E, McClain M S, Torres V J, Algood H M, Lacy D B, Yang R et al. *Helicobacter pylori* vacA subdomain required for intracellular toxin activity and assembly of functional oligomeric complexes. Infect Immunol 2008; 76: 2843-2851.

Japan International Cooperation Agency. Diagnostico y tratamiento de las enfermedades del tubo digestivo alto I. Chile, Ed. Pedro Llorens S. y Hideyasu Kiyonari, 1981.

Japanese Research Society for Gastric Cancer. The general rules for the gastric cancer. Jpn J Surg 1973; 3: 61-71.

Japanese Research Society for Gastric Cancer. Japanese Classification of Gastric Carcinoma, First English Edition. Tokyo, Kanehara & Co., Ltd., 1995.

Johnston B A J, Reed P I, Ali M H. Prevalence of *Campylobacter pylori* in duodenal and gastric mucosa-relationship to inflammation. Scand J Gastroenterol 1988; 23: 69-75.

Joy Paul B V, Newman E L, Hopwood D, Grant A, Qureshi S, Lane D P et al. Expression of p53 protein in normal, dysplastic, and malignant gastric mucosa: an immunohistochemical study. J Pathol 1993; 170: 279-283.

Kabir S, Grant C, Daar A S. Serum levels of interleukin-1, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in patients with gastric carcinoma. Cancer Lett 1995; 95: 207-212.

Kabir S. The current status of *Helicobacter pylori* vaccines: a review. Helicobacter 2007; 12: 89-102.

Kabir S. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on incidence of gastric cancer in human and animal models: underlying biochemical and molecular events. Helicobacter 2009; 14: 159-171.

Kague E, Thomazini C M, Pardini M I C M, Carvalho F, Leite C V, Pinheiro. Methylation status of CDH1 gene in samples of gastric mucous from Brazilian patients with chronic gastritis infected by *Helicobacter pylori*. Arq Gastroenterol 2010; 47: 7-12.

Kamada T, Hata J, Sugiu K, Kusunoki H, Ito M, Tanaka S et al. Clinical features of gastric cancer discovered after successful eradication of *Helicobacter pylori*: results from a 9-year prospective follow up study in Japan. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 1121-1126.

Kamangar F, Dores G M, Anderson W F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2137-2150.

Karam S M, Straiton T, Hassan W M, Leblond C P. Defining epithelial cell progenitors in the human oxyntic mucosa. *Stem Cells* 2003; 21: 322-336.

Karel'skaia I A, Ignat'ev V K. *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic hives and asthma. *Klin Med* 2005; 83: 58-61.

Kauser F, Hussain M A, Ahmed I, Srinivas S, Devi S M, Majeed A A et al. Comparative genomics of *Helicobacter pylori* isolates recovered from ulcer disease patients in England. *BMC Microbiol* 2005; 5: 32-40.

Kersulyte D, Velapatino B, Mukhopadhyay A K, Cahuayme L, Bussalleu A, Combe J et al. Cluster of type IV secretion genes in *Helicobacter pylori*'s plasticity zone. *J Bacteriol* 2003; 185: 3764-3772.

Kivi M, Tindberg Y, Sorberg M, Casswall T H, Befrits R, Hellstrom P M et al. Concordance of *Helicobacter pylori* strains within families. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5604-5608.

Kodaira M S, Escobar A M U, Grisi S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. *Rev Saúde Pública* 2002; 36: 356-369.

Konno M, Fujii N, Yokota S, Sato K, Takahashi M, Mino E et al. Five-year follow-up study of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by a random amplified polymorphic DNA fingerprinting method. J Clin Microbiol 2005; 43: 2246-2250.

Kowalski M. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection in coronary artery disease: influence of *Helicobacter pylori* eradication on coronary artery lumen after percutaneous transluminal coronary angioplasty. The detection of *H. pylori* specific DNA in human coronary atherosclerotic plaque. J Physiol Pharmacol 2001; 52 (Suppl 1): 3-31.

Krientz W. Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form in Mageninhalt bei Carcinoma Ventriculi. Dtsch Med Wochenschr 1906; 28: 872.

Kuipers E J, Perez-Perez G I, Meuwissen S G, Blaser M J. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis. Importance of the cagA status. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 1777-1780.

Kusters J G, Gerrits M M, Van Strijp J A, Vandenbroucke-Grauls C M. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. Infect Immun 1997; 65: 3672-3679.

Kusters J G, van Vliet A H M, Kuipers E J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 449-490.

Lage A P, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler J P, Bollen A et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol 1995; 33: 2752-2756.

Lam S K, Talley N J. Report of the 1997 Asia-Pacific Consensus Conference on the management of *Helicobacter pylori* infection. J Gastroenterol Hepatol 1998; 13: 1-12.

Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: Difuse and so-called intestinal type carcinoma. Acta Pathol Microbiol Scand 1965; 64: 31-49.

Leach S A, Thompson M, Hill M. Bacterially catalysed N-nitrosation reactions and their relative importance in the human stomach. Carcinogenesis 1987; 8: 1907-1912.

Leanza A G, Mateo M J, Crespo O, Antello P, Olmos J, Catalano M. Genetic characterisation of *Helicobacter pylori* isolates from an Argentinean adult population based on cag pathogenicity island right-end motifs, ispA-glmM polymorphism and iceA and vacA genotypes. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 811-819.

Lee A. The *Helicobacter pylori* genome – new insights into pathogenesis and therapeutics. New Eng J Med 1998; 338: 833-834.

Letley D P, Rhead J L, Twell R J, Dove B, Atherton J C. Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. J Biol Chem 2003; 278: 26734-26741.

Leung W K, Lin S R, Ching J Y, To K F, Ng E K, Chan F K. Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomized trial on *Helicobacter pylori* eradication. Gut 2004; 53: 1244-1249.

Levine A J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 1997; 88: 323-331.

Lichtenstein P, Holm N V, Verkasalo P K, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer – analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343: 78-85.

Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P et al. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 2007; 445: 915-918.

Linz B, Schuster S C. Genomic diversity in *Helicobacter* and related organisms. *Res Microbiol* 2007; 158: 737-744.

Lipkin M, Correa P, Mikol Y B, Higgins P J, Cuello C, Zarama G et al. Proliferative and antigenic modifications in human epithelial cells in chronic atrophic gastritis. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75: 613-619.

Lorena S L S, Zeitune J M R. Possíveis relações do *Helicobacter pylori* com doenças extra-digestivas. Investigações mais rigorosas são necessárias. *Rev Cond Ter Gastro* 2007; 9: 35-44.

Lu J J, Perng C L, Shyu R Y, Chen C H, Lou Q, Chong S K et al. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 772-774.

Lu H, Hsu P, Graham D Y, Yamaoka Y. Duodenal Ulcer Promoting Gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol* 2005; 128: 844-848.

Lu W, Pan K, Zhang L, Lin D , Miao X, You W. Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumour necrosis factor (alpha) and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis* 2005; 26: 631-636.

Mabe K, Takahashi M, Oizumi H, Tsukuma H, Shibata A, Fukase K et al. Does *Helicobacter pylori* eradication therapy for peptic ulcer prevent gastric cancer? World J Gastroenterol 2009; 15: 4290-4297.

Madinier I M, Fosse T M, Monteil R A. Oral carriage of *Helicobacter pylori*: a review. J Periodontol 1997; 68: 2-6.

Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T, Ogura K, Kanai F, Kato N et al. Structure of cag pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. Gut 1999; 44: 336-341.

Malaty H M, Engstrand L, Pedersen N L, Graham D Y. *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. Ann Intern Med 1994; 120: 982-986.

Malaty H M, Tanaka E, Kumagai T, Ota H, Kiyosawa K, Graham D Y et al. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection and hepatitis A virus and the mode of transmission of infection: a 9-year cohort study in rural Japan. CID 2003; 37: 1067-1072.

Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Bell D, Bianchi Porro G, Deltenre M et al. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht Consensus Report. The European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG). Eur J Gastroenterol Hepatol 1997; 9: 1-2.

Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Hungins A P S, Jones R, Axon A et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection – The Maastricht 2 – 2000 Consensus Report. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 167-180.

Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut 2007; 56: 772-781.

Malfertheiner P, Bornschein J, Selgrad M. Role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer pathogenesis: a chance for prevention. Journal of Digestive Diseases, 2010; 11: 2-11.

Marais A, Mendz G L, Hazell S L, Megraud F. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. Microbiol Mol Biol Rev 1999; 63: 642-674.

Marshall B J, Warren J R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984; 1: 1311-1315.

Mashima H, Suzuki J, Hirayama T, Yoshikumi Y, Ohno H, Ohnishi H et al. Involvement of vesicle-associated membrane protein 7 in humans gastric epithelial cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori*-produced VacA. Infect Immunol 2008; 76: 2296-2303.

Mattar R, Marques S B, Monteiro M S, Santos A F, Iriya K, Carrilho F J. *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. J Med Microbiol 2007; 56: 9-14.

McClain M S, Shaffer C L, Israel D A, Peek R M Jr, Cover T L. Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. BMC Genomics 2009; 10:3-16.

McGee D J, Radcliff F J, Mendz G L, Ferrero R L, Mobley H L. *Helicobacter pylori* *rocF* is required for arginase activity and acid protection in vitro but is not essential for colonization of mice or for urease activity. J Bacteriol 1999; 181: 7314-7322.

- McMichael A J, McCall M G, Hartchorne J M, Woodings T L. Patterns of gastrointestinal cancer in European migrants to Australia: the role of dietary change. *Int J Cancer* 1980; 5: 431-437.
- McNulty C A, Gearty J C, Crump B, Davis M, Donovan I A, Melikian V et al. *Campylobacter pyloridis* and associated gastritis: investigator-blind, placebo-controlled trial of bismuth salicylate and erythromycin ethylsuccinate. *Br Med J* 1986; 293: 5645-5649.
- Mégraud F, Brassens-Rabbe M P, Denis F, Belbouri A, Hoa D Q. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1870-1873.
- Mégraud F. Advantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 57-62.
- Mendall M A, Northfield T C. Transmission of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1995; 37: 1-3.
- Mendz G L, Hazell, S L. The urea cycle of *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 1996; 142: 2959-2967.
- Mera R, Fontham E T, Bravo L E, Bravo J C, Piazuelo M B, Camargo M C et al. Long term follow up of patients treated for *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 2005; 54: 1536-1540.
- Miehlke S, Kirsch S, Agha-Amiri K, Günther T, Lehn N, Malfertheiner P et al. The *Helicobacter pylori* *vacA* s1m1 genotype and *cagA* is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer* 2000; 87: 322-327.

Ming S C. Gastric carcinoma: a pathobiological classification. *Cancer* 1977; 39: 2475.

Ming S C. Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: a critical review. *Gastric Cancer* 1998; 1: 31-50.

Mizushima T, Sugiyama T, Komatsu Y, Ishizu J, Kato M, Asaka M. Clinical relevance of the babA2 genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2463-2465.

Moore R A, Kureishi A, Wong S, Bryan L E. Categorization of clinical isolates of *Helicobacter pylori* on the basis of restriction digest analyses of polymerase chain reaction-amplified ureC genes. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1334-1335.

Morera-Brenes B, Sierra R, Barrantes R, Jonasson J, Nord C E. *Helicobacter pylori* in a Costa Rica dyspeptic patient population. *Eur J Clin Microbiol & Infect Dis* 1994; 13: 253-257.

Murray P R, Rosenthal K S, Kobayashi G S, Pfaller M A. *Microbiologia Médica*. 3a. ed. RJ: Guanabara Koogan, 1998; p. 209-214.

Nakamura K. *Structure of the gastric carcinoma*. Tokyo, Igaku-Shoin, 1982.

Namavar F, Roosendaal R, Kuipers E J, de Groot P, van der Bijl M W, Pena A S et al. Presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity, esophagus, stomach and faeces of patients with gastritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14:234-237.

Nardone G, Rocco A, Malfertheiner P. Review article: *Helicobacter pylori* and molecular events in precancerous gastric lesions. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 261-270.

Newton C A, Graham G A. PCR. 2nd ed. UK: Cheshire, 1997.

Nguyen A M, el-Zaatari F A, Graham D Y. *Helicobacter pylori* in the oral cavity. A critical review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995; 79: 705-709.

Nguyen L T, Uchida T, Kuroda A, Tsukamoto Y, Trinh T D, Ta L et al. Evaluation of the anti-East Asian CagA-specific antibody for CagA phenotyping. Clin Vac Immunol 2009; 16: 1687-1692.

Nogueira C, Figueiredo C, Carneiro F, Gomes A T, Barreira R, Figueira P et al. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. Am J Pathol 2001; 158: 647-654.

Nozaki K, Shimizu N, Ikehara Y, Inoue M, Tsukamoto T, Inada K et al. Effect of early eradication on *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. Cancer Sci 2003; 94: 235-239.

Occhialini A, Marais A, Alm R, Garcia F, Sierra R, Mégraud F. Distribution of open reading frames of plasticity region of strain J99 in *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica. Infect Immunol 2000; 68: 6240-6249.

Oda T, Murakami K, Nishizono A, Kodama M, Nasu M, Fujioka T. Long-term *Helicobacter pylori* infection in Japanese monkeys induces atrophic gastritis and accumulation of mutations in the p53 tumor suppressor gene. Helicobacter 2002; 7: 143-151.

Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fisher W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science 2000; 287: 1497-1500.

Ogura K, Hirata Y, Yanai A, Shibata W, Ohmae T, Mitsuno Y et al. The effect of *Helicobacter pylori* eradication on reducing the incidence of gastric cancer. J Clin Gastroenterol 2008; 42: 279-283.

Oh J D, Kling-Backhed H, Giannakis M, Xu J, Fulton R S, Fulton L A et al. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 9999-10004.

Olczak A, Seyler R W Jr, Olson J W, Maier R J. Association of *Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency. Infect Immun 2003; 71: 580-583.

Oliveira T B. *Helicobacter pylori* em pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática. Dissertação de Mestrado. Campinas, São Paulo. Universidade Estadual de Campinas, 2008.

Ono H, Kondo H, Gotoda T, Shirao K, Yamaguchi H, Saito D et al. Endoscopic mucosal resection for treatment of early gastric cancer. Gut 2001; 48: 225-229.

Ottini L, Palli D, Falchetti M, D'arnico C, Amorosi A, Saieva C et al. Microsatellite instability in gastric cancer is associated with tumor location and family history in a high-risk population from Tuscany. Cancer Res 1997; 57: 4523-4529.

O'Tolle P W, Lane M C, Porwollick S. *Helicobacter pylori* motility. Microbes Infect 2000; 2: 1207-1214.

Owen R J, Slater E R, Xerry J, Peters T M, Teare L E, Grant A. Development of a scheme for genotyping *Helicobacter pylori* based on allelic variation in urease subunit genes. J Clin Microbiol 1998; 36: 3710-3712.

Pachecco A R, Proença-Módena J L, Sales A I L, Fukuhara Y, da Silveira W D, Pimenta-Módena J L. Involvement of the *Helicobacter pylori* plasticity region and cag pathogenicity island genes in the development of gastroduodenal diseases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27: 1053-1059.

Parente J M L, Silva B B, Palha-Dias M P, Zaterka S, Nishimura N, Zeitune J M R. *Helicobacter pylori* infection in children of low and high socioeconomic status in Northeastern Brazil. Am J Trop Hyg 2006; 75: 509-512.

Parkin D M, Ferlay J, Hamdi-Chérif M et al. Cancer in Africa: Epidemiology and Prevention. IARC Scientific Publications n°. 153. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2003.

Parkin D M. International variation. Oncogene 2004; 23: 6329-6340.

Parkin D M, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55: 74-108.

Parsonnet J H, Hansen S, Rodriguez L. *Helicobacter pylori* infection in gastric lymphoma. N Engl J Med 1994; 330: 1267-1271.

Parsonnet J, Friedman G D, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. Gut 1997; 40: 297-301.

Parsonnet J, Shmueli H, Haggerty T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. JAMA 1999; 282: 2240-2245.

Peek R M Jr, Blaser M J. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Nature Rev Cancer 2002; 2: 28-37.

Pennisi E. Bracing p53 for the war on cancer. *Science* 1999; 286: 2431.

Perez-Perez G L, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004; 9 (Suppl. 1): 1-6.

Peter S, Beglinger C. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: The Causal Relationship. *Digestion* 2007; 75: 25-35.

Pinheiro J O P, Both C T, Dietrich S, Zamin J I, Raymond R P, Muretti I et al. Tratamento do *Helicobacter pylori*: comparação de dois esquemas terapêuticos. *GED Gastroenterol Endosc Dig* 1999; 18: 97-101.

Pirouz T, Zounubi L, Keivani H, Rakhshani N, Hormazdi M. Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded specimens from patients with chronic liver diseases, using the amplification method. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1456-1459.

Podzorski R P, Podzorski D S, Wuerth A, Tolia V. Analysis of the *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, and *babA2* genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46: 83-88.

Polk D B, Peek R M Jr. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nature Reviews* 2010; 10: 403- 414.

Poms R E, Tatini S R. Survival of *Helicobacter pylori* in ready-to-eat food at 4 degrees C. *Int J Food Microbiol* 2001; 63: 281-286.

Poppe M, Feller S M, Römer G, Wessler S. Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* 2007; 26: 3462-3472.

Potten C S, Booth C, Pritchard D M. The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol* 1997; 78: 219-243.

Proença-Módena J L, Acrani G O, Micas A F D, Castro M, Silveira W D, Pimenta-Módena J L et al. Correlation between *Helicobacter pylori* infection, gastric diseases and life habits among patients treated at a university hospital in Southeast Brazil. *Braz J Infect Dis* 2007; 11: 89-95.

Puisieux A, Lim S, Groopman J, Ozturk M. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer Res* 1991; 51: 6185-6189.

Qiao W, Hu J, Xiao B, Wu K C, Peng D R, Atherton J C et al. *cagA* and *vacA* genotype of *Helicobacter pylori* associated with gastric diseases. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1762-1766.

Queralt N, Bartolome R, Araujo R. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *J Appl Microbiol* 2005; 98: 889-895.

Rabelo Gonçalves E M A, Roesler B M, Hara N H, Escanhoela C A F, Almeida J R S, Soares E C et al. Padronização da técnica de extração de DNA para detecção do *H. pylori* em amostras de tecido hepático fixado e emblocado. IX Semana Brasileira do Aparelho Digestivo; 2010 Nov 21-25; Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Rauws E A J, Tytgat G N J. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1990; 335: 1233-1235.

Ritcherl J E, Folk G W, Vaezi M F. *Helicobacter pylori* and gastro-esophageal reflux disease: the bug may not be all bad. Am J Gastroenterol 2005; 93: 1800-1802.

Rocha G A, Queiroz D M, Mendes E N, Barbosa A J, Lima Júnior G F, Oliveira C A. *Helicobacter pylori* acute gastritis: histological, endoscopic, clinical and therapeutic features. Am J Gastroenterol 1991; 86: 1592-1595.

Roesler B M, Oliveira T B, Bonon S H A, Monici L T, Zeitune J M R, Costa S C B. Restriction fragment length polymorphism of urease C and urease B genes of *Helicobacter pylori* strains isolated from brazilian patients with peptic ulcer and chronic gastritis. Dig Dis Sci 2009; 54: 1487-1493.

Rogers B B, Alpert L C, Hine AE A S, Buffone G J. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. Am J Pathol 1990; 136: 541-548.

Rohde M, Püls J, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R. A novel sheated surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. Mol Microbiol 2003; 49: 219-234.

Romaniuk P J, Zoltowska B, Trust T J, Lane D J, Olsen G L, Pace N R et al. *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. J Bacteriol 1987; 169: 2137-2141.

Rothenbacher D, Bode G, Berg G, Gommel R, Gonser T, Adler G et al. Prevalence and determinants of *Helicobacter pylori* infection in preschool children: a population-based study from Germany. Int J Epidemiol 1998; 27: 135-141.

Rothenbacher D, Blaser M J, Bode G, Brenner H. Inverse relationship between gastric colonization of *Helicobacter pylori* and diarrheal illnesses in children : results of a population-based-cross-sectional study. J Infec Dis 2000; 182: 1446-1449.

Roussos A, Philippou N, Konstantinos G. *Helicobacter pylori* infection and respiratory diseases: a review. World J Gastroenterol 2003; 9: 5-8.

Saad R J, Schoenfeld P, Kim H M, Chey W D. Levofloxacin-based triple therapy versus bismuth-based quadruple therapy for persistent *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis. Am J Gastroenterol 2006; 101: 488-496.

Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y et al. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. Nature 2007; 447: 330-333.

Saikawa Y, Fukuda K, Takahashi T, Nakamura R, Takeuchi H, Kitagawa Y. Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis. Gastric Cancer 2010; 13: 11-24.

Saiki R K, Gelfand S, Stoffel S, Scharf S J, Higuchi R, Horn G T et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239: 487-491.

Santos I S, Boccio J, Santos A S, Valle N C J, Halal C S, Bachilli M C et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and associated factors among adults in Southern Brazil: a population-based cross-sectional study. BMC Public Health 2005; 5: 118- 128.

Savage S A, Hou L, Lissowska J, Chow W H, Zatonski W, Chanok S J et al. Interleukin-8 polymorphisms are not associated with gastric cancer risk in a Polish population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 589-591.

Schlemper R, Itabashi M, Kato Y, Lewin K, Riddell R, Shimoda T. Differences in diagnostic criteria for gastric carcinoma between Japanese and western pathologists. *Lancet* 1997; 349: 1725-1729.

Schmidt H M A, Andres S, Kaakoush N O, Engstrand L, Eriksson L, Goh K L et al. The prevalence of the duodenal ulcer promoting gene (dupA) in *Helicobacter pylori* isolates varies by ethnic group and is not universally associated with disease development: a case-control study. *Gut Pathogens* 2009; 1: 5-13.

Scholte G H A, van Doorn L J, Quint W G V, Lindeman J. Polymerase chain reaction for the detection of *Helicobacter pylori* in formaldehyde-sublimate fixed, paraffin-embedded gastric biopsies. *Diagnostic Mol Pathol* 1997; 6: 238-243.

Scott D R, Marcus E A, Weeks D L, Sachs G. Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2002; 123: 187-195.

Segal E D, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins L S. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14559-14564.

Selbach M, Moese S, Hauck C R, Meyer T F, Backert S. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2002; 277: 6775-6778.

Seyler R W Jr, Olson J W, Maier R J. Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. *Infect Immun* 2001; 69: 4034-4040.

- Shimizu N, Inada K, Nakanishi H, Tsukamoto T, Ikehara Y, Kaminishi M et al. *Helicobacter pylori* infection enhances glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils treated with chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 1999; 20: 669-676.
- Shiota S, Yamaoka Y. Management of *Helicobacter pylori*. *Med Rep* 2010; 15: 20-23.
- Song Q, Lange T, Spahr A, Adler G, Bode G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J Med Microbiol* 2000; 49: 349-353.
- SP Demográfico. Resenha de Estatísticas Vitais do Estado de São Paulo. Ano 8, n.3. nov 2007. [Acesso em 18 de fev de 2008] Disponível em URL: <http://seade.gov.br>
- Steer H W. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J Clin Pathol* 1975; 28: 639-646.
- Stein M, Rappuoli R, Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1263-1268.
- Stingl K, Altendorf K, Bakker E P. Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol* 2002; 10: 70-74.
- Stout A P. Superficial spreading type of carcinoma of the stomach. *Arch Surg* 1942; 44: 651-657.

Struelens M J, Bauernfeind A, van Belkum A, Blanc D, Cookson B D, Dijkshoorn L et al. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin Microbiol Infec 1996; 2: 2-11.

Sue-Ling H M, Martin I, Griffith J, Ward D C, Quirke P, Dixon M F et al. Early gastric cancer: 46 cases on surgical department. Gut 1992; 33: 1318-1322.

Suerbaum S, Smith J M, Bapumia K, Morelli G, Smith N H, Kunstmann E et al. Free recombination within *Helicobacter pylori*. Proc Acad Sci USA 1998; 95: 12619-12624.

Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. Nat Rev Microbiol 2007; 5: 441-452.

Sugiyama A, Maruta F, Ikeno T, Ishida K, Kawasaki S, Katsuyama T et al. *Helicobacter pylori* infection enhances N-methyl-N-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in the Mongolian gerbil. Cancer Res 1998; 58: 2067-2069

Sullivan P B, Thomas J E, Wight D G D, Neale G, Easham E J, Corrah T et al. *Helicobacter pylori* in Gambia children with chronic diarrhea and malnutrition. Arch Dis Child 1990; 65: 189-191.

Sung J J, Lin S R, Ching J Y, Zhou L Y, To K F, Wang R T et al. Atrophy and intestinal metaplasia one year after cure of *H. pylori* infection: a prospective, randomized study. Gastroenterol 2000; 119: 7-14.

Taguchi A, Ohmiya N, Shirai K, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y et al. Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 2487-2493.

Tahara E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. *Cancer* 1995; 75: 1410-1417.

Tahara E. Molecular biology of gastric cancer. *World J Surg* 1995; 19: 484-488.

Takaiashi S, Okumura T, Tu S, Wang S S, Shibata W, Vigneshwaran R et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 2009; 27: 1006-1020.

Take S, Mizuno M, Ishiki K, Nagahara Y, Yoshida T, Yokota K et al. The effect of eradicating *Helicobacter pylori* on the development of gastric cancer in patients with peptic ulcer disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1037-1042.

Takenaka R, Okada H, Kato J, Makidono C, Hori S, Kawahara Y et al. *Helicobacter pylori* eradication reduce the incidence of gastric cancer, especially of the intestinal type. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 805-812.

Tan S, Tompkins L S, Amieva M R. *Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. *PLoS Pathol* 2009; e 1000407.

Taylor D N, Blaser M J. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol Rev* 1991; 13: 42-59.

Tebbe B, Geilen C C, Schulzke J D. *Helicobacter pylori* infection and chronic urticaria. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34: 685-686.

Thiberge J-M, Boursaux-Eude C, Lehours P, Dillies M-A, Creno S, Coppée Y et al. From array-based hybridization of *Helicobacter pylori* isolates to the complete genome sequence of an isolate associated with MALT lymphoma. *BMC Genomics* 2010; 11: 368-380.

Thijs J C, Van Zwet A A, Thijs W J, Oey H B, Karrenbeld A, Stellaard F et al. Diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: a prospective evaluation of their accuracy, without selecting a single test as the gold standard. Am J Gastroenterol 1996; 91: 2125-2129.

Thomazini C M, Pinheiro N A, Pardini M I, Naresse L E, Rodrigues M A M. Infecção por *Helicobacter pylori* e câncer gástrico: freqüência de cepas patogênicas cagA e vacA em pacientes com câncer gástrico. J Bras Patol Med Lab 2006; 42: 25-30.

Thompson G B, Heerden J A, Sarr M G. Adenocarcinoma of the stomach: are we making progress? Lancet 1993; 342: 713-718.

Tokieda M, Honda S, Fujioka T, Nasu M. Effect of *Helicobacter pylori* infection on the N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. Carcinogenesis 1999; 20: 1261-1266.

Tomb J F, White O, Kervalage A R, Clayton R A, Sutton G G, Fleischmann R D et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1997; 388: 539-547.

Tombola F, Morbiato L, Del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M, Papini E. The *Helicobacter pylori* VacA toxins is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. J Clin Invest 2001; 108: 929-937.

Torres J, Perez-Perez G, Goodman K J, Atherton J C, Gold B D, Harris P R et al. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. Arc Med Res 2001; 31: 431-469.

Traynor O J, Lennon J, Dervan P, Corrigan T. Diagnostic and prognostic problems in early gastric cancer. Am J Surg 1987; 154: 516-519.

Truong B X, Mai V T C, Tanaka H, Ly L T, Thong T M, Hai H H et al. Diverse characteristics of the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* strains collected from patients from Southern Vietnam with gastric cancer and peptic ulcer. J Clin Microbiol 2009; 47: 4021-4028.

Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Nishida T, Komori M, Yasumaru M et al. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer: Underlying molecular and cellular mechanisms. World J Gastroenterol 2006; 12: 1671-1680.

Tsukuma H, Mishima T, Oshima A. Prospective study of “early” gastric cancer. J Cancer 1983; 3: 129-133.

Tsutsumi R, Higashi H, Higuchi M, Okada M, Hatakeyama M. Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA-SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. J Biol Chem 2003; 278: 3664-3670.

Tummuru M K, Cover T L, Blaser M J. Cloning and expression of a high- molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Immun 1993; 61: 1799-1809.

Uemura N, Mukai T, Okamoto S, Yamaguchi S, Mashiba H, Taniyama K et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 1997; 6: 639-642.

Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med 2001; 345: 784-789.

van Door L J, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115: 58-66.

van Door L J, Figueiredo C, Sanna R, Pena S, Midolo P, Ng E K et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2597-2603.

van Door L J, Figueiredo C, Megraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz D M et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1999; 116: 823-830.

Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R et al. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* Taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. *Nov Int J Syst Bacteriol* 1991; 41: 88-103.

Viala J, Chaput C, Boneca L G, Cardona A, Girardin S E, Moran A P et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004; 5: 1166-1174.

Vieira W L S, Coelho L G V, Castro F J, Passos M C F, Franco J M M, Moretzsohn L D et al. Terapia tripla com lansoprazol, claritromicina e amoxicilina, por dez dias, na erradicação do *Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera duodenal. *GED Gastroenterol Endosc Dig* 2001; 20:201-207.

Vince A, Poljak M, Seme K. DNA extraction from archival Giemsa-stained bone-marrow slides: comparison of six rapid methods. *Brit J Haematol* 1998; 101: 349-351.

Walsh J H, Peterson W L. Drug therapy: the treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. N Engl J Med 1995; 333: 984-991.

Wang S H, Zhu H F, He B S, Zhang Z Y, Chen Z T, Wang Z Z, Wu G L. *cagA* + *H. pylori* infection is associated with polarization of T helper cell immune responses in gastric carcinogenesis. W J Gastroenterol 2007; 13: 2923-2931.

Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. Gastroenterology 1998; 115: 642-648.

Watanabe H, Mitsushima T, Yamaji Y, Okamoto M, Wada R, Kokubo T et al. Predicting the development of gastric cancer from combining *Helicobacter pylori* antibodies and serum pepsinogen status: a prospective endoscopic cohort study. Gut 2005; 54: 764-768.

Wirth T, Wang X, Linz B, Novick R P, Lum J K, Blaser J M et al. Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: lessons from Ladakh. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 4746-4751.

Wong B C, Lam S K, Wong W M, Chen J S, Zheng T T, Feng R E et al. China Gastric Cancer Study Group: *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. JAMA 2004; 291: 187-194.

Wright N A. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. Int J Exp Pathol 2000; 81: 117-143.

Wu C, Kuo K, Wu M, Chen Y, Wang C, Lin J. Early *Helicobacter pylori* eradication decreases risk of gastric cancer in patients with peptic ulcer disease. Gastroenterology 2009; 137: 641-648.

Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim J G, Kashima K, Graham D. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. J Clin Microbiol 1999; 37: 2274-2279.

Yamaoka Y, Kikuchi S, El-Zimaity H M, Gutierrez O, Osato M S, Graham D Y. Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation and mucosal interleukin 8 production. Gastroenterology 2002; 123: 414-424.

Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. Gut 2006; 55: 775-781.

Yamaoka Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. J Med Microbiol 2008; 57: 545-553.

Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* typing as a tool for tracking human migration. Clin Microbiol Infect 2009; 15: 829-834.

Yamazaki H, Oshima A, Murakami R, Endoh S, Ubukata T. A long-term follow-up study of patients with gastric cancer detected by mass screening. Cancer 1989; 63: 613-617.

Yamazaki S, Yamakawa A, Ito Y, Ohtani M, Higashi H, Hatakeyama M et al. The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. J Infect Dis 2003; 187: 334-337.

Yatsuya H, Toyoshima H, Mizoue T, Kondo T, Tamakoshi K, Hori Y et al. Family history and the risk of stomach cancer death in Japan: differences by age and gender. Int J Cancer 2002; 97: 688-694.

Yu D, Qu C, Henegariu O, Lu X, Feng G. Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. *J Biol Chem* 1998; 273: 21125-21131.

Zaterka S, Eisig J N, Chinzon D, Rothstein W. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. *Helicobacter* 2007; 12: 82-88.

Zeaiter Z, Cohen D, Müsch A, Bagnoli F, Covacci A, Stein M. Analysis of detergent-resistant membranes of *Helicobacter pylori* infected gastric adenocarcinoma cells reveals a role of MARK2/Par1b in CagA-mediated disruption of cellular polarity. *Cell Microbiol* 2008; 10: 781-794.

Zeitune J M R, Monici L T. Gastritis. *Rev Bras Med* 2000; 57: 33-43.

Zentilin P, Serio B, Dulbecco P, Caratto E, Liritano E, Fasciolo D et al. Eradication of *Helicobacter pylori* may reduce disease severity in rheumatoid arthritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1291-1299.

Zhang Z, Zheng Q, Chen X, Xiao S, Liu W, Lu H. The *Helicobacter pylori* duodenal ulcer promoting gene, *dupA* in China. *BMC Gastroenterology* 2008; 8: 49-54.

Zheng Q, Chen X Y, Shi Y, Xiao S D. Development of gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 1192-1198.

ANEXOS

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (FCM UNICAMP)



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 03/03/07.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 704/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0571.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “DETECÇÃO E ANÁLISE DE DIFERENTES PADRÕES GENOTÍPICOS DE *HELICOBACTER PYLORI* EM AMOSTRAS DE TECIDOS GÁSTRICO OBTIDAS DE PACIENTES COM GASTRITE CRÔNICAS, ÚLCERA PÉPTICA E CÂNCER GÁSTRICO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Bruna Maria Roesler

INSTITUIÇÃO: Gastrocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/11/06

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 04/12/07 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Utilizar amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia de pacientes com gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico a fim de extrair DNA dessas amostras e realizar a reação em cadeia da polimerase para ampliação de regiões genômicas distintas e que podem representar fatores de virulência para o desenvolvimento de diferentes doenças.

III - SUMÁRIO

Serão incluídos todos os pacientes submetidos a exame de endoscopia digestiva no Gastrocentro da UNICAMP que tiverem diagnóstico de gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico. Será feita comparação entre as diferentes cepas de bactérias, verificando se há relação importante entre estas e as doenças. Será utilizada como metodologia a extração de DNA, de tecido gástrico, ampliação pela PCR para as regiões dos genes *cagA*, *vacA* e *urease C* do *H. Pylori*.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após pendências, projeto adequado eticamente.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3788-8936
FAX (019) 3788-7187
cep@fcm.unicamp.br



O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na II Reunião Extraordinária do CEP/FCM, em 04 de dezembro de 2006.


Prof. Dr.ª Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO II – Autorização para armazenamento de amostras biológicas.



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Clínica Médica
Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por
Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia

REGULAMENTO DO LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS POR TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR E ANTIGENEMIA, FCM-UNICAMP QUANTO AO ARMAZENAMENTO E UTILIZAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO

Orientados pela Resolução N° 347 do Conselho Nacional de Saúde determinamos que o armazenamento e utilização de material biológico humano para pesquisa no laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia da FCM-UNICAMP somente será permitido de acordo com as regras abaixo:

1. Deverão ser apresentados ao CEP local as justificativas quanto a necessidade e oportunidade para usos futuros do material biológico humano em questão.
2. Serão obtidos consentimento dos sujeitos de pesquisa, doadores do material biológico autorizando a guarda do referido material.
3. Será incluída uma declaração esclarecendo que “TODA NOVA PESQUISA A SER FEITA COM O MATERIAL SERÁ SUBMETIDA A APROVAÇÃO DESTE CEP, E SE CABÍVEL, TAMBÉM DA CONEP”.
4. Seguiremos as seguintes normas para armazenagem do material biológico em questão:
 - a. As amostras serão armazenadas em equipamentos de congelamento (Freezers -20 ° C) específicos e utilizados somente para este fim. As amostras serão codificadas apenas por números e a chave de ligação entre números e nomes de pacientes será armazenada em programa de computador protegido por senha. Somente 2 pessoas terão acesso a esta chave de código (pela posse da senha) a **Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa**, (matrícula UNICAMP 05.617-1), Docente do Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP e responsável pelos projetos desenvolvidos no laboratório e a bióloga **Dra. Sandra Helena Alves Bonon** (matrícula UNICAMP 22.976-8), bióloga do laboratório.
 - b. A guarda e a autorização do uso do referido material estará sob a responsabilidade exclusiva das pessoas acima citadas.
 - c. Será assegurado a todos os sujeitos de pesquisa, doadores do material, a garantia de que resultados obtidos e que sejam de seu interesse lhes seja comunicada (e/ou ao médico responsável por seu tratamento, quando for o caso). Para tanto informações sobre endereço para contato e telefone serão armazenadas num programa de computador protegido por senha, e utilizado como descrito no **item a** acima.
 - d. Será assegurado a todos os sujeitos de pesquisa, doadores do material, a garantia de que consentimento específico para uso em novo projeto de pesquisa desenvolvido no futuro com o material.

Regulamento em vigor a partir de 25/04/2006

original assinado.
Responsável pelo Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas
por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia - FCM-UNICAMP

APÊNDICES

I- Dados gerais dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico distal intestinal precoce: número da amostra, nome, idade e gênero.

Amostra	Paciente	Idade (anos)	Gênero
P 01	R P M	39	F
P 03	F C	74	M
P 04	J S O	61	M
P 05	P C	63	M
P 06	A M A	61	F
P 07	R F	74	M
P 08	M A A	42	F
P 09	A S A	59	F
P 10	E L O	70	M
P 12	J A	75	M
P 13	A V A	59	M
P 14	L G F L N	31	M
P 15	E G P	68	M
P 16	E C Z	50	F
P 17	S K	66	M
P 18	S M P	47	F
P 19	Z A A	47	F
P 20	C S	45	F
P 21	G D	79	M
P 22	M O O G	68	F
P 24	J L D	64	M
P 25	F D S	56	M
P 28	S R	24	F
P 29	A S	56	M
P 30	G T	63	M
P 31	C G G	65	M
P 32	N P S S	57	F
P 33	P P S	61	M
P 34	L B	65	M
P 35	I C S	79	M
P 36	V J S	65	M

M = masculino
F = feminino

//- Dados gerais dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico distal intestinal avançado: número da amostra, nome, idade e gênero.

Amostra	Paciente	Idade (anos)	Gênero
A 01	W C	79	M
A 03	A A B	43	F
A 04	R A M	48	M
A 05	J F	88	M
A 06	G B	66	M
A 07	R C T E	44	F
A 08	V P	81	M
A 09	C Z	85	M
A 10	O Z	65	M
A 11	J D M	49	M
A 12	S L L	76	M
A 13	M C F	55	M
A 14	J F N	51	M
A 15	J G S	62	M
A 16	M S C	56	M
A 17	A A G	49	M
A 18	S F R	69	F
A 19	T J B	75	F
A 20	A C B	51	M
A 24	M C	54	M
A 25	A E P	61	M
A 26	J M C	68	M
A 27	O M	59	M
A 28	N L P M	78	F
A 29	M P	84	F
A 30	V A S	37	F
A 31	A B G	73	M
A 32	R B O	66	M
A 33	M M D	72	F
A 34	J C P	87	M
A 35	N S S S	63	F
A 37	L A	72	M
A 38	M M O	88	F
A 40	E M	63	M
A 41	A O	72	F
A 42	E S	55	M
A 43	L C M	63	M
A 44	J R L	66	M
A 45	Y Y	78	M
A 46	J A S	62	M
A 48	H A	52	M
A 49	Z D A G	56	F
A 51	I B M	70	M
A 52	R A F	43	M

A 53	MBN	74	F
A 54	JRA	83	F
A 56	BGS	68	M
A 57	BL	77	M
A 58	AJS	57	M
A 59	EPH	61	M
A 60	JL	73	M
A 62	DPS	76	F
A 63	SFO	47	M
A 64	BAR	39	M
A 65	CRAF	75	F
A 66	PM	64	M
A 67	EMC	58	F
A 68	RS	42	F

M = masculino
F = feminino