



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA (IPTSP)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO  
PARASITO-HOSPEDEIRO (PPGBRPH)

LUCAS LUIZ DE LIMA SILVA

**ANÁLISE DOS GENES DE VIRULÊNCIA *cagA*, *vacA* e  
*dupA* DE *Helicobacter pylori* E ASSOCIAÇÃO COM  
DOENÇAS GÁSTRICAS**

Goiânia.  
2021

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese

#### 2. Nome completo do autor

LUCAS LUIZ DE LIMA SILVA

#### 3. Título do trabalho

**ANÁLISE DOS GENES DE VIRULÊNCIA *cagA*, *vacA* e *dupA* DE *Helicobacter pylori* E ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS GÁSTRICAS**

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Lilian Carla Carneiro, Professor do Magistério Superior**, em 16/06/2021, às 13:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **LUCAS LUIZ DE LIMA SILVA, Discente**, em 16/06/2021, às 15:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de](#)



8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2119738** eo código CRC **B22C4A1C**.

---

Referência: Processo nº nº 23070.025633/2021-35

SEI nº 2119738

LUCAS LUIZ DE LIMA SILVA

**ANÁLISE DOS GENES DE VIRULÊNCIA *cagA*, *vacA* e  
*dupA* DE *Helicobacter pylori* E ASSOCIAÇÃO COM  
DOENÇAS GÁSTRICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro do Instituto de  
Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade  
Federal de Goiás, como requisito para obtenção do  
título de doutor

Área de concentração: Biologia da Relação Parasito-  
Hospedeiro

**Orientadora: Dra. Lilian Carla Carneiro**  
**Coorientadora: Dra. Mônica Santiago Barbosa**

Goiânia.  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Lucas Luiz de Lima  
ANÁLISE DOS GENES DE VIRULÊNCIA *cagA*, *vacA* e *dupA* DE *Helicobacter pylori* E ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS GÁSTRICAS [manuscrito] / Lucas Luiz de Lima Silva. - 2021.  
CXXXVI, 136 f.: il.

Orientador: Prof. Lilian Carla Carneiro.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2021.  
Bibliografia. Anexos. Apêndice.  
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, algoritmos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Gastropatias. 2. Bactéria. 3. Patologia Molecular. 4. Fatores de Virulência. I. Carneiro, Lilian Carla , orient. II. Título.

CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

**ATA DE DEFESA DE TESE**

**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE LUCAS LUIZ DE LIMA SILVA** - Aos sete dias do mês de junho do ano de 2021 (07/06/2021), às 08h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Dra. **LILIAN CARLA CARNEIRO** (IPTSP/UFG), **ANTONIO MÁRCIO TEODORO CORDEIRO SILVA** (PUC-GO), **ALINE RODRIGUES GAMA** (UNIFAN), **AROLD VIEIRA DE MORAES FILHO** (UNIFAN) E **MÔNICA DE OLIVEIRA SANTOS** (FM/UFG) para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada por WEBCONFERÊNCIA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: “**ANÁLISE DOS GENES DE VIRULÊNCIA *cagA*, *vacA* e *dupA* DE *Helicobacter pylori* E ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS GÁSTRICAS**”, em nível de DOUTORADO, área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, de autoria de **LUCAS LUIZ DE LIMA SILVA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. **LILIANCARLA CARNEIRO**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor datese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato Aprovado ou Reprovado:

<b>Banca Examinadora</b>	<b>Aprovado / Reprovado</b>
Profa. Dra. <b>Lilian Carla Carneiro</b>	Aprovado
Prof. Dr. <b>Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva</b>	Aprovado
Profa. Dra. <b>Aline Rodrigues Gama</b>	Aprovado
Prof. Dr. <b>Aroldo Vieira de Moraes Filho</b>	Aprovado
Profa. Dra. <b>Mônica de Oliveira Santos</b>	Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato, (**Habilitado**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTOR EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, na área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 10\_h\_40\_min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, **HELOÍSA DESOUSA VIEIRA**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Lilian Carla Carneiro**, Professor do Magistério Superior, em 08/06/2021, às 11:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **AROLDO VIEIRA DE MORAES FILHO, Usuário Externo**, em 08/06/2021, às 11:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mônica de Oliveira Santos, Usuário Externo**, em 08/06/2021, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALINE RODRIGUES GAMA, Usuário Externo**, em 08/06/2021, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva, Usuário Externo**, em 08/06/2021, às 19:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2116753** eo código CRC **63C009D5**.

Referência: Processo nº 23070.025633/2021-35

SEI nº 2116753

## AGRADECIMENTOS

---

Felizmente, não estive sozinho nessa jornada. Como diz o Papa Francisco: “Ninguém vence sozinho, nem no campo, nem na vida”. Portanto, primeiramente gostaria de agradecer à Deus, por me conceder saúde para a construção dessa tese e por ter colocado em meu caminho aqueles que foram luz e que aqui prestarei meus agradecimentos.

Primeiramente, à pessoa mais importante da minha vida, minha mãe. Obrigado por me ensinar a nunca abaixar a cabeça diante das dificuldades, a ser honesto e bom. Meu título de doutor é seu. A minha irmã, que com todo seu carinho, sempre se orgulhou de mim. E também a todos da minha família, que estiveram comigo de alguma forma nessa caminhada.

Ao meu esposo Thiago, que durante todos esses anos tem sido rocha, aguentando todos os meus estresses e reclamações. Obrigado por toda ajuda e companheirismo.

À minha orientadora, profa. Lilian, por ter me recebido e me escutado com toda compreensão, desde a primeira vez que à procurei em seu gabinete. A prof. Mônica, por todos os ensinamentos durante essa caminhada.

A todos os meus amigos (do NEHP, da UNIP, da UNIFAN, do mestrado... da vida), que tornarão essa caminhada mais divertida e prazerosa. Em especial, por toda contribuição e ensinamentos durante o doutorado à Aline, Raylane, Ana Karoline, Jaqueline, Amanda, Waléria, Igor e Juliana Menara. Agradeço imensamente as orações feitas por minha amiga Ana Cláudia e todo o apoio da Nara.

Às empresas de fomento FAPEG, CAPES e CNPQ pelo suporte financeiro e a todos os membros da banca pela disponibilidade e atenção.

A todos aqueles que contribuíram para a concretização desta etapa.

Minha eterna gratidão e meu MUITO OBRIGADO!

## RESUMO

---

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria Gram-negativa associada ao desenvolvimento de diferentes gastropatias. Os diversos desfechos clínicos da infecção por *H. pylori* são resultado da relação parasito-hospedeiro, sendo os fatores de virulência produzidos pelas diferentes cepas de *H. pylori* determinantes na patogênese da infecção. Baseado na importância do tema, o objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência da infecção por *H. pylori*; comparar a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o exame histopatológico na detecção do microrganismo; associar os genótipos de virulência *cagA*, *vacA* e *dupA* com as gastropatias apresentadas pelos pacientes e avaliar a origem das cepas circulantes locais. Para isso, biópsias de tecido gástrico de 117 pacientes dispépticos foram coletadas e utilizadas para a extração de DNA. O laudo do exame histopatológico dos pacientes do estudo, também foram obtidos. A triagem da infecção por *H. pylori* foi realizada usando o gene 16S rRNA (*hpx*) e as amostras *H. pylori* positivas foram submetidas à detecção e sequenciamento dos genes de virulência *vacA*, *cagA* e *dupA*. As sequências do gene *dupA* obtidas da PCR foram utilizadas para a análise filogenética. A prevalência da infecção por *H. pylori* encontrada neste estudo foi de 64,1%, quando considerado apenas a técnica de PCR e 72,3% quando associado ao exame histopatológico. Foi encontrado uma alta frequência de cepas *cagA* positivas (80,0%). O gene *cagA* foi detectado em todas as cepas presentes em pacientes com patologias graves, enquanto o gene *vacA* isolado não foi detectado nesse grupo. Pacientes com doenças graves tinham menos genes de virulência na cepa infectante. A presença do gene *dupA* na cepa infectante não foi associado como fator de risco ou fator de proteção de gastropatias, entretanto, em mulheres a infecção por *H. pylori* *dupA* positiva, aumentou em duas vezes a chance de desenvolvimento de gastrite. Além disso, a filogenia molecular demonstrou que o gene *dupA* isolado neste estudo, apresentou homologia com genes de cepas de *H. pylori* isoladas de países ocidentais. As cepas circulantes de *H. pylori* no centro-oeste brasileiro apresentam alta heterogeneidade de frequência dos genes de virulência *cagA*, *vacA* e *dupA* e a combinação de vários fatores de virulência podem influenciar nos desfechos clínicos dos pacientes.

**Palavras-chave:** Gastropatias, Bactéria, Patologia Molecular, Fatores de Virulência.

## ABSTRACT

---

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a Gram-negative bacterium associated with the development of different gastropathies. The different clinical outcomes of infection by *H. pylori* are the result of the parasite-host relationship, and the virulence factors produced by the different strains of *H. pylori* are determinant in the pathogenesis of the infection. Based on the importance of the topic, the aim of this study was to assess the prevalence of *H. pylori* infection; compare the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique with the histopathological examination for the detection of the microorganism; associate the genotypes of *cagA*, *vacA* and *dupA* virulence with the gastropathies presented by the patients and evaluate the origin of the local circulating strains. For this, gastric tissue biopsies from 117 dyspeptic patients were collected and used for DNA extraction. The histopathological examination report of the study patients was also obtained. The screening for *H. pylori* infection was performed using the 16S rRNA gene (*hpx*) and the positive *H. pylori* samples were subjected to the detection and sequencing of the virulence genes *vacA*, *cagA* and *dupA*. The *dupA* gene sequences obtained from the PCR were used for phylogenetic analysis. The prevalence of *H. pylori* infection found in this study was 64.1%, when considering only the PCR technique and 72.3% when associated with histopathological examination. A high frequency of positive *cagA* strains was found (80.0%). The *cagA* gene was detected in all strains present in patients with severe pathologies, while the isolated *vacA* gene was not detected in this group. Seriously ill patients had fewer virulence genes in the infecting strain. The presence of the *dupA* gene in the infecting strain was not associated as a risk factor or a protective factor for gastropathies, however, in women the infection by *H. pylori dupA* positive, increased the chance of developing gastritis by two. In addition, molecular phylogeny demonstrated that the *dupA* gene isolated in this study showed homology with genes from *H. pylori* strains isolated from western countries. The circulating strains of *H. pylori* in central-western Brazil show high heterogeneity in the frequency of *cagA*, *vacA* and *dupA* virulence genes and the combination of several virulence factors can influence the clinical outcomes of patients.

**Keywords:** Gastropathies, Bacteria, Molecular Pathology, Virulence Factors.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

---

Figura 1: Microscopia eletrônica de <i>H. pylori</i> .....	21
Figura 2: Imagens microscópicas de <i>H. pylori</i> em morfologia de S, U, C e cocóide	22
Figura 3: Representação do cromossomo circular <i>H. pylori</i> , cepa 26695. ....	23
Figura 4: Principais rotas de transmissão de <i>H. pylori</i> .....	27
Figura 5: Índices de prevalência da infecção por <i>H. pylori</i> a nível mundial .....	28
Figura 6: Mecanismo de ação da urease e proteínas acessórias .....	29
Figura 7: Progressão das lesões gástricas causadas pela infecção por <i>H. pylori</i> . ....	32
Figura 8: Ilha de patogenicidade <i>cag</i> .....	35
Figura 9: Alterações induzidas pela translocação de CagA de <i>H. pylori</i> para dentro da célula hospedeira.....	36
Figura 10: Diferentes motivos EPIYA em CagA .....	37
Figura 11: Alterações celulares na célula hospedeira causadas por VacA de <i>H. pylori</i> .....	39
Figura 12: Estrutura da proteína VacA de <i>H. pylori</i> .....	39
Figura 13: Estrutura gênica e diferentes alelos do gene <i>vacA</i> .....	40
Figura 14: Risco de úlcera péptica e câncer gástrico de acordo com o status de <i>vacA</i> .....	41
Figura 15: Genes de <i>H. pylori</i> presentes na ilha de plasticidade que codificam sistema de secreção do tipo IV em cepas J99 .....	42
Figura 16: Papel dos fatores de virulência BabA, SabA, OipA e IceA .....	44
Tabela 1: Sequência de iniciadores utilizados para a detecção de <i>H. pylori</i> , <i>vacA</i> , <i>cagA</i> e <i>dupA</i> , condições de amplificação e tamanho do fragmento.....	53

## LISTA DE ABREVIACÕES

---

AdG	Adenocarcinoma Gástrico
<i>babA</i>	Gene promotor da proteína BabA
BabA	Adesina ligante de antígenos de grupos sanguíneos
<i>cagA</i>	Gene promotor da citotoxina CagA
CagA	Citotoxina associada ao gene A
<i>cagPAI</i>	Ilha de patogenicidade do cromossomo da bactéria
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
<i>dupA</i>	Gene promotor da úlcera duodenal
DupA	Proteína A promotora de úlcera duodenal
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IBP	Inibidor da Bomba de Prótons
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
kDA	Quilodaltons
Le <sup>b</sup>	Antígeno Lewis b de grupo sanguíneo
Le <sup>x</sup>	Antígeno Lewis x de grupo sanguíneo
MALT	Linfoma de tecido linfoide associado à mucosa
NF-kB	Fator nuclear kappa B
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
<i>oipA</i>	Gene promotor da proteína inflamatória A
OipA	Proteína inflamatória da membrana externa A
OMS	Organização Mundial de Saúde
O <sub>2</sub>	Oxigênio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol

rpm	Rotação por minuto
SabA	Adesina ligante de ácido siálico
TNF	Fator de necrose tumoral
μL	Microlitro
μm	Micrometro
<i>vacA</i>	Gene associado a citoxina vacuolizante A
VacA	Citotoxina vacuolizante

## SUMÁRIO

---

Agradecimentos.....	VIII
Resumo.....	IX
Abstract.....	X
Lista de figuras e tabelas.....	XI
Lista de abreviações.....	XII
Estrutura da tese.....	16
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>18</b>
<b>1.Introdução</b> .....	<b>19</b>
<b>2.Revisão da literatura</b> .....	<b>20</b>
2.1.Características microbiológicas de <i>H. pylori</i> .....	20
2.2.Características genômicas de <i>H. pylori</i> .....	22
2.3.Vias de transmissão de <i>H. pylori</i> .....	24
2.4.Epidemiologia .....	27
2.5.Colonização e interação com o epitélio gástrico.....	28
2.6.Patogênese.....	31
2.7.Principais doenças gástricas e lesões pré-cancerígenas .....	32
2.7.1.Gastrite aguda e gastrite crônica ativa .....	32
2.7.2.Úlcera péptica .....	33
2.7.3.Atrofia, metaplasia e câncergástrico .....	34
2.8.Genes e fatores de virulência .....	34
2.8.1.Ilha de patogenicidade do <i>cag</i> ( <i>cag</i> -PAI) e CagA .....	35
2.8.2.VacA .....	38
2.8.3.DupA.....	41
2.8.4.OipA .....	43
2.8.5.SabA .....	43
2.8.6.BabA e IceA .....	44
2.9.Diagnóstico da infecção por <i>H. pylori</i> .....	45
2.9.1.Métodos invasivos .....	45
2.9.2.Métodos não invasivos .....	46
2.10.Tratamento e resistência a antibióticos .....	47
3.Justificativa.....	49
4.Objetivos.....	50

4.1.Objetivo Geral.....	50
4.2.Objetivos Específicos.....	50
5.Metodologia.....	51
5.1.Considerações éticase amostras .....	51
5.2.Extração do DNA das biópsias .....	51
5.3.Amplificação de DNA genômico de <i>H.pylori</i> por PCR.....	52
5.4.Sequenciamento genômico.....	53
5.5.Análiseda sequênciade nucleotídeos .....	54
5.6.Análise filogenética.....	54
5.7.Teste histopatológico .....	55
5.8.Critériosde severidade.....	55
5.9.Processamento e análises dos dados .....	55
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>51</b>
Diagnostic performance between histopathological and molecular methods in the detection of <i>Helicobacter pylori</i> .....	52
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>66</b>
Prevalence of <i>Helicobacter pylori cagA, dupA</i> and <i>vacA</i> genotypes and their association with the severity of gastropathies in patients with dyspepsia.....	67
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>88</b>
<i>Helicobacter pylori</i> virulence <i>dupA</i> gene: risk factor or protective factor?.....	87
<b>CAPITULO V.....</b>	<b>104</b>
Conclusão .....	105
Referências bibliográficas .....	106
Produção científica.....	116
Apendicês e anexos .....	121
Apêncice A – Termo De Consentimento Livre e Esclarecido .....	121
Apêncice B – Questionário sociodemográfico.....	122
Anexo A – Aprovação CEP/UFG .....	124
Anexo A – Aprovação do CEP/UFG .....	124

# **Estrutura da tese**

## ESTRUTURA DA TESE

Essa tese encontra-se subdividida em cinco capítulos: no primeiro capítulo consta a introdução, a revisão da literatura, a justificativa, os objetivos e a metodologia detalhada. Os três capítulos seguintes representam os resultados e a discussão e foram organizados na forma de artigos científicos, os quais foram submetidos/publicados em periódicos indexados em Ciências Biológicas III. O quinto capítulo apresenta as considerações finais e conclusões da tese.

Os artigos contidos em cada capítulos foram preparados de acordo com as normas de cada periódico.

Portanto, a estrutura da tese está disposta da seguinte forma:

**Capítulo I.** Apresenta a introdução, a justificativa, os objetivos e a metodologia detalhada.

**Capítulo II.** “Diagnostic performance between histopathological and molecular methods in the detection of *Helicobacter pylori*”.

**Capítulo III.** “Prevalence of *Helicobacter pylori* *cagA*, *dupA*, and *vacA* genotypes and their association with the severity of gastropathies in patients with dyspepsia”.

**Capítulo IV.** “*Helicobacter pylori* virulence *dupA* gene: risk factor or protective factor?”.

**Capítulo V.** Apresenta as conclusões.

# Capítulo I

---

*Revisão da literatura, justificativa, objetivos e metodologia*

---

//

## 1. Introdução

---

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria Gram-negativa, espiralada, microaerófila, móvel e com tamanho aproximado de 3,5 x 0,5 µm. Descoberta em 1982, pelos médicos australianos Robin Warren e Barry Marshall, esta bactéria foi isolada da mucosa gástrica de pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica. Primeiramente foi denominada *Campylobacter pyloridis*, entretanto, foi realizado o sequenciamento do gene 16S rRNA e as análises demonstraram que a localização filogenética desta bactéria era diferente do gênero *Campylobacter*. A partir desses dados, a nova espécie foi denominada *Helicobacter pylori*, o primeiro membro do gênero *Helicobacter*. Tais descobertas propiciou aos cientistas, o Prêmio Nobel de Medicina em 2005 (Marshall & Warren, 1984; Solnick & Vandamme, 2001; Marshall; Adams; Marshall, 2008).

A infecção por *H. pylori* apresenta distribuição cosmopolita e acredita-se que mais da metade da população mundial está infectada. Essa infecção pode permanecer assintomática em 85% dos indivíduos, no decorrer da vida e a persistência dessa bactéria no trato gastrointestinal, estimula ao aumento do risco de desenvolvimento de diversas doenças, como: gastrite crônica, gastrite atrófica, úlcera péptica, linfoma de tecido linfoide associado à mucosa gástrica e adenocarcinoma gástrico. Devido ao seu papel bem esclarecido na patogênese do câncer gástrico, *H. pylori* é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), um carcinógeno do tipo I (Ricci; Romano; Boquet, 2011; Hooi et al., 2017; Mantero et al., 2018).

As manifestações clínicas da infecção por *H. pylori* irão depender da relação parasito-hospedeiro, determinada por diversos fatores, como: regulação gênica, receptores, polimorfismos e resposta imunológica do hospedeiro; virulência, patogenicidade e heterogeneidade da cepa bacteriana, além dos fatores ambientais (Kusters; Van Vliet; Kuipers, 2006; Amieva; El-omar, 2008).

Para compreender os mecanismos de virulência de *H. pylori*, faz-se necessário compreender a realidade local, no que se diz respeito a variabilidade dos diferentes genótipos das cepas infetantes e associá-los com os achados endoscópios e histológicos dos indivíduos infectados. Este trabalho trata-se de um estudo pioneiro no estado de Goiás, que tem como intuito contribuir para a saúde pública, avaliando o perfil genotípico de cepas isoladas em pacientes dispépticos associando com as patologias gástricas por eles apresentadas.

## 2. Revisão da literatura

---

### 2.1. Características microbiológicas de *H. pylori*

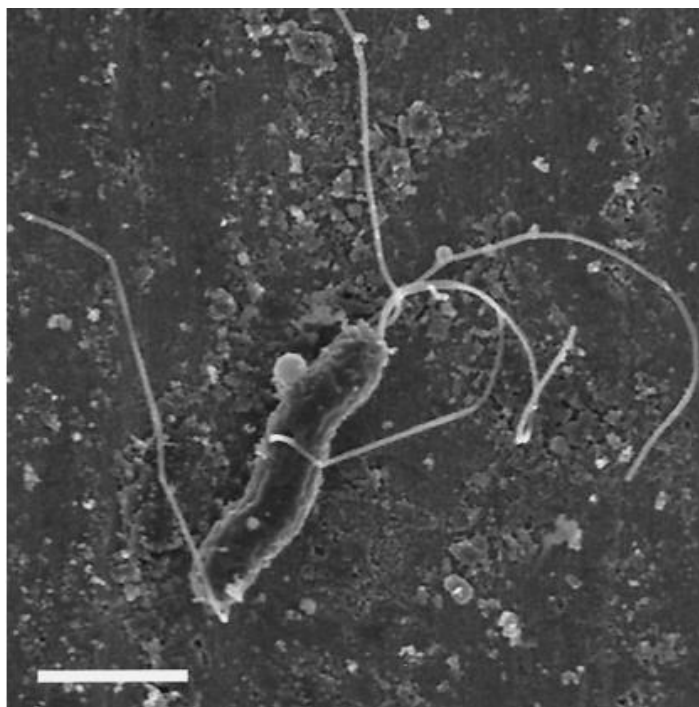
As bactérias do gênero *Helicobacter* pertencem à subdivisão  $\epsilon$  (épsilon) das *Proteobacterias*, da ordem *Campylobacterales*, da família *Helicobacteraceae*. Nesta família também estão incluídos os gêneros *Wolinella*, *Flexispira*, *Sulfurimonas*, *Thiomicrospira* e *Thiovulum*. Todos os microrganismos do gênero *Helicobacter* são microaerofílicos e a maioria é positiva para catalase, oxidase e urease (Kusters; Van Vliet; Kuipers, 2006).

O gênero *Helicobacter* compreende aproximadamente 26 espécies formalmente nomeadas e outras que estão sendo estudadas e caracterizadas. Essas espécies podem ser subdivididas em duas linhagens principais, as espécies gástricas e as espécies entero-hepáticas (não-gástricas). Os grupos demonstram um alto nível de especificidade de órgãos. Espécies gástricas se adaptaram às condições inóspitas encontradas na superfície da mucosa gástrica, considerando que o estômago de todos os mamíferos pode ser colonizado por membros desta linhagem. Todas as espécies gástricas de *Helicobacter* apresentam urease e motilidade positiva. Dentre as principais espécies gástricas estão: *H. pylori*, *H. felis*, *H. mustelae*, *H. acinonychis* e *H. heimannii* (Ladeira; Salvadori; Rodrigues, 2003; Reshetnyak & Reshetnyak, 2017).

As espécies entero-hepáticas de *Helicobacter* colonizam o trato gastrointestinal inferior, incluindo o íleo, cólon e trato biliar de seres humanos e outros mamíferos. Estas bactérias causam infecções persistentes, associadas à inflamação crônica e à hiperproliferação das células epiteliais, que podem levar à doença neoplásica e doenças hepatobiliares. Os microrganismos desta linhagem consistem em muitas espécies, que se diferem pela morfologia, condições de crescimento e produção de urease. As principais espécies de interesse humano deste grupo são: *H. bilis*, *H. pullorum* e *H. rappini*. Contudo, apesar dessa linhagem ser potencialmente patogênica para o homem, apenas a espécie murina *H. hepaticus*, tem sido superficialmente caracterizada (Avenaud et al., 2000; Kusters; Van Vliet; Kuipers, 2006).

*H. pylori* é a espécie melhor caracterizada do gênero. Trata-se de um microrganismo Gram-negativo, pleomórfico, microaerófilo, móvel, não esporulado e ubíquo. Seu tamanho varia de 2,5 a 5  $\mu\text{m}$  de comprimento e de 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de largura. Esse gênero bacteriano apresenta superfície lisa, revestida por um glicocálice com 40  $\mu\text{m}$

de espessura e extremidades arredondadas. Possui de 4 a 6 flagelos unipolares ou bipolares, cada um com aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2,5 nm de espessura (**Figura 1**). Bioquimicamente, *H. pylori* é caracterizada por apresentar positividade nos testes da urease, catalase e oxidase, não fermentam carboidratos e metabolizam aminoácidos pela via fermentativa (Blaser; Musser; Berg, 2001; Boto; Almeida; Queiroz, 2008).



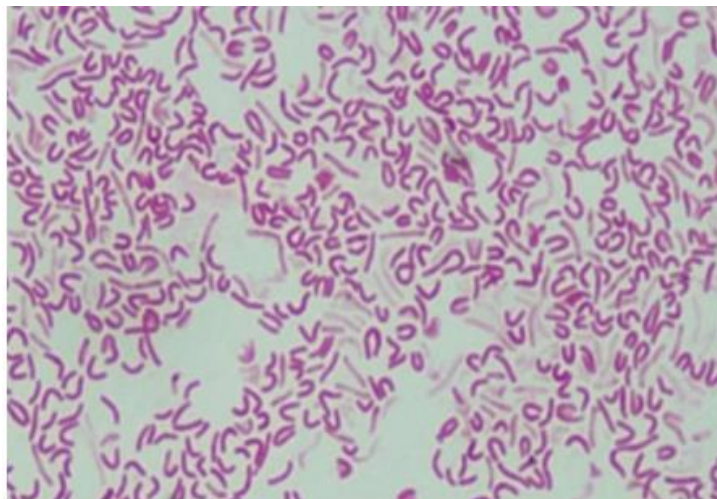
**Figura 1.** Microscopia eletrônica de *H. pylori*.

Fonte: Solnick& Vandamme 2001.

Em função das características fastidiosas de *H. pylori*, a bactéria é de difícil isolamento. O cultivo *in vitro* requer meios complexos contendo sangue, vitamina B12, soro, carvão, amido de milho ou emulsão de gema de ovo e os aminoácidos L-Glutamina e L-Cisteína (Costa et al., 1999).

Embora geralmente esteja na forma bacilar helicoidal ou espiral (forma em S) que é viável e cultivável, essa bactéria em situações adversas, como temperatura, potencial hidrogeniônico (pH), culturas prolongadas ou na presença de antibióticos, pode apresentar-se em mais três condições morfológicas: as formas em C (intermediárias) e U (transitórias), consideradas um estado inativo e cultivável e as formas cocóides, consideradas um estado bacteriano inviável e não cultiváveis, que são encontradas geralmente em ambientes com recursos energéticos escassos (**Figura 2**) (Reshetnyak

&Reshetnyak, 2017). No estômago do hospedeiro, *H. pylori* é encontrada principalmente na forma em espiral, entretanto, as células cocóides também podem ser observadas em regiões severamente mais danificadas da mucosa gástrica (Costa et al., 1999).



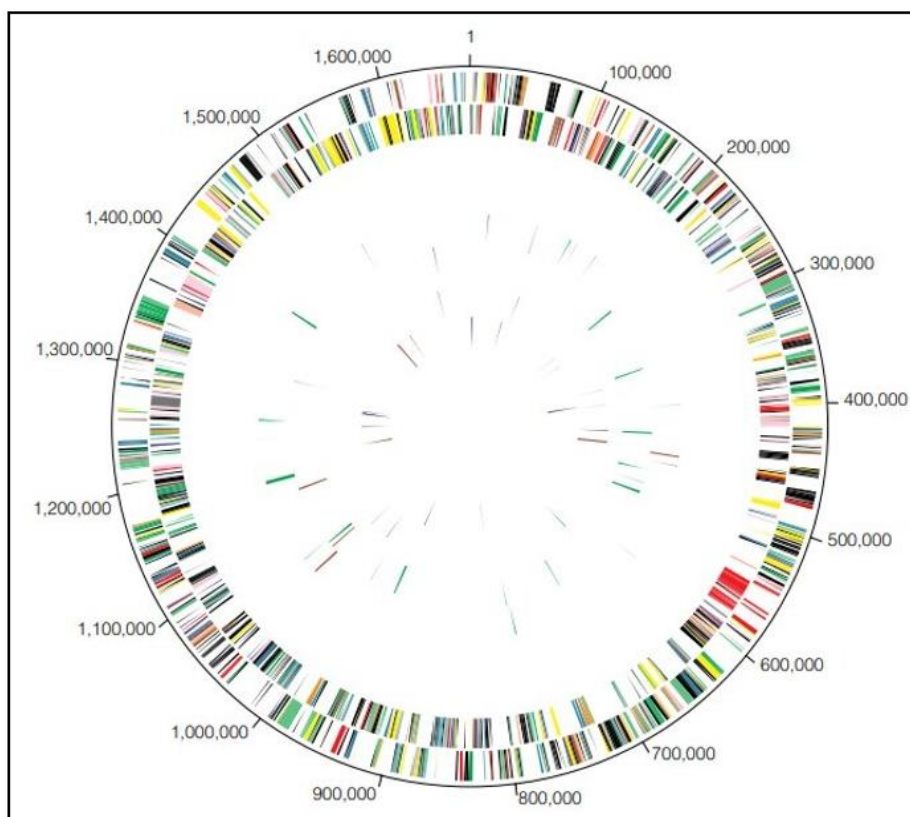
**Figura 2.** Imagens microscópicas de *H. pylori* em morfologia de S, U, C e cocóide.  
Fonte: Reshetnyak &Reshetnyak, 2017.

As cepas de *H. pylori* crescem em temperaturas que podem variar de 33 a 40 °C e pH entre 5,5 a 8,5, além disso necessitam de uma concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) entre 5% a 10% e de O<sub>2</sub> que variam de 2% a 8% (Avenaud et al., 2000; Andersen & Wadström, 2001). Na maioria dos meios de cultura *H. pylori* apresenta formação de colônias puntiformes, translúcidas e não pigmentadas, com o diâmetro de 1 a 2 mm (Reshetnyak &Reshetnyak, 2017).

## 2.2. Características genômicas de *H. pylori*

*H. pylori* foi uma das primeiras bactérias patogênicas que teve seu material genético completamente sequenciado. Seu genoma (cepa 26695) consiste em um cromossomo circular composto por 1.667.867 pares de bases (pb) (**Figura 3**), contendo aproximadamente 39% de guanina e citosina. Um total de 1.500 sequências codificantes foram identificadas e sugere-se que este microrganismo possui os mecanismos básicos de replicação, divisão celular e secreções, similares aos de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Haemophilus influenzae*. Além disso, no genoma de *H. pylori* foram identificados sistemas de restrição, modificação, recombinação homóloga e pós-

replicação, excisão e reparo, endonucleases, metil-transferases, além de sistemas de secreção dos tipos I, II, III e IV (Tomb et al., 1997).



**Figura 3.** Representação do cromossomo circular *H. pylori*, cepa 26695.

Fonte: Tomb et al., 1997.

O estudo do genoma de *H. pylori* mostrou evidências que este microrganismo apresenta inúmeros mecanismos de variação antigênica, que também ocorrem em outros patógenos colonizadores de mucosa, como as *Neisserias* spp.. Foram identificados vários genes codificadores para o metabolismo do ferro, sugerindo que esse elemento é importante na sobrevivência deste patógeno no estômago humano (Tomb et al., 1997).

As cepas de *H. pylori* possuem uma diversidade genética notável, evidenciada pelo conteúdo genético e sua estrutura em mosaico, além da diversidade de sequências nos genes conservados. Esta bactéria possui uma estrutura populacional panmíxica, ocasionando um alto nível de troca genética entre as cepas. A recombinação *in vivo* entre cepas pode ocorrer durante infecções mistas de ocorrência natural. Algumas análises de sequências genômicas completas de vários isolados, indicam que *H. pylori* incorporou material genético de outros organismos (Blaser; Musser; Berg, 2001; Noto et al., 2018).

A divergência entre as cepas de *H. pylori* pode ter sido induzidas também, por diferentes características entre os hospedeiros, tais como o tipo de antígeno denominado Lewis, utilizado para adesão bacteriana; além da especificidade e intensidade das respostas imunes e a complexa regulação da secreção de ácido gástrico (Salama et al., 2000; Blaser; Musser; Berg, 2001).

Foi notado a presença de regiões hipervariáveis em genes codificantes para estruturas de superfície, que permitem ao *H. pylori* evadir das respostas imunológicas, através da alteração de seus antígenos de superfície. Essa diversidade é devido a mutações pontuais, substituições, inserções ou deleções maiores, que podem envolver um ou mais genes ou segmentos multigênicos, incluindo genes de restrição/modificação e genes da ilha de patogenicidade. Também podem ser vistos rearranjos cromossômicos, assim como uma grande diversidade de DNAs extracelulares, incluindo vários elementos de sequência de inserção e plasmídeos (Kersulyte et al., 2000; Blaser; Musser; Berg, 2001; Falush et al., 2001).

Taxas de mutação de *H. pylori* durante a colonização aguda ou crônica são baixas. Justificado pela divergência entre as cepas de *H. pylori*, a diversidade populacional e a aptidão geral das espécies, podem ser aprimoradas pela recombinação entre diferentes linhagens bacterianas, que geralmente ocorre por transformação e/ou conjugação de DNA. Esse mecanismo gera novos genótipos bacterianos, potencialmente mais vantajosos do que quando ocorre apenas mutação recorrente (Akopyanz et al., 1992; Blaser; Musser; Berg, 2001).

A comparação das sequências genômicas completas das linhagens 26695 e J99 de *H. pylori*, revelaram a presença de várias regiões, cujo conteúdo de guanina e citosina eram menor do que no restante do genoma. Uma dessas regiões é chamada de ilha de patogenicidade *cag* (*cagPAI*) e a outra é denominada região de plasticidade, sendo que quase metade dos genes específicos de *H. pylori* estão localizados nesta última região (Tomb et al., 1997; Alm & Trust, 1999).

### **2.3. Vias de transmissão de *H. pylori***

Embora grande parte da população mundial esteja contaminada por *H. pylori*, os mecanismos e as formas de transmissão dessa bactéria ainda não estão totalmente esclarecidos. A dose infectante para aquisição natural da infecção também é desconhecida. O único fato universalmente aceito é que a aquisição da bactéria se dá

principalmente na infância e que a colonização na mucosa gástrica acontece através do contato do microrganismo com a boca, por ser considerado um microrganismo não-invasivo (Kodaira; Escobar; Grisi, 2002).

As altas taxas de prevalência em indivíduos que vivem em condições de aglomeração humana, sugerem que a transmissão pessoa-pessoa, seja um mecanismo importante na transmissão de *H. pylori*. De acordo com a literatura, ainda não é possível determinar se a principal via de transmissão é oral-oral ou fecal-oral. É provável que ambas sejam importantes em diferentes níveis populacionais. Além disso, outras vias como gástrica-oral, iatrogênica e zoonótica, têm sido descritas (**Figura 4**)(Atapoor; Dehkordi; Rahimi, 2014; Aziz; Khalifa; Sharaf, 2015; Talaei et al., 2015).

A via fecal-oral tem sido proposta como a principal via de transmissão e contaminação de *H. pylori*. Esta rota ocorre porque a bactéria consegue manter-se íntegra na passagem do estômago para o duodeno durante o processo de digestão. Um fato importante sobre essa rota é que a disseminação desta bactéria por água e alimentos, baseia-se na contaminação destes insumos por fezes de indivíduos infectados. Entretanto, a viabilidade deste microrganismo na natureza ainda não está totalmente evidenciada (Aziz; Khalifa; Sharaf, 2015).

*H. pylori* pode permanecer ou transitar na área bucal, permanecendo na placa dentária ou na saliva, justificando a via oral-oral. Além disso, há indícios de que o tratamento da infecção por via sistêmica, não elimina a bactéria da placa dentária, o que sugere que a boca pode ser um reservatório permanente da bactéria(Desai et al., 1991; Kodaira; Escobar; Grisi, 2002).

A via gástrica-oral acontece devido à regurgitação do suco gástrico, que pode contaminar a boca, predispondo a colonização da região bucal por tempo não determinado. O refluxo esofágico pode transportar bactérias para a região oral, que também pode ser transmitida para outros indivíduos, através do contato com a saliva ou vômito do indivíduo infectado (Sullivan et al., 1990).

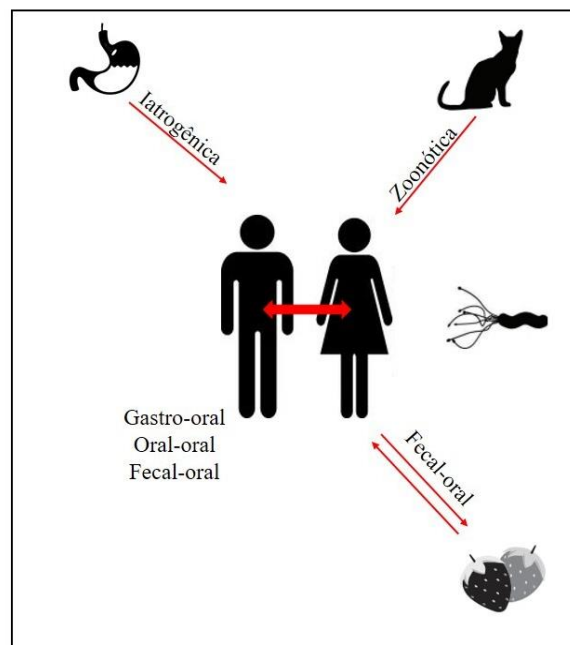
A via iatrogênica ou gastro-gástrica ocorre pelo uso de sondas e endoscópios, que tiveram contato com a mucosa gástrica de indivíduos infectados e não foram devidamente esterilizados, antes do uso em outro indivíduo. Nesta via, a dose infectante do agente em relação as outras, parece ser menor (Teixeira; De Souza; Rocha, 2017).

A transmissão zoonótica parece acontecer através do contato com animais e insetos vetores, como vacas, animais domésticos e moscas. Embora a bactéria tenha sido isolada em gatos domésticos, pesquisas sugerem que *H. pylori* provavelmente é incomum

nestes animais e, portanto, provavelmente não é motivo de grande preocupação para os proprietários. Entretanto, outros estudos sugeriram ovelhas como uma possível fonte de transmissão. No entanto, este assunto merece investigação adicional (Junqueira et al., 2017).

Os principais insetos vetores na transmissão de *H. pylori* são a mosca doméstica (*Musca domestica*) e as varejeiras (*Chrysomya megacephala*), estes, desempenham um papel importante na transmissão da bactéria de superfície para superfície. Estes insetos, ao se alimentarem de resíduos como matéria orgânica em decomposição e fezes contaminadas, transportam e depositam a bactéria em alimentos e em outros hospedeiros. No entanto, faltam evidências de que *H. pylori* possa ser transmitido de fato por essa via. A hipótese é aceitável, considerando que estes insetos carregam muitos outros microrganismos (Emara; Mohamed; Abdel-Aziz, 2014; Junqueira et al., 2017).

Não há relação direta que evidencie a transmissão de *H. pylori* por contato sexual direto, contudo, é possível que a bactéria seja transmitida em relações sexuais anal-oral. Além do mais, alguns estudos sugerem que pacientes infectados podem transportar a bactéria de forma transitória ou permanente, por meio da uretra e da vagina, mas, os mecanismos de transmissão e contaminação ainda não foram esclarecidos (Esllick, 2000; Dimitriadi, 2014).



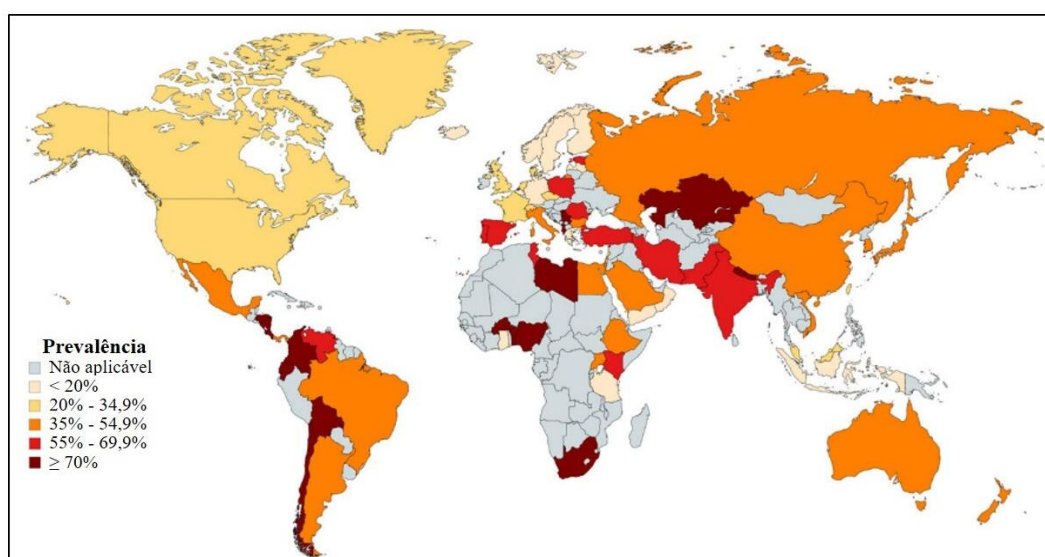
**Figura 4: Principais rotas de transmissão de *H. pylori***(Fonte: adaptado de Bauer& Meyer, 2011).

## 2.4. Epidemiologia

O conhecimento da epidemiologia da infecção por *H. pylori* é importante para evitar sua disseminação e pode ser útil na identificação de populações de alto risco, especialmente em áreas com altas taxas de câncer gástrico (Brown, 2000).

A infecção por *H. pylori* apresenta distribuição cosmopolita e estima-se que atualmente a prevalência global da infecção por esse patógeno era de 44,3%. No entanto, há diferenças na taxa de infecção entre diversos países, sendo que em países em desenvolvimento a média de prevalência tende ser maior, do que nos países desenvolvidos (**Figura 5**)(Zamani et al., 2018).

A América Latina e o Caribe apresentaram a maior taxa de infecção do mundo (59,3%) e a menor taxa de infecção é encontrada na América do Norte (25,8%) (Hooi et al., 2017; Zamani et al., 2018). No Brasil, os índices de infecção são variáveis entre as diferentes regiões do país, sendo que a prevalência da infecção em regiões de baixas condições de saneamento pode atingir até 90%. Estudos realizados nos estados do Pará, São Paulo e Roraima, evidenciaram índices de infecção de 90,7%, 43,61% e 78,9% respectivamente (Suzuki et al., 2013; McDonald et al., 2015; Vinagre et al., 2015). No estado de Goiás um estudo que analisou fatores sociodemográficos, econômicos, sintomatologia e estilo de vida de pacientes dispépticos, encontrou uma prevalência de 69,2% (Ramos et al., 2019).



**Figura 5.** Índices de prevalência da infecção por *H. pylori* a nível mundial.

Fonte: adaptado de Zamani et al., 2019.

Em países em desenvolvimento, a maioria das crianças é infectada antes dos 10 anos e a prevalência em adultos chega a 80% antes dos 50 anos de idade. Por outro lado, em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, a incidência de *H. pylori* é rara em menores de 10 anos e aumenta para 10% em pessoas entre 18 e 30 anos (Dore et al., 2002). Normalmente a prevalência da infecção por *H. pylori* aumenta gradativamente com a idade, não sendo comumente encontradas diferenças entre os gêneros masculinos e femininos. Além disso, estudos realizados nos Estados Unidos e na África do Sul, demonstraram uma prevalência maior de *H. pylori* em indivíduos da etnia em comparação aos brancos porém, ainda não há explicações para estes dados. Acredita-se que este fenômeno é determinado por uma série de fatores, como possível predisposição genética, fatores econômicos, ambientais e culturais (Dore et al., 2002; Shi et al., 2008).

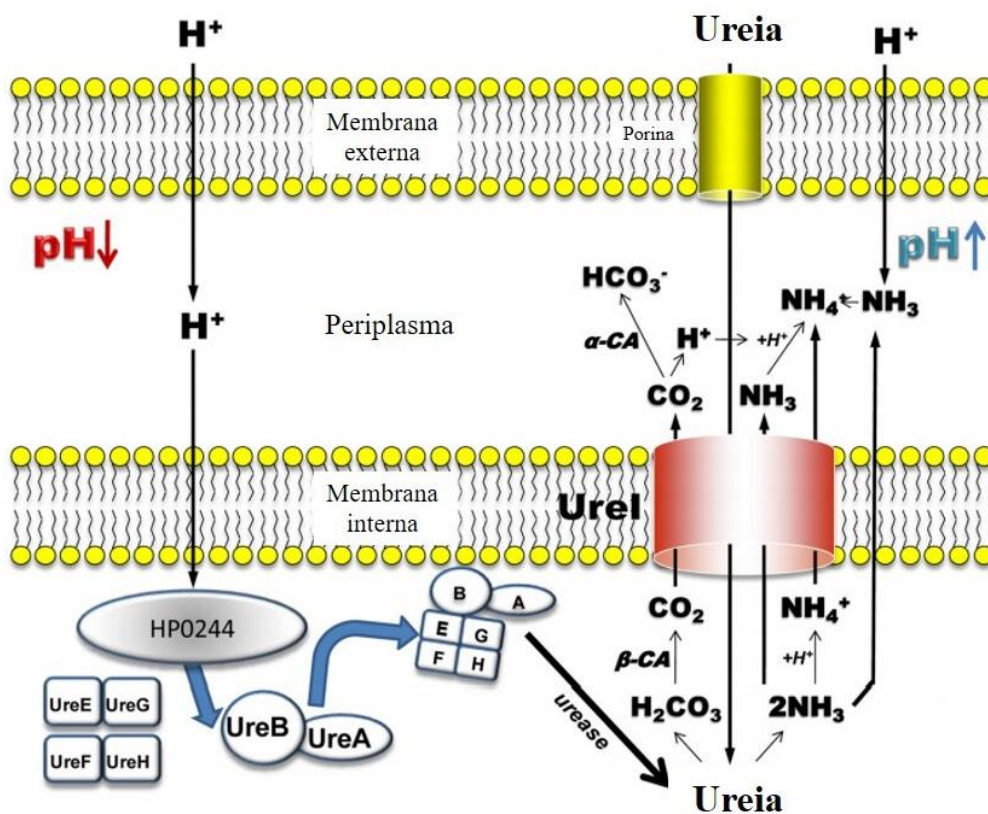
No geral, práticas inadequadas de saneamento, baixa classe social e condições de alta densidade populacional, parecem estar relacionadas a uma maior prevalência da infecção. A falta de higiene e as condições de aglomeração podem facilitar a transmissão da infecção entre os membros da família (Brown, 2000).

## **2.5. Colonização e interação com o epitélio gástrico**

Cepas de *H. pylori* possuem grande diversidade genotípica, cuja os fatores de virulência desencadeiam diferentes graus de resposta inflamatória do hospedeiro, resultando em diversos desfechos patológicos (Boneca et al., 2003; Amieva & El-Omar, 2008).

*H. pylori* é o único microrganismo caracterizado que é capaz de colonizar o ambiente hostil do estômago humano. Para evitar a atividade bactericida do ácido estomacal, essa bactéria produz a enzima urease, que é capaz de tamponar transitoriamente o ambiente ácido através da hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono. As altas concentrações de amônia geradas alteram a biossíntese da mucosa gástrica, proporcionando uma energia adicional que permite a motilidade dos flagelos bacterianos, através da geração de um potencial de membrana. Estimulando a quimiotaxia de monócitos e neutrófilos e a produção de citocinas pró-inflamatórias que podem causar lesões as células epiteliais (Amieva & El-omar, 2008; Matsunari et al., 2012).

Foram identificados sete principais genes constitutivos relacionados à produção da urease bacteriana. Os genes *ureA* e *ureB* codificam duas subunidades que compõe a enzima e os genes *ureE*, *ureF*, *ureG* e *ureH*, codificam proteínas acessórias importantes na ativação da urease. O gene *ureI* codifica uma proteína presente na membrana externa de *H. pylori*, que funciona como um canal, atuando na internalização da ureia (**Figura 6**). A regulação da atividade da urease em *H. pylori* é realizada de várias maneiras. A UreI em pH ácido acelera a entrada de ureia, ativando a urease intrabacteriana. UreA e UreB formam um complexo de apoenzima que é ativado por inserção de níquel, auxiliado por pares de proteínas acessórias UreE/UreG e UreF/UreH, permitindo o controle do nível de urease ativa. Os íons de níquel necessários para a atividade da urease são transportados pela membrana citoplasmática por uma proteína de alta afinidade chamada de NixA, codificada pelo gene *nixA* (Scott et al., 2010).



**Figura 6:** Mecanismo de ação da urease e proteínas acessórias.

Fonte: adaptado de Scott et al., 2010.

A atividade enzimática da urease é altamente conservada neste tipo de microrganismo. Contudo, mesmo com múltiplos mecanismos de adaptação ácida, a bactéria permanece suscetível ao ácido e só pode sobreviver por alguns minutos em pH

baixo. Em vez de se tornar um acidófilo, *H. pylori* desenvolveu várias estratégias para minimizar a exposição ao pH baixo no lúmen do estômago, permanecendo muito próximo à superfície do epitélio, onde o pH é quase neutro (Merrell et al., 2003; Pflöck et al., 2006; Amieva; El-Omar, 2008).

A camada de muco que recobre a mucosa gástrica é formada a partir de células secretoras de grânulos ricos em proteína glicosilada, a qual juntamente com a camada de fosfolípidios forma uma camada protetora contínua da mucosa gástrica. Para permanecer na camada de muco, tanto a capacidade de movimento flagelar quanto a capacidade de controlar a direção do movimento, através de respostas quimiotáticas são essenciais para a colonização da bactéria. Um quimiorreceptor codificado pelo gene *tlpB* é responsável pela quimiotaxia negativa da bactéria nos gradientes de pH. A bactéria aumenta sua velocidade de motilidade quando está perto de um gradiente ácido e também muda de rota para favorecer o movimento para longe do ácido (Croxen et al., 2006; Amieva; El-Omar, 2008).

Na fase inicial de colonização, tanto o formato em hélice quanto a presença de flagelo, facilita sua penetração na camada da mucosa gástrica, entretanto, *H. pylori* necessita atravessar a camada de muco que confere proteção química, mecânica e biológica ao epitélio gástrico. Para isso, a bactéria sintetiza proteases e fosfolipases que são capazes de degradarem a camada de muco, propiciando um maior contato com as células epiteliais de revestimento, o que facilita a progressão e o estabelecimento da infecção. As fosfolipases também hidrolisam as membranas celulares que liberam lisolecitinas, as quais constituirão um fator ulcerogênico. Além disso, os tetrapeptídeos bacterianos exercem um importante efeito quimiotático sobre eosinófilos e neutrófilos. Estas células uma vez ativadas provocam a liberação de citocinas que possibilitam o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, mediante a ativação dos metabólitos do ácido araquidônico (Matsunari et al., 2012; Chey et al., 2017).

A bactéria se adere à mucosa gástrica através da ligação de adesinas e proteínas BabA a antígenos de grupos sanguíneos, sendo um dos principais o Lewis b. A adesão da bactéria acontece devido a um tropismo pelas junções intercelulares, entretanto, a bactéria pode ser vista associada a alterações citoesqueléticas no local da adesão, ou algumas vezes internalizadas em células epiteliais. A sua colonização se dá preferencialmente sobre as células secretoras de muco gástrico e não no interior das glândulas. Não é possível encontrá-la ao nível do esôfago e duodeno, a menos que identifique áreas de metaplasia gástrica. A adesão de *H. pylori* envolve interações moleculares especializadas

com a mucosa gástrica que leva a uma ligação e modificação íntimas da superfície celular e do citoesqueleto subjacente. A interação de adesinas bacterianas com receptores celulares também protege *H. pylori* do peristaltismo e esvaziamento gástrico (Steer, 1984; Noach; Rolf; Tytgat, 1994; Amieva; El-Omar, 2008).

Após estabelecido na mucosa gástrica, *H. pylori* induz um processo inflamatório intenso, induzindo níveis elevados de quimiocinas e citocinas como o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), um dos principais mediadores químicos da inflamação, o qual é responsável pela maioria das lesões associadas à infecção. Além disso, *H. pylori* também sintetiza três importantes enzimas, a superóxido dismutase, catalase e arginase, que são de grande importância na proteção contra a atividade fagocítica de macrófagos e neutrófilos, impedindo uma resposta imunológica eficaz e conseqüentemente sua eliminação (Weeks & Sachs, 2001; Suerbaum & Michetti, 2002).

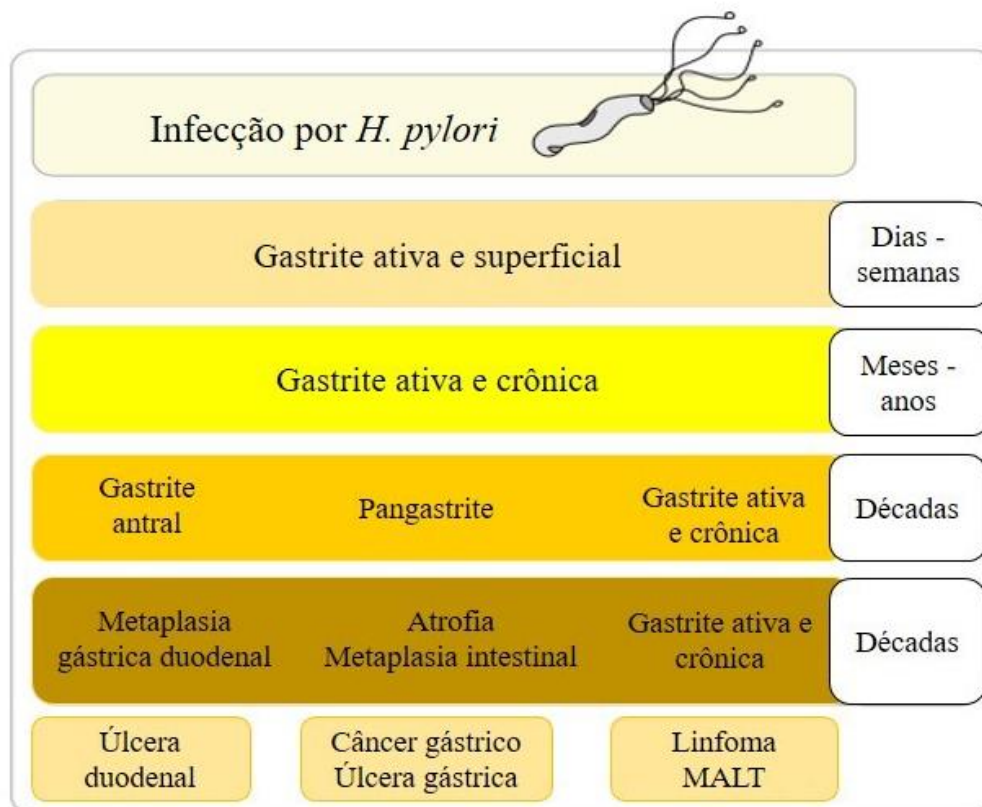
Os danos à mucosa gástrica induzidos por *H. pylori* vão depender da intensidade e do tempo de exposição das células epiteliais ao processo inflamatório. Sabe-se que o estresse oxidativo e nitrosativo induzido pela inflamação, desempenha um papel importante na carcinogênese gástrica, como processo mediador da formação ou ativação de agentes cancerígenos, danos ao DNA e alterações na proliferação celular (Ladeira; Salvadori; Rodrigues, 2003).

## 2.6. Patogênese

A maioria dos indivíduos infectados por *H. pylori*, desenvolvem gastrite superficial nas primeiras semanas de infecção, seguida por uma gastrite crônica ativa que se desenvolve com o passar dos anos. Depois de décadas, os indivíduos infectados podem desenvolver gastrite ou pangastrite antral, dependendo da localização da infecção. A inflamação antral pode levar à metaplasia gástrica, que induz o aparecimento de úlcera duodenal. Este último pode levar a atrofia e metaplasia intestinal, que são considerados fatores predisponentes para o desenvolvimento de câncer gástrico ou úlcera gástrica. Além disso, a gastrite ativa crônica constante pode levar ao crescimento de linfomas do tecido linfoide associado à mucosa (MALT) (**Figura 7**) (Bauer & Meyer, 2011).

A localização da infecção e a formação de gastrite podem ser fatores que influenciam os desfechos clínicos da infecção. Tem sido proposto que a gastrite predominante no corpo gástrico leva a uma menor secreção ácida, causando câncer gástrico, enquanto que, a infecção do antro gástrico aumenta a produção de ácido e

predispõe os indivíduos infectados a desenvolverem úlcera duodenal (Zhang; Zhang; Aboul-Soud, 2017).



**Figura 7.** Progressão das lesões gástricas causadas pela infecção por *H. pylori*. Fonte: adaptado de Bauer & Meyer, 2011.

## 2.7. Principais doenças gástricas e lesões pré cancerígenas

### 2.7.1. Gastrite aguda e gastrite crônica ativa

A gastrite é caracterizada como a inflamação do revestimento do estômago associada a lesão da mucosa gástrica e *H. pylori* é o agente etiológico infeccioso mais comumente associado à essa gastropatia. A duração da inflamação da mucosa pode ser usada para classificar essa condição em gastrite aguda e gastrite ativa crônica (Watari et al., 2014).

A maior parte dos pacientes infectados com *H. pylori* desenvolve gastrite aguda, que na maioria das vezes é assintomática. Neste processo, o período de incubação da bactéria é curto e a infecção está associada ao desenvolvimento de hipocloridria, falha de secreção de ácido ascórbico no suco gástrico e infiltração neutrofílica. Além disso, parece haver um comprometimento relativamente igual, do antro e do corpo gástrico. Nesta

condição os indivíduos desenvolvem sintomas como náuseas, vômitos, dor epigástrica, pirose e flatulência (Burkitt et al., 2017).

A fase aguda é de curta duração manifesta em uma pequena minoria de pessoas, particularmente na infância. O patógeno pode ser eliminado espontaneamente e o infiltrado inflamatório desaparece logo após. Entretanto, na maioria dos indivíduos, a resposta imune falha na eliminação da bactéria e em aproximadamente um mês, há um acúmulo gradual de células inflamatórias crônicas (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) (Sobala et al., 1991).

Na gastrite crônica ativa, a proliferação de linfócitos B e a diferenciação das células plasmáticas na mucosa gástrica, resultam na síntese de anticorpos opsonizantes e fixadores de IgM (imunoglobulina M), que exacerbam a reação inflamatória. No entanto, essa resposta imune também falha na eliminação do patógeno e é necessário o recrutamento de linfócitos B produtores de IgA (imunoglobulina A) dos folículos linfoides. O aumento da produção de anticorpos especializados na proteção de mucosas (IgA), também é insuficiente para erradicar *H. pylori* na maioria dos casos, o que leva à formação de folículos. Essa aquisição de tecido linfóide organizado na mucosa gástrica constitui um tecido linfóide associado à mucosa (Burkitt et al., 2017; Coelho et al., 2018).

### 2.7.2. Úlcera péptica

Uma das principais causas de dispepsia é a úlcera péptica ou também chamada de doença ulcerosa péptica. Essa gastropatia é caracterizada por defeitos da mucosa, com um diâmetro de pelo menos 0,5 cm, penetrando através da mucosa muscular (Kusters; Van-Vliet; Kuipers, 2006). A úlcera péptica pode acometer tanto o estômago como o duodeno, sendo chamada úlcera gástrica e úlcera duodenal, respectivamente. As úlceras gástricas ocorrem principalmente ao longo da menor curvatura do estômago, em particular na transição do corpo para a mucosa do antro. As úlceras duodenais geralmente ocorrem no bulbo duodenal, que é a área mais exposta ao ácido gástrico (Bittencourt et al., 2006; Fashner & Gitu, 2015).

Aproximadamente 95% das úlceras duodenais e 85% das úlceras gástricas, ocorreram na presença da infecção por *H. pylori*. A úlcera péptica induzida pela bactéria, ocorre no contexto de gastrite crônica pré-existente, mas também está associada

ao aumento da secreção de ácido gástrico e a uma resposta imune de perfil Th1 (*Thelper1*)(Burkitt et al., 2017; Kavitt et al., 2019).

### **2.7.3. Atrofia, metaplasia e câncer gástrico**

Alguns indivíduos com gastrite crônica ativa desenvolvem atrofia gástrica, que é caracterizada pela perda de tecido glandular e redução da função secretora gástrica. A diminuição da secreção de ácido gástrico, leva ao aumento do pH intraluminal e diminuição da secreção de somatostatina. Como consequência, ocorre a produção de gastrina, que estimula a secreção ácida das células parietais e a proliferação de células troncos epiteliais, levando ao aumento na renovação celular (Sakagami et al., 1996; Watari et al., 2014).

Indivíduos com atrofia gástrica estabelecida, desenvolvem metaplasia do tipo intestinal, que é definida como a substituição do epitélio gástrico por dois tipos de epitélio intestinal. A metaplasia está sempre associada a alguma estimulação anormal do crescimento e pode ser transitória. Entretanto, a metaplasia intestinal no estômago pode se tornar uma displasia gástrica que aumenta em 10 vezes o risco de desenvolvimento de câncer gástrico ( Liu; Wong; Leung, 2016;).

O câncer gástrico é a segunda principal causa de morte por câncer em todo o mundo. Histologicamente câncer gástrico é dividido em dois tipos : intestinal e difuso ; por outro lado a infecção por *H. pylori* é um fator de risco para o desenvolvimento de ambos (Burkitt et al., 2017).

## **2.8. Genes e fatores de virulência**

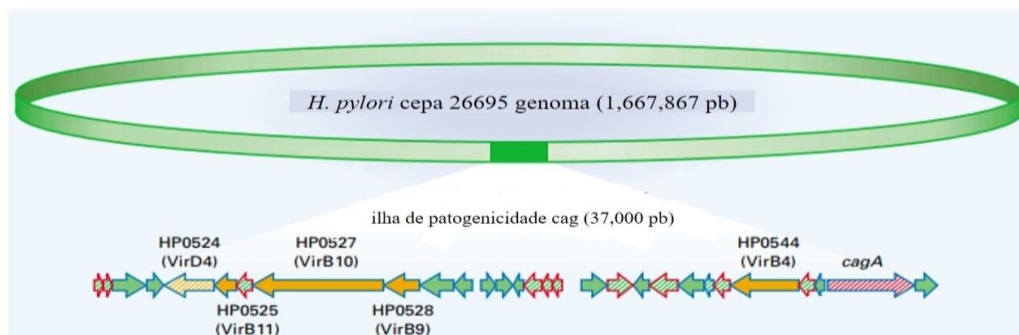
*H. pylori* desempenha um papel essencial no desenvolvimento de várias doenças gastroduodenais. As diferenças geográficas na incidência de distúrbios gastrointestinais podem ser explicadas, em parte, pela presença de diferentes fatores de virulência na cepa infectante. Os fatores de virulência de *H. pylori* podem ser classificados em três categorias: O primeiro grupo pertence a genes específicos que não existem em todas as linhagens de *H. pylori*, como os genes de *cagPAI* e os da ilha de plasticidade (Nagase et al., 2015).

O segundo grupo consiste em genes de fase variável, cujo status genético pode ser alterado durante o crescimento ou sob diferentes condições ambientais e o terceiro grupo consiste em genes com genótipos variáveis. Dentre os diversos fatores de virulência, codificados por estes genes, destacam-se: CagA (*cytotoxin associated gene A*), VacA (*vacuolating cytotoxin*), OipA (*outer inflammatory protein*), SabA (*sialic acid binding adhesin A*), BabA (*blood group antigen-binding adhesin*) e DupA (*duodenal ulcer promoting protein A*) (Alm & Trust, 1999; Yamaoka, 2008).

### 2.8.1. Ilha de patogenicidade do *cag* (*cagPAI*) e CagA

Com base na presença ou ausência do gene *cagA* que codifica a proteína CagA, *H. pylori* pode ser dividida em duas sub-populações principais: cepas *cagA*-positivas e cepas *cagA*-negativas. CagA é um antígeno imunodominante de alto peso molecular, apresentando entre 120-140 kDa e com capacidade de estimular a produção de fatores quimiotáticos, recrutamento de neutrófilos e apoptose no epitélio gástrico do hospedeiro, induzindo um processo inflamatório intenso. Essa proteína vem sendo o fator de virulência de *H. pylori* mais estudado. Em todo o mundo, cepas positivas para *cagA* são responsáveis por aproximadamente 60% das infecções, além disso, foi relatado pela primeira vez em 1995, que a infecção por cepas *cagA*-positivas aumenta o risco de desenvolvimento de câncer gástrico (Bridge & Merrell, 2013; Yamahashi & Hatakeyama, 2013; Nagase et al., 2015; Takahashi-Kanemitsu; Knight; Hatakeyama, 2020).

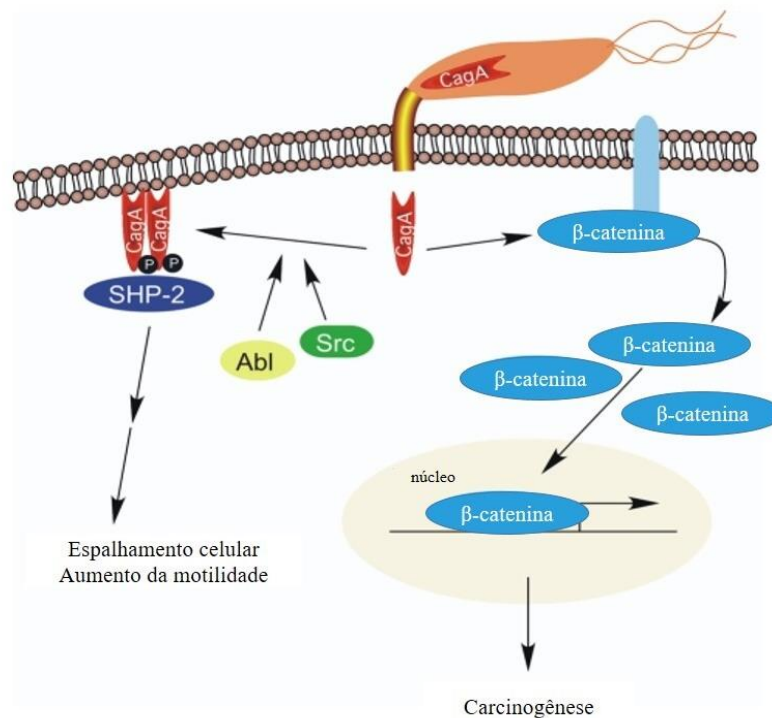
O gene *cagA* é um dos 31 genes que estão localizados em um segmento do DNA genômico de *H. pylori*, denominado ilha de patogenicidade do *cag* (*cagPAI*) (Figura 8) (Suerbaum & Michetti, 2002).



**Figura 8.** Ilha de patogenicidade *cag*.  
Fonte: adaptado de Suerbaum & Michetti, 2002.

Acredita-se que este segmento de DNA de *H. pylori* tenha sido introduzido na bactéria, por transferência horizontal de outro microrganismo desconhecido. Aproximadamente 20 genes encontrados em *cag* PAI codifica componentes do sistema de secreção tipo IV, uma estrutura semelhante a uma seringa que é capaz de translocar CagA para o citoplasma das células epiteliais gástricas do hospedeiro. A translocação de CagA é alcançada através de uma interação específica entre adesinas de superfície das bactérias e receptores para o componente bacteriano nas células hospedeiras (Takahashi-Kanemitsu; Knight; Hatakeyama, 2020).

Dentro da célula hospedeira, a proteína CagA é fosforilada pelas tirosinas quinases Src e Abl e ativa uma fosfatase eucariótica (SHP-2), levando a alterações morfológicas que lembram estímulos irrestritos por fatores de crescimento (**Figura 9**)(Peek-Jr, 2008).

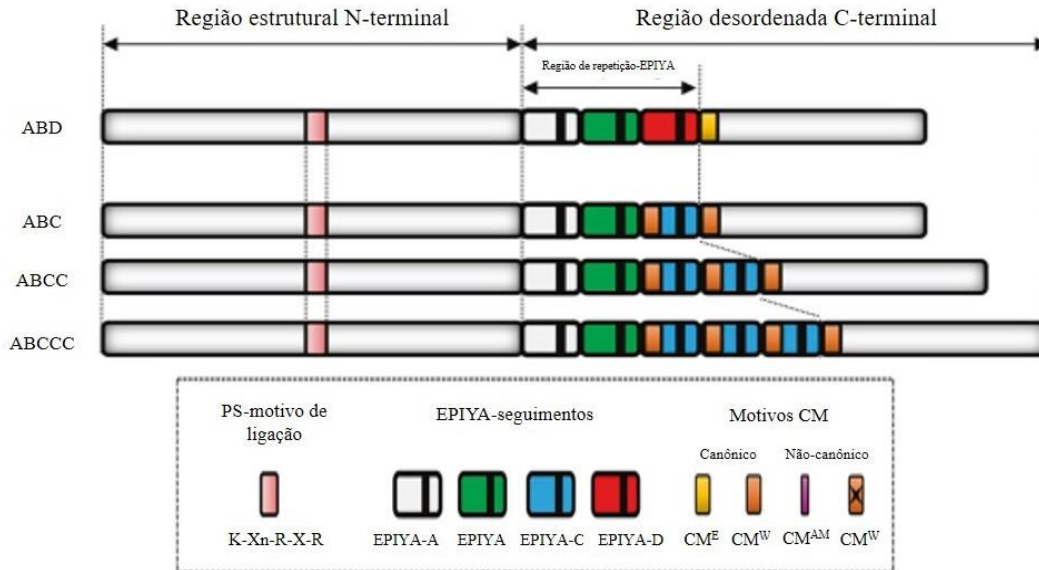


**Figura 9.** Alterações induzidas pela translocação de CagA de para dentro da célula hospedeira.

Fonte: adaptado de Fonte: Adaptado de Peek-Jr, 2008.

Essa fosforilação acontece especificamente nos motivos presentes na região c-terminal da proteína, chamado de motivo EPIYA. Quatro segmentos EPIYA distintos foram identificados na proteína CagA: EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C e EPIYA-D (**Figura 10**). Os segmentos EPIYA distintos, são fosforilados seletivamente por diferentes tirosina quinases, sendo que Src fosforila especificamente os segmentos

EPIYA-C e EPIYA-D, enquanto a Abl fosforila todos outros segmentos. Foi demonstrado que o motivo EPIYA presente na cepa infetante e o status de fosforilação desses motivos, influenciam fortemente na atividade patobiológica da proteína CagA (Yong et al., 2015; Zhang; Zhang; Aboul-Soud, 2017; Takahashi-Kanemitsu; Knight; Hatakeyama, 2020).



**Figura 10.** Diferentes motivos EPIYA em CagA.

Fonte: adaptado de Takahashi-Kanemitsu, Knight, Hatakeyama, 2020.

Mesmo não fosforilada, CagA tem efeitos patogênicos, causando ativação aberrante da  $\beta$ -catenina, perturbação dos complexos apical-juncional e uma perda de polaridade celular, levando a uma regulação positiva transcricional dos genes implicados na carcinogênese (**Figura 9**). Além disso, quando não fosforilada, CagA também tem como alvo a caderina-E, o fator de crescimento de hepatócitos, a proteína adaptadora Grb2 e outros componentes que levam a respostas pró-inflamatórias, interrupção das junções célula-célula e perda de polaridade celular (Bauer & Meyer, 2011; Hansen et al., 2020).

A patogênese da infecção por *H. pylori* está fortemente associada à presença de *cagPAI* na cepa infectante. Apesar de todas as cepas dessa bactéria poderem causar gastrite, cepas que contêm a região *cagPAI*, aumentam o risco de desenvolvimento de gastrite atrófica e câncer gástrico (Camilo; Sugiyama; Touati, 2017).

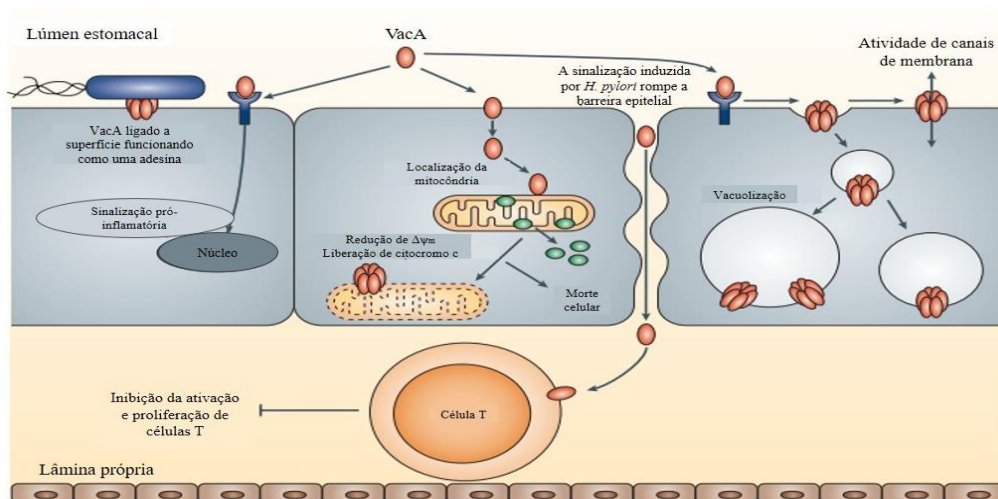
Outro importante gene, o *cagE*, também localizado na região *cagPAI*, é responsável por codificar uma proteína localizada na membrana interna da bactéria, que

tem propriedade ATPase. Esta proteína fornece energia para a síntese do sistema de transporte de substâncias na bactéria e parece estar envolvida no aumento da expressão de interleucina 8 (IL-8) em células epiteliais gástricas (Sozzi et al., 2005; Kutter et al., 2008).

### 2.8.2. VacA

O gene *vacA* foi descoberto em 1988 e está presente em todas as cepas de *H. pylori*. O gene *vacA* é responsável por codificar a citotoxina vacuolizante A (VacA) que tem como principal papel a indução de vacúolos nas células epiteliais (McClain; Beckett; Cover, 2017).

VacA liga-se em receptores de superfície celular nas células epiteliais e é internalizada, iniciando uma resposta pró-inflamatória. Essa citotoxina também pode ser absorvida diretamente pela célula, ser transportada para as mitocôndrias e induzir apoptose através da liberação do citocromo c. VacA também pode ser absorvida por pinocitose e induzir vacuolização, levando à apoptose e alteração nas vias de sinalização celular. A presença de *H. pylori* no tecido gástrico causa alterações nas junções celulares, permitindo que VacA passe pelas células epiteliais, causando a inibição da translocação do fator nuclear de células T ativadas, induzindo regulação negativa da transcrição do gene da IL-2 e inibindo a proliferação dessas células. Além disso, VacA pode também induzir a formação de canais de membrana, resultando em vazamento de nutrientes para o espaço extracelular (**Figura 11**) (Kim & Blanke, 2012; Matsunari et al., 2012; Chauhan et al., 2019).

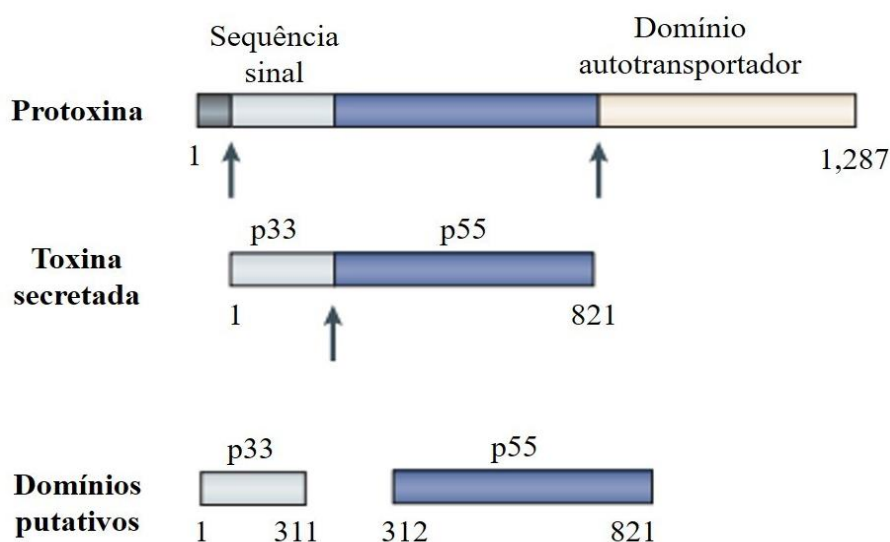


**Figura 11.** Alterações celulares na célula hospedeira causadas por VacA de *H. pylori*.

Fonte: adaptado de Palframan, Kwok, Gabriel, 2012.

VacA é uma proteína formadora de poros que é inicialmente expressa como uma pró-toxina de 140 kDa, composta por uma região chamada de sinal, um domínio passageiro e um domínio de autotransporte que funciona como um sistema de secreção do tipo IV. A região sinal permite a passagem da pró-toxina através da membrana interna bacteriana. Após a passagem pela membrana interna bacteriana, o domínio passageiro é processado e clivado em algum momento, durante o trânsito para o meio extracelular, gerando a forma ativa da toxina. Essa forma, com aproximadamente 88 kDa possui dois domínios, um de 33 kDa e outro de 55 kDa, denominados respectivamente p33 e p55 (**Figura 12**) (Cover & Blanke, 2005).

Esses domínios gerados podem ser translocados através da membrana externa bacteriana, em seguida, podem ser liberados no espaço extracelular como proteínas solúveis ou podem ficar retidos na superfície bacteriana. O domínio p33 da proteína é responsável pela formação de poros nas células do hospedeiro e o domínio p55 pela ligação celular (Palframan; Kwok; Gabriel, 2012; Bridge & Merrell, 2013).

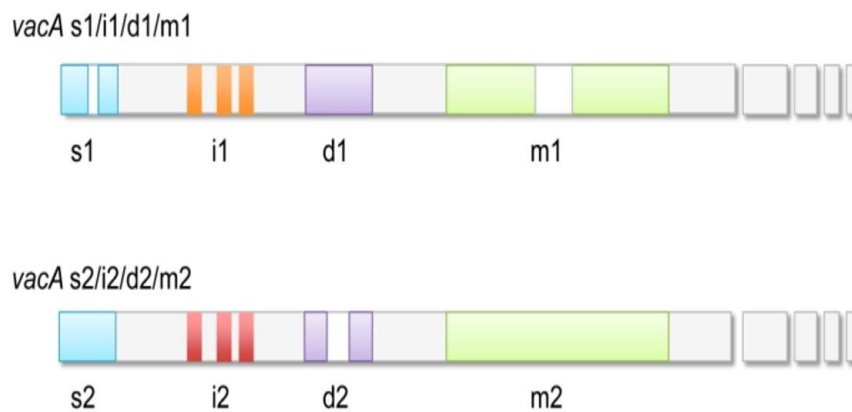


**Figura 12.:** Estrutura da proteína VacA de *H. pylori*.

Fonte: adaptado de Cover & Blanke, 2005.

Embora a espécie *H. pylori* apresente um gene funcional, há uma variação considerável na atividade vacuolizante entre as diferentes cepas dessa espécie. Essa variação é dada por mutações *nonsense* no gene *vacA*, gerando diferentes alelos. Estes alelos foram categorizados com base na heterogeneidade de sequência em regiões

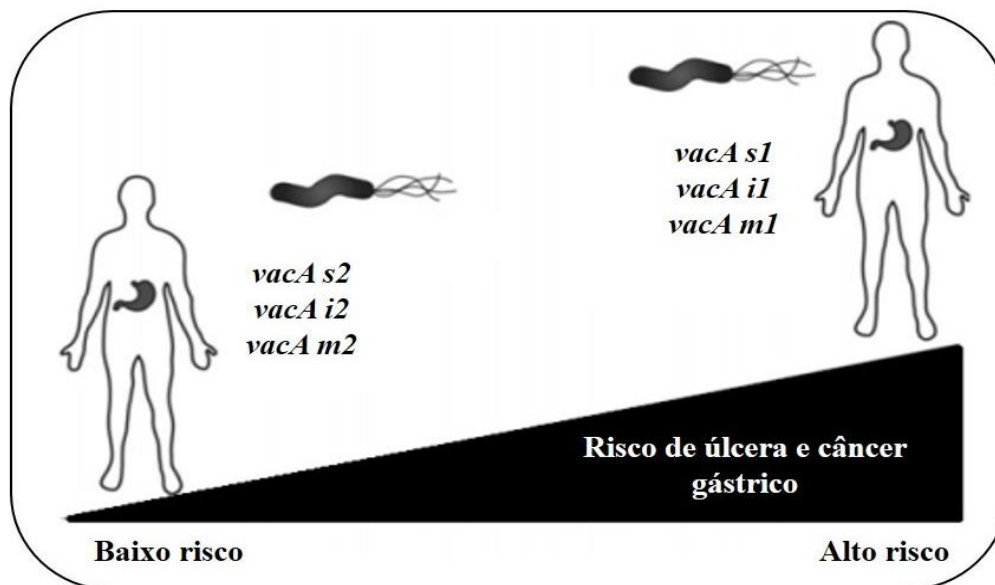
específicas: região sinal (s), intermediária (i), região central (m) e região d. As sequências em cada uma dessas regiões podem ser subclassificadas em s1 e s2; i1 e i2; m1 e m2; d1 e d2 (**Figura 13**). A região d é estratificada através da presença ou ausência de um segmento com cerca de 60 a 100 nucleotídeos de comprimento, que codifica uma região da proteína localizada na junção dos domínios p33 e p55 (Yahiro et al., 2016; McClain et al., 2017).



**Figura 13.** Estrutura gênica e diferentes alelos do gene *vacA*.

Fonte: adaptado de Suzuki RB et al, 2013.

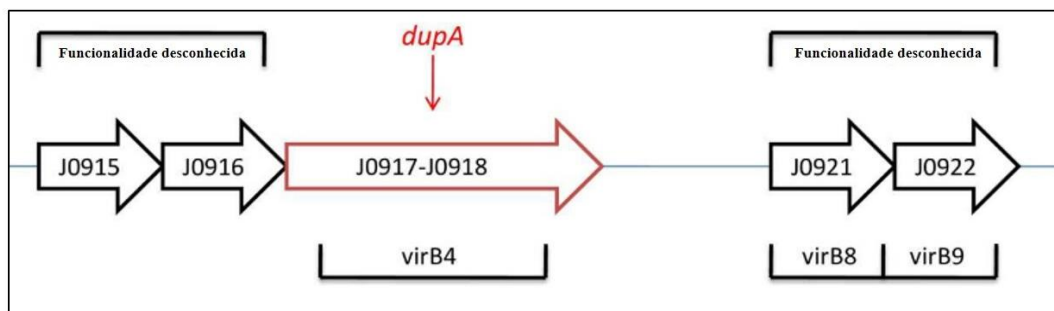
Estudos epidemiológicos têm demonstrado que cepas que contêm alelos *vacA* do tipo s1 estão associadas a um risco aumentado de desenvolvimento de úlcera péptica e câncer gástrico em comparação com cepas contendo alelos do tipo s2. Além disso, cepas contendo o alelo do tipo m1 estão associadas ao risco aumentado de desenvolvimento de lesão epitelial gástrica e câncer gástrico em comparação com cepas contendo alelos m2. O alelo *vacA* i1 também está associado ao aumento da atividade citotóxica em comparação com o *vacA* i2 (**Figura 14**) (Foegeding et al., 2016; Yahiro et al., 2016).



**Figura 14.** Risco de úlcera péptica e câncer gástrico de acordo com o status de *vacA*.  
 Fonte: adaptado de Abadi, 2017.

### 2.8.3. DupA

Pela primeira vez em 2005, Lu et al. descreveram um novo fator de virulência localizado na região de plasticidade do genoma de *H. pylori*, chamado de gene promotor da úlcera duodenal (*dupA*), o qual é homólogo ao gene *virB*, responsável por codificar uma proteína do sistema de secreção do tipo IV em *Agrobacterium tumefaciens*. O gene *dupA* é composto por dois genes, presentes na ilha de plasticidade do genoma de *H. pylori*: *jhp0917* e *jhp0918*, sendo que em cepas J99 de *H. pylori* o gene *jhp0917* é uma ORF (*open reading frame*), com 1428 pb da parte final 5' do gene *virB4*, enquanto o gene *jhp0918* é uma ORF com 423 pb da parte final 3' final do gene *virB4*. Devido à sua alta homologia com o fator *virB4*, o *dupA* presumivelmente forma um sistema de secreção do tipo IV juntamente com os genes *vir*, embora suas funções exatas ainda não sejam totalmente compreendidas (**Figura 15**) (Lu et al., 2005; Šterbenc et al., 2019).



**Figura 15.** Genes de *H. pylori* presentes na ilha de plasticidade, responsável por codificar sistema de secreção do tipo IV, em cepas J99.

Fonte: adaptado de Liu et al., 2014.

Lu et al (2005), também relataram que a infecção por cepas *dupA* positivas, aumentam o risco de úlcera duodenal e são protetores contra atrofia gástrica, metaplasia intestinal e câncer gástrico. Portanto, esse gene, foi considerado o primeiro fator de virulência doença-específico. Entretanto, semelhante aos outros genes de virulência a sua relação com doenças variam muito de acordo com a população e região estudada (Liu et al., 2014).

O mecanismo de patogenicidade de DupA (proteína A promotora de úlcera duodenal), codificada pelo gene *dupA*, ainda não está bem evidenciado, mas parece estar envolvida principalmente na indução da produção de interleucina-8 (IL-8) pelo epitélio gástrico e com a absorção de DNA durante a transferência de material genético. Cepas portadoras do gene *dupA*, parecem ser mais resistentes a acidez estomacal, explicando em partes a associação deste gene com o desenvolvimento de úlceras. Além disso, o aumento da secreção de IL-8 no antro gástrico leva ao desenvolvimento de gastrite predominantemente antral, uma característica bem conhecida da doença da úlcera duodenal (Lu et al., 2005; Liu et al., 2014).

Alguns estudos demonstraram a presença de duas mutações no gene *dupA*, sendo uma deleção de uma adenina na posição 1311 e uma inserção de outra adenina na posição 1426. Essas mutações foram mais frequentemente encontradas em cepas de *H. pylori* isoladas de pacientes com câncer gástrico, indicando a possibilidade de existirdiferentes alelos de *dupA*(Abadi, 2017).

#### 2.8.4. OipA

Identificado em 2000, o gene *oipA*, também conhecido como *HP0638*, codifica uma proteína da membrana externa de *H. pylori*, chamada de proteína inflamatória externa (OipA). Esse fator de virulência é regulado por um “interruptor” conhecido como “*slipped strand mispairing*”, que é determinado pela alteração no número de repetições de dinucleotídeos CT na região 5’ do gene e dependendo da alteração desses números, o gene pode estar “ligado” (*oipA* funcional) e “desligado” (*oipA* não funcional) (Yamaoka; Kwon; Graham, 2000).

*OipA* induz uma intensa resposta pró-inflamatória, através da ativação da via NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B), relevante na indução da secreção de Interleucina 8 de células epiteliais gástricas, além de atuar na fosforilação de diversas vias de sinalização (**Figura 16**) (Yamaoka; Kwon; Graham, 2000; Israel & Peek, 2010; Liu et al., 2013).

Quando presente, o gene *oipA* é considerado o melhor marcador de diagnóstico clínico. A Ilha de patogenicidade *cag* e o status *oipA* funcional, parece estar relacionado com a presença do marcador *babA* e com diferentes alelos do gene *vacA* (Matsunari et al., 2012).

#### 2.8.5. SabA

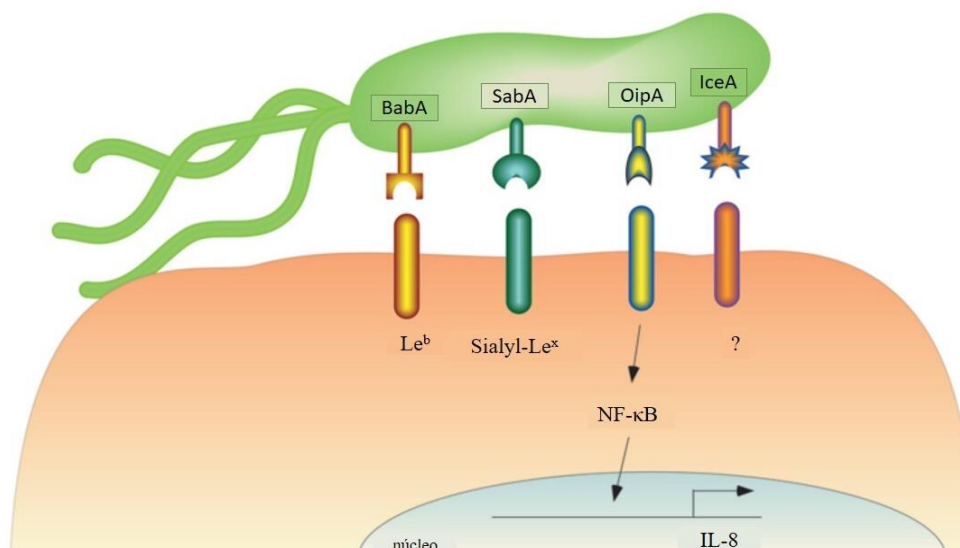
*H. pylori* apresenta uma ampla gama de componentes de adesão e para uma infecção bem sucedida, a ligação da bactéria ao tecido é fundamental. O gene *sabA* codifica uma proteína da membrana externa da bactéria, chamada de adesina de ligação ao ácido siálico (SabA), um dos fatores de virulência que possui um papel crítico na colonização inicial, visto que estabelecendo uma infecção persistente e uma inflamação crônica, gerando danos ao tecido gástrico. Essa adesina tem a capacidade de se ligar a resíduos de ácido siálico adicionados ao antígeno Lewis-x, presente nas células epiteliais gástricas do hospedeiro (**Figura 16**). A infecção por *H. pylori*, promove um aumento na expressão desse antígeno no tecido gástrico e conseqüentemente, um pior prognóstico ao indivíduo infectado (Pakbaz et al., 2013; Alzahrani et al., 2014; Pang et al., 2014).

O gene *sabA* pode se ligar á carboidratos e á granulócitos, promovendo um evento oxidativo nas células e a hemaglutinação quando se liga a estruturas expressas nos eritrócitos. Sabe-se que, variações nas propriedades de ligação de *SabA*, podem permitir tropismo da bactéria em áreas do tecido inflamado, isso ocorre porque a inflamação

resulta em alterações das glicoproteínas da mucosa. A adesina SabA parece contribuir diretamente para a virulência de *H. pylori*, facilitando a persistência da bactéria na mucosa gástrica (Aspholm et al., 2006; Harvey et al., 2014; Kalali et al., 2014).

### 2.8.6. BabA e IceA

O gene *babA* (*blood group antigen*) possui três alelos: *babA1*, *babA2* e *babA3*, entretanto, apenas o produto do gene *babA2* é considerado funcionalmente ativo, pelo fato de ser o único capaz de codificar a adesina BabA. Esta por sua vez é capaz de se ligar ao antígeno Lewis-b, facilitando a aderência da bactéria ao epitélio gástrico (**figura 16**). Esse gene é um dos mediadores responsáveis pela aderência de *H. pylori* a células gástricas e apesar de ser bastante relevante, tem pequena propensão de induzir câncer gástrico. Além disso, a proteína BabA parece induzir a liberação dos fatores de virulência *cagA* e *vacA*. O gene *iceA*, também possui dois alelos distintos, *iceA1* e *iceA2*. A função deste gene ainda não está bem esclarecida (**Figura 16**), entretanto, parece ter associação com úlcera péptica e câncer gástrico (Pride; Meinersmann; Blaser, 2001; Höcker&Hohenberger, 2003; Ko et al., 2008).



**Figura 16.**Atividade dos fatores de virulência BabA, SabA, OipA e IceA.

Fonte: adaptado de Israel & Peek, 2013.

## **2.9. Diagnóstico da infecção por *H. pylori***

O diagnóstico da infecção por *H. pylori* pode ser realizado através de métodos invasivos ou diretos, que requer a retirada de biópsia gástrica por endoscopia e métodos não invasivos ou indiretos, que não necessitam de biópsia. Dentre os não invasivos, destacam-se o teste respiratório da ureia marcada, antígeno-fecal e testes sorológicos. Entre os diagnósticos invasivos estão o teste rápido da urease, histológico, cultura e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) através de biópsia (Wang et al., 2015).

### **2.9.1. Métodos invasivos**

O teste rápido da urease (RUT) é químico, trata-se de um teste rápido, barato e de fácil execução. Esse método consiste na introdução de fragmentos da mucosa gástrica em um meio contendo ureia e um indicador de pH, como por exemplo, o vermelho de fenol. A urease produzida previamente por *H. pylori*, hidrolisa a ureia presente no meio e a transforma em amônia. Esse processo altera o pH do meio, que muda de cor, indicando um resultado positivo. A densidade de bactérias presentes no espécime de biópsia afeta o tempo de reação e a precisão do diagnóstico por meio de RUT, sendo necessário o mínimo de 10.000 microrganismos para um resultado positivo. Outros fatores como o uso de antagonistas dos receptores histamina, inibidores da bomba de prótons, compostos de bismuto, antibióticos e presença de sangue, influenciam diretamente na precisão do diagnóstico por essa técnica. Além disso, a contaminação das amostras com formalina de biópsia, também diminuem a sensibilidade do teste (Lopes; Vale; Oleastro, 2014; Peng et al., 2019).

No Brasil o diagnóstico histológico é considerado o teste invasivo padrão ouro na detecção da infecção por *H. pylori*. Entretanto, vários fatores influenciam a precisão do método, como local, tamanho e número de biópsias, métodos de coloração, uso de inibidor da bomba de prótons e antibióticos, além da experiência do patologista. A técnica histológica é realizada obtendo-se dois ou mais fragmentos da região do corpo e porção do antro gástrico para a confecção do corte, que serão processados e corados por hematoxilina-eosina ou Giemsa. A principal vantagem do teste histológico reside no fato de que, além de informação sobre a presença da bactéria, esse método fornece dados sobre o estado da mucosa gástrica, principalmente mudanças morfológicas associadas à infecção (Arismendi-Morillo et al., 2011; Wang et al., 2015).

O cultivo de *H. pylori* a partir de espécime de biópsia gástrica é um método altamente específico, mas menos sensível. Em geral, a cultura tem quase 100% de especificidade, mas a sensibilidade da cultura mostra variação significativa, entre 85% e 95%. Isso se deve a natureza fastidiosa de *H. pylori*, que requer meio de transporte, meio de crescimento e ambiente de incubação específico. O meio de cultura deve ser seletivo e suplementando com sangue de carneiro, que é fundamental para o crescimento do microrganismo. As placas devem ser incubadas em temperatura de 37°C em condições de microaerófila e deve conter antibióticos e antifúngicos. A cultura não é utilizada rotineiramente para o diagnóstico, mas é útil para avaliar a sensibilidade da bactéria aos antibióticos, especialmente em falhas na erradicação (Wang et al., 2015; Adu-Aryee et al., 2016).

A PCR consiste em um teste molecular enzimático, com alta sensibilidade, permite amplificar fragmentos específicos do material genético bacteriano. Tem sido utilizada extensivamente no diagnóstico de *H. pylori*, tanto em amostras de biópsias gástricas, saliva, fezes, suco gástrico entre outras amostras biológicas. A PCR a partir de biópsias gástricas, oferece sensibilidade e especificidade superior a 95% e tem mais precisão na detecção de *H. pylori* em pacientes com sangramento, em comparação com outros testes convencionais. A PCR pode ser usada em várias amostras biológicas e vários genes constitutivos como *ureA*, *glmM*, *ureC* e ácido ribonucléico ribossomal (rRNA) 16S (*hpx*) têm sido alvos para a detecção da bactéria. As vantagens da PCR são inúmeras, entre elas estão: a possibilidade de genotipagem de amostras para identificar diferentes cepas; o uso de materiais retrospectivos em pesquisa, que é de grande relevância para evitar a necessidade de repetir o procedimento invasivo; a detecção em amostras que contenham pequena densidade bacteriana, além de permitir a amplificação de genes envolvidos na resistência a antibióticos (Wang et al., 2015; Bazin et al., 2018).

### **2.9.2. Métodos não invasivos**

O teste respiratório da ureia marcada, é altamente sensível e específico, considerado o teste padrão-ouro dentre os métodos não invasivos. Durante o procedimento, o paciente ingere uma cápsula contendo 50mg de ureia marcada com C<sup>13</sup> ou C<sup>14</sup>. Na presença de urease bacteriana, a ureia é hidrolisada e o carbono dióxido, proveniente desta molécula, é detectado nas amostras expiratórias. Esse teste é altamente preciso e reproduzível, apresenta sensibilidade e especificidade próximos a 95%. Essa

metodologia é útil para estudos epidemiológicos e para avaliar a eficácia da terapia de erradicação. Para a realização do procedimento, o paciente deve interromper o uso de IBP (inibidor de bomba de prótons) por duas semanas e interromper o uso de antibiótico por quatro semanas, com a finalidade de evitar resultados falsos negativos. Neste método o sangramento gástrico também influencia na precisão do diagnóstico (Wang et al., 2015; Coelho et al., 2019).

O teste de antígeno fecal, tem sido o principal método não invasivo para controle de cura da infecção, é baseado em imunoensaio enzimático ou em ensaio imunocromatográfico, utilizando anticorpos policlonais ou monoclonais, que se ligam a antígenos da bactéria presente nas fezes. Esse método apresenta sensibilidade e especificidade entre 94% e 97%, respectivamente (Garza-González et al., 2014).

O teste sorológico pode ser realizado em sangue total, soro ou saliva e seu princípio baseia-se em detectar anticorpos anti-*H. pylori*. Esses testes têm sido frequentemente utilizados na triagem de estudos epidemiológicos devido ao seu baixo custo, rápida execução e grande aceitação por parte dos pacientes. A precisão dos testes sorológicos depende do antígeno usado no kit comercial. Várias proteínas imunogênicas, como CagA, VacA e UreA, são usadas para detectar os anticorpos. A proteína FliD, um componente na montagem dos flagelos funcionais, também é reconhecido como um novo marcador aplicado no diagnóstico sorológico, que apresenta sensibilidade e especificidade entre 97% e 99%, respectivamente (Kalali; Formichella; Gerhard, 2015; Wang et al., 2015).

## **2.10. Tratamento e resistência a antibióticos**

O tratamento da infecção por *H. pylori* é realizado por uma combinação de agentes antimicrobianos e antissecretores, IBP são os principais. A elevação do pH gástrico por agentes antissecretores é necessária para o efeito bactericida dos agentes antimicrobianos (Wannmacher, 2009; Yang & Lu-Lin, 2014).

A terapia de combate ao *H. pylori*, tem sido um desafio para a medicina, desde a sua descoberta na década de 80. A OMS emitiu em 2017, um relatório dos patógenos resistentes a antibióticos, que são considerados prioritários para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas. Segundo o relatório, *H. pylori* ocupa a quinta posição da lista de prioridade alta (Malfertheiner et al., 2012).

O esquema triplo foi utilizado por muito tempo como recomendação universal para tratar a infecção por *H. pylori*. Ele é realizado utilizando a associação de dois antibióticos (claritromicina ou metronidazol e amoxicilina) e um IBP. A intensa e ampla utilização de antibióticos no tratamento para eliminação do *H. pylori*, contribuiu para o aumento da prevalência de cepas resistente a estes fármacos, principalmente o antimicrobiano claritromicina; levando a uma diminuição drástica da eficiência da terapia tripla (Ables; Simon; Melton, 2007; Coelho et al., 2018).

A claritromicina é um antibiótico macrolídico, exerce efeito antibacteriano, impedindo a transpeptidação e as reações de translocação, consequentemente inibindo a síntese de proteínas bacterianas; é o antibiótico mais utilizado no tratamento da infecção por *H. pylori*. Como descrito anteriormente, a resistência antimicrobiana tem aumentado de forma inversamente proporcional a erradicação do patógeno. Diante deste cenário, houve a introdução das fluoroquinolonas, um bactericida sintético, como substituto alternativo aos antibióticos usados no tratamento da infecção por *H. pylori*. O modo de ação das fluoroquinolonas é por inativação da DNA girase e da enzima topoisomerase, que controlam o DNA nas células e interferem na replicação do DNA bacteriano. Entretanto, também foram relatadas taxas de falhas terapêuticas devido ao surgimento de resistência bacteriana (Ables; Simon; Melton, 2007; Sachs & Scott, 2012).

Levando em consideração o aumento da ineficácia da terapia de primeira linha, houve a necessidade do desenvolvimento de outras terapias, de segunda linha. A terapia sequencial implantada pela primeira vez em 2000 na Itália, consiste em um tratamento de 10 dias, utilizando-se um IBP associado com amoxicilina por cinco dias e posteriormente a associação de um IBP com claritromicina e metronidazol por mais cinco dias. A terapia concomitante ou quádrupla sem bismuto, é realizada associando o IBP, a claritromicina, a amoxicilina e o metronidazol, ingeridos simultaneamente durante 10 dias (Coelho et al., 2018).

Outra opção de tratamento é o esquema terapêutico quádruplo com compostos de bismuto, que consiste na utilização de um IBP e sais de bismuto, associados com metronidazol e tetraciclina durante 10 a 14 dias. Este regime tem a vantagem de utilizar compostos que apresentam taxas raras de resistência, como é o caso da tetraciclina. Outra proposta é a terapia híbrida ou sequencial-concomitante, realizada em duas etapas, a primeira etapa é o tratamento com um IBP e amoxicilina durante sete dias, seguido pelo IBP associado á amoxicilina, metronidazol e claritromicina, durante mais sete dias (Sachs & Scott, 2012; Garza-González et al., 2014).

### 3. Justificativa

---

A infecção por *H. pylori* é cosmopolita, considerada um dos maiores problemas de saúde pública. Os índices de prevalência da bactéria são mais altos em países em desenvolvimento, justificado pela precariedade do saneamento básico e condições de higiene da população. *H. pylori* é o agente etiológico de diversas doenças gástricas, como: gastrite crônica, úlcera péptica e outras. Além disso, a infecção por *H. pylori* é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico, sendo este microrganismo classificado pela OMS como um carcinógeno do tipo I.

*H. pylori* possui um alto grau de diversidade genotípica e essa diversidade é determinante para o resultado da interação entre a bactéria e o hospedeiro. Os fatores de virulência codificados por diversos genes são importantes para a o estabelecimento e progressão da infecção. Apesar de nos últimos anos, vários fatores de virulência bacterianos serem sugeridos como marcadores para doenças digestivas, ainda há uma carência de informações relacionadas à presença de biomarcadores associados às condições clínicas em indivíduos infectados, especialmente no estado de Goiás. Portanto, a busca por biomarcadores preditivos para uma condição clínica, é uma área promissora da medicina personalizada.

Ao considerar a relevância deste microrganismo na etiologia de doenças gastroduodenais, é de suma importância a utilização de testes moleculares para a detecção e monitoramento de genes de virulência, permitindo maiores esclarecimentos sobre os mecanismos envolvidos na relação parasito-hospedeiro. O estudo molecular e epidemiológico do *H. pylori*, pode contribuir para a elaboração de novas formas de prevenção e/ou tratamento, evitando a crescente prevalência da infecção e consequentemente o alto índice de doenças gástricas na população brasileira.

## 4. Objetivos

---

### 4.1. Objetivo Geral

Caracterizar genotipicamente os fatores de virulência *do H. pylori* e correlacioná-los com a severidade das patologias gástricas.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Estimar a prevalência de *H. pylori* no estado de Goiás;
- Comparar o teste histopatológico e molecular na detecção de *H. pylori*;
- Caracterizar genotipicamente os fatores de virulência: *vacA*, *cagA* e *dupA*;
- Correlacionar os fatores de virulência com as patologias gástricas;
- Realizar estudos filogenéticos com amostras já caracterizadas em outros locais;

## 5. Metodologia

---

### 5.1. Considerações éticas e amostras

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, sob parecer no. 2.519.032 (CAEE: 83422017.7.0000.5078). Um total de 117 pacientes dispépticos maiores de 18 anos, submetidos à endoscopia digestiva alta, no período de janeiro a dezembro de 2018 foram incluídos neste estudo. O termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os pacientes que concordaram em participar do estudo. Os pacientes que usaram inibidores da bomba de prótons em duas semanas; bloqueador de receptores de histamina-2 na última semana; pacientes que usaram imunossuppressores ou antibióticos nas últimas oito semanas; pacientes com sangramento gastrointestinal ativo, pacientes grávidas, lactantes ou aqueles que não puderam ser submetidos à endoscopia foram excluídos do estudo.

As amostras gástricas foram obtidas de acordo com as recomendações da IV Consenso Brasileiro sobre a infecção por *Helicobacter pylori* (Coelho et al., 2018). De cada paciente, foram obtidos dois fragmentos do antro e dois do corpo gástrico. As amostras foram enviadas ao laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário para análise histopatológica e ao Núcleo de Estudo da *Helicobacter pylori*, localizado na Universidade Federal de Goiás (NEHP / UFG) para análise molecular. Os fragmentos utilizados para o diagnóstico molecular foram armazenados em freezer a -20, em tubos plásticos de 1,5 mL, secos, estéreis e identificados.

### 5.2. Extração do DNA das biópsias

A extração do DNA foi realizada segundo o protocolo de extração de DNA fornecido pelo KitQIAamp DNA minikit® (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos). O tubo plástico contendo o tecido foi retirado do freezer (-20 °C) e colocado no refrigerador (-5 °C) para se evitar o choque térmico. Em seguida foi adicionado 180 µL de tampão ATL (*Tissue Lysis Buffer* - tampão de lise tecidual) para que o tecido fosse manuseado em temperatura ambiente. Após isso, todo o conteúdo foi transferido para outro tubo de 2 mL e o tecido foi macerado, utilizando bastão de vidro estéril. Foram acrescentados 20

$\mu\text{L}$  de proteinase K e agitado manualmente. O tubo permaneceu incubado em banho-maria a  $56^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 3 horas e agitado gentilmente a cada hora.

Posteriormente, o tubo foi rapidamente centrifugado e adicionado  $200\mu\text{L}$  de tampão (*Lysis Buffer* - tampão de lise), o mesmo foi agitado por 15 segundos e em seguida incubado a  $70^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos para inativação da proteinase residual. Em seguida foi acrescentado  $500\mu\text{L}$  de etanol absoluto e agitado por 15 segundos. O tubo foi centrifugado rapidamente e a solução resultante foi transferida para o dispositivo da coluna QIamp DNA minikit<sup>®</sup>, a qual estava dentro de um tubo de 2 mL (disponível no Kit). A amostra foi centrifugada a  $6000 \times g$  (8000 rpm) durante um minuto e o tubo contendo o filtrado foi descartado e substituído por um tubo limpo e adicionado a coluna  $500\mu\text{L}$  de tampão de lavagem AW1 (*Wash Buffer 1* - tampão de lavagem 1) e novamente centrifugado a  $6000 \times g$  (8000 rpm) por 1 minuto.

O procedimento de lavagem foi repetido com  $500\mu\text{L}$  do tampão AW2 (*Wash Buffer 2* - tampão de lavagem 2), seguido de centrifugação em velocidade de  $20000 \times g$  (14.000 rpm) por três minutos. O filtrado foi descartado e o tubo foi reutilizado para uma nova centrifugação à velocidade máxima por um minuto, o tubo contendo o filtrado foi descartado e colocado um tubo limpo de 1,5mL.

O DNA extraído na coluna foi eluído pela adição de  $200 \mu\text{L}$  de tampão ATE (*Elution Buffer* - tampão de eluição) no centro da coluna e incubado por um minuto à temperatura ambiente, em seguida foi centrifugado a  $6000 \times g$  (8000 rpm) por um minuto e a coluna descartada. Uma alíquota de  $10 \mu\text{L}$  da amostra foi retirada para a quantificação e análise de pureza do DNA genômico, através da determinação da densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 UV-Vis).

### **5.3. Amplificação de DNA genômico de *H. pylori* por PCR**

A reação de PCR foi utilizada para identificar a presença de *H. pylori*, por meio da amplificação de um fragmento do gene ribossômico 16S (rRNA). Amostras positivas para *H. pylori* foram manipuladas para a identificação dos genes *vacA*, *cagA*, *dupA*.

A amplificação foi realizada no termociclador Amplitherm<sup>®</sup>, cada reação foi padronizada como a seguir:  $0,5\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (2,5 unidades),  $5\mu\text{L}$  de tampão de PCR CoralLoad 10X (QIamp, Qiagen) já contendo  $\text{MgCl}_2$  (1,5mM),  $2\mu\text{L}$  de dNTP (2,5mM) (desoxirribonucleotídeo 5'-trifosfatado – dATP, dCTP, dGTP, dTTP,  $2 \mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeos (10 pmol cada) e  $33,5 \mu\text{L}$  de água miliQ. Após a mistura,

foram adicionados 5 µL do DNA de cada amostra (50ng no volume final), totalizando volume final de 50µL. Foi utilizado um controle positivo de DNA de *H. pylori* gentilmente cedido pelo pesquisador Dr. Lucas Trevizani Rasmussen da Universidade do Sagrado Coração, Bauru, SP, Brasil. Foi adicionado também controle negativo da reação, onde o DNA foi substituído por amostra de água.

Os oligonucleotídeos específicos para cada gene, as condições de cada reação, a amplificação e o tamanho dos fragmentos obtidos, estão descritos na (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Sequência de iniciadores utilizados para a identificação de *H. pylori*, *vacA*, *cagA* e *dupA*, condições de amplificação e tamanho do fragmento.

Gene	Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')	Condições de amplificação	pb
<b>16S rRNA</b>	<i>hpx1</i>	CTGGAGARACTAAGYCCTCC	94°C, 1 min; 59°C, 1 min; 72°C, 1 min (40 ciclos)	150
	<i>hpx2</i>	GAGGAATACTCATTGCGAAGGCGA		
<b>vacA</b>	SA	ATGGAATACAACAAACACAC	94°C, 45 s; 54°C, 45 s; 72°C, 45 s (35 ciclos)	286
	SCa	CCTGARACCGTTCCTACAGC		
<b>cagA</b>	<i>cag1</i>	ATGACTAACGAACTATTGATC	94°C, 1 min; 53°C, 1 min; 72°C, 1 min (40 ciclos)	232
	<i>cag2</i>	CAGGATTTTTGATCGCTTTATT		
<b>dupA</b>	<i>dupA1</i>	CGTGATCAATATGGATGCTT	94°C, 45 s; 52°C, 45 s; 72°C, 45 s (35 ciclos)	197
	<i>dupA2</i>	TCTTTCTAGCTTGAGCGA		

Para avaliação da amplificação gênica, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, utilizando o corante de ácido nucleico BlueGreen (Lab Biotechnology®) e um marcador de DNA molecular de 100 pb (Cellco®). A visualização foi em um transluminador sob luz ultravioleta (UV).

#### 5.4. Sequenciamento genômico

O produto da amplificação dos genes de virulência foi sequenciado com a finalidade de avaliar a variabilidade genética e inferências filogenéticas. As reações de sequenciamento seguiram o seguinte protocolo: 2 µL do produto de PCR, 1µL do oligonucleotídeo (2,5 pmol), 2 µL de tampão (Tris-HCl 1M pH 9,0 (mL); MgCl<sub>2</sub> 50mM (1mL); água bidestilada 10 mL), 1 µL do kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing® (Pharmacia Biotech, EUA). A reação foi realizada em termociclador

GeneAmp PCR Systems<sup>®</sup> 9700 (Applied Biosystems<sup>®</sup>). O sequenciamento foi realizado utilizando o equipamento *ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer<sup>™</sup>* (Applied Biosystems<sup>®</sup>).

A etapa de precipitação do DNA ocorreu da seguinte maneira: 40 µL de isopropanol a 65% foram adicionados aos 10 µL da reação. A mistura foi homogeneizada no agitador por 30 segundos e incubada à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 45 minutos e o sobrenadante descartado. Ao precipitado foram adicionados 250 µL de etanol 60% para lavagem do material e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O processo de lavagem com álcool foi repetido duas vezes utilizando 100 µL do mesmo e o sobrenadante foi descartado. A placa contendo as amostras foi centrifugada invertida a 500 rpm por um minuto para garantir a retirada de todo o álcool. Após a centrifugação, foi realizada a secagem do material por aproximadamente 10 minutos, na capela de fluxo laminar. Este material foi ressuspenso em 10 µL de formamida, desnaturado a 95°C por cinco minutos e sequenciado.

### **5.5. Análise da sequência de nucleotídeos**

Os resultados dos sequenciamentos foram analisados por meio do software BioEdit Sequence Alignment Editor<sup>®</sup> versão 7.0.9.0 (Ibis Therapeutics Carlsbad, CA, EUA). As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas, utilizando o banco de dados do *National Center of Biotechnology - NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com a ferramenta BLASTn e BLASTx.

As análises no banco de dados do NCBI foram realizadas com o intuito de observar as regiões de similaridades entre as sequências. A ferramenta BLASTn foi utilizada para comparação das sequências de nucleotídeos com aquelas já depositadas no banco de dados.

### **5.6. Análise filogenética**

As sequências foram alinhadas com nucleotídeos homólogos não redundantes, obtidos a partir do Banco de dados "*GenBank*". Foram escolhidas sequências onde os valores de probabilidade estavam abaixo *doe-value*. Árvores filogenéticas foram construídas utilizando o método *Neighbour-joining*, método desenvolvido por Saitou &

Nei (1987). Uma posterior análise de *bootstrap* foi realizada para testar a confiabilidade da árvore (Felsenstein, 1985).

As árvores foram construídas por alinhamentos múltiplos da sequência, utilizando o programa Clustal X (Thompson et al., 1997). Todas as sequências de nucleotídeos foram comparadas, utilizando o software de exibição de árvore (tree view). O tamanho dos ramos foi estimado com 1000 repetições *bootstrap* e o percentual de vezes em todas as espécies foram indicados como um grupo monofilético.

### **5.7. Teste histopatológico**

O teste histopatológico foi realizado pelo laboratório de patologia do Hospital das Clínicas da UFG. As biópsias da mucosa gástrica foram fixadas em formalina tamponada a 10% e cortadas sequencialmente, em seguida foram coradas com Hematoxilina-Eosina e Giemsa. Os parâmetros histológicos foram classificados utilizando os critérios descritos no sistema de Sydney (Stolte&Meining, 2001).

### **5.8. Critérios de severidade**

A classificação em patologia severa e não severa foi estabelecida de acordo com Paredes-Osses et al. (2017) e Bellolio et al. (2019). Foram consideradas patologias severas, atrofia, metaplasia e adenocarcinoma. Gastrite, duodenite, esofagite, úlcera e xantasma foram consideradas patologias não graves.

### **5.9. Processamento e análise dos dados**

Os dados epidemiológicos e moleculares foram analisados no programa estatístico Bioestat, Bioedit, Graphpad e SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 17.0 para Windows. Os parâmetros foram calculados com intervalo de confiança de 95%. O teste de  $\chi^2$  e o teste exato de Fisher, foram utilizados e valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

# Capítulo II

---

*Diagnostic performance between histopathological and  
molecular methods in the detection of Helicobacter pylori*

---

## Diagnostic performance between histopathological and molecular methods in the detection of *Helicobacter pylori*

### Desempenho diagnóstico entre os métodos histopatológicos e moleculares na detecção de *Helicobacter pylori*

Lucas Luiz de L. Silva<sup>1</sup>; Igor M. C. Calassa<sup>1</sup>; Ana Karoline S. Oliveira<sup>2</sup>; Amanda F. P. L. Ramos<sup>2</sup>; Jaqueline C. Pontes<sup>2</sup>; Daniela M. M. Cardoso<sup>3</sup>; Lucas T. Rasmussen<sup>4</sup>; Lilian C. Carneiro<sup>1</sup>; Mônica S. Barbosa<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Núcleo de Estudo da *Helicobacter pylori*, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil

<sup>2</sup> Faculdade de Farmácia, Núcleo de Estudo em *Helicobacter pylori*, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil

<sup>3</sup> Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, departamento de Gastroenterologia, Goiânia, Goiás, Brasil

<sup>4</sup> Faculdade de Medicina de Marília, Departamento de Genética, Marília, São Paulo, Goiás, Brasil

## RESUMO

**Introdução:** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria Gram negativa considerada o agente etiológico de várias doenças gástricas. A prevalência da infecção bacteriana varia de acordo com idade, localização geográfica, etnia e *status* socioeconômico. A infecção crônica ocasionada por esse microrganismo pode favorecer o desenvolvimento de patologias severas, como o adenocarcinoma gástrico. Nesse sentido, o diagnóstico precoce é essencial para proporcionar um melhor prognóstico e o sucesso terapêutico. Vários métodos de diagnóstico realizados com técnicas invasivas e não invasivas, com diferentes sensibilidade e especificidade, têm sido utilizados na detecção de *H. pylori*. **Objetivo:** Comparar o desempenho das técnicas molecular e histopatológica utilizadas no diagnóstico da infecção por *H. pylori*. **Métodos:** Setenta e seis amostras de tecido gástrico foram coletadas de pacientes dispépticos e submetidas ao diagnóstico molecular e histopatológico. A detecção molecular foi realizada, utilizando o gene ribossomal (rRNA 16S) por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Resultados: O método molecular de diagnóstico com base na PCR detectou a bactéria em 63,2% das amostras, enquanto o teste histopatológico identificou o microrganismo em apenas 36,8% das biópsias gástricas. Os dados demonstram que a técnica de PCR apresentou cerca de 1,7 vezes mais sensibilidade que a técnica histopatológica. Conclusão: A técnica de PCR foi o método de diagnóstico mais eficiente para detecção de *H. pylori* e pode ser implementada na rotina laboratorial como teste complementar para detecção precoce de *H. pylori*.

**Unitermos:** bactérias; biologia molecular; histologia; patologia.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a Gram negative bacterium considered to be the etiologic agent of various gastric diseases. The prevalence of bacterial infection varies according to age, geographic location, ethnicity and socioeconomic status. The chronic infection caused by microorganism can favor the development of severe pathologies such as gastric adenocarcinoma. In this sense, early diagnosis is essential for a better prognosis and therapeutic success. Several diagnostic methods performed using invasive and non-invasive techniques, with different sensitivity and specificity, have been used in the detection of *H. pylori*. **Objective:** To compare the performance of the molecular and histopathological technique used in the diagnosis of *H. pylori* infection. **Methods:** 76 gastric tissue samples were collected from dyspeptic patients who underwent molecular and histopathological diagnosis. Molecular detection was performed using the ribosomal gene (16S rRNA) using the polymerase chain reaction (PCR) technique. **Results:** The PCR-based molecular diagnostic method detected the bacterium in 63.2% of the samples, while the histopathological test identified the microorganism in only 38.2% of gastric biopsies. The data demonstrated that the PCR technique was about 1.7 times more sensitive than the histopathological technique. **Conclusion:** The PCR technique was the most efficient diagnostic method for detecting *H. pylori* and can be implemented in the laboratory routine as a complementary test for the early detection of *H. pylori*.

**Key words:** bacteria; molecular biology; histology; pathology.

## INTRODUCTION

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a gram-negative, ubiquitous, spiral, pleomorphic, flagellated and microaerophilic bacteria. The bacterium was discovered in 1983 by Marshall and Warren, who established a relationship between microorganism infection to gastrointestinal disorders<sup>(1)</sup>. These findings led to the Nobel Prize for Medicine and Physiology awarded by researchers in 2005<sup>(2)</sup>.

*H. pylori* infection has a cosmopolitan distribution and affects about 50% of the world population<sup>(3)</sup>. The prevalence rate of infection is higher in emerging countries, ranging from 20% to 90% depending on the geographical region. In Brazil, the prevalence varies from 50 to 80%, similar to Africa, where the prevalence is 70 to 90 %<sup>(4)</sup>.

Parasite-host imbalance relationship is required for occurring the *H. pylori* infection. The main accepted routes of transmission are oral-oral, gastric-oral, fecal-oral and iatrogenic routes<sup>(3-6)</sup>. However, other routes of transmission such as zoonotic and sexual have been proposed<sup>(7)</sup>.

*H. pylori* is considered the etiological agent of several gastric pathologies such as gastritis, ulcer, atrophy, metaplasia, lymphoma and gastric adenocarcinoma. Due its high

carcinogenic potential the bacterium was classified as a type I carcinogenic by the International Agency for Research on Cancer (IARC), subsidized by World Health Organization (WHO) <sup>(8)</sup>. In addition, bacterial infection is associated with extra-gastric disorders such as immune thrombocytopenic purpura, anemia by iron and vitamin B12 deficiencies<sup>(9)</sup>.

The methods used for screening *H. pylori* infection can be segregated into invasive and non-invasive. Invasive methods are those that involve the examination of upper digestive endoscopy to obtain the gastric tissue fragment. Among the invasive, there are: culture, urease test, Polymerase Chain Reaction (PCR) and histopathological test, which is considered the gold standard according to the IV Brazilian Consensus Conference on *H. pylori* Infection. PCR can be used in several biological samples and several constitutive genes such as *ureA*, *glmM*, *ureC* and 16S rRNA (*hpx*) have been targets for the detection of the bacterium. Non-invasive methods are not dependent on gastric biopsy and involve tests such as marked urea, serology and fecal antigen<sup>(10)</sup>.

The use of appropriate techniques with high sensitivity and specificity is of utmost importance for a reliable infection diagnosis. An early diagnosis is associated with a better patient's quality of life, since the presence of the bacteria in the gastrointestinal tract may induce the several pathologies, including adenocarcinoma<sup>(11-13)</sup>. In this sense, the aim of this study was to compare the performance of the molecular and histopathological technique used in the diagnosis of *H. pylori* infection.

## **METHODOLOGY**

### **Ethical Considerations**

This study was approved by the Research Ethics Committee of an University Hospital (CAAE: 83422017.7.0000.5078), published under the number 2.519.032. All patients enrolled in this study have read and signed the Consent Form.

### **Patients and samples**

Patients using antibiotics, proton pump inhibitors (PPIs), immunosuppressant's, participants under 18 years of age, pregnant, lactating, individuals diagnosed with gastrointestinal bleeding and a history of gastrectomy were excluded from this study. Patients who could not access the histopathological diagnosis result were also excluded.

Sample collection was performed at an University Hospital of Goiania, Goias, Brazil, between November 2017 and September 2018. The procedure for obtaining gastric samples followed the recommendations of the Brazilian Society of Digestive Endoscopy. Two fragments of the antrum and two of the gastric body were obtained from each patient and were sent to the hospital's own clinical pathology laboratory for histopathological analysis and to the Núcleo de Estudo da *Helicobacter pylori*(NEHP) for molecular analysis.

### **Histopathological exam**

Histological evaluation of the specimens was performed to verify the microorganism presence and histological alteration. Histological sections of the body and gastric antrum were about 0.6 x 0.3 x 0.2 in diameter and the fixation of samples were performed in Giemsa stained 10% buffered formalin. Sidney Classification System<sup>(14)</sup> was used for the analysis of inflammatory infiltrate. The slides were analyzed by an experienced pathologist who had no access to molecular data.

### **Molecular Diagnosis**

DNA extraction and molecular analyzes were performed by NEHP. DNA extraction from gastric tissue samples followed the QIAamp® Kit protocol (Qiagen, Valencia, CA, United States). A 10 µL aliquot was reserved for DNA quantitation on NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis).

Genomic DNA was amplified by the PCR method as described by Nevoa, et al. (2017)<sup>(15)</sup>. Molecular detection was performed using the 16S rRNA ribosomal gene, which was amplified using the *hpx/ hpxI* primers. Oligonucleotides sequences, amplification conditions, and fragment size are described in **Table 1**. Amplification was performed in an Amplitherm® TX96 thermocycler and each reaction consisted of: 33.5 µL Milli-Q water, 5 µL PCR Buffer 10X, containing MgCl<sub>2</sub> (1.5mM), 2 µL dNTP (2.5mM), 2 µL of each oligonucleotide pair (10 pmol each), 5 µL of DNA sample (50 ng) and 0.5 µL of Taq DNA Polymerase (2.5 units), totaling a volume of 50 µL per reaction. A negative and positive control was used for each reaction.

**Table 1** – Amplification conditions and sequence primers used for *H. pylori* detection

Gene	Primer	Sequence (5' → 3')	Amplification conditions	pb	Reference
16S rRNA	<i>hpx</i>	CTGGAGARACTAAGYCCTCC	94°C 5', 40 ciclos 94°C 1' /	150	Luceti R, Gatti L. (2008)
	<i>hpx1</i>	GAGGAATACTCATTGCGAAGGCGA	59°C 1' / 72°C 1' e 72°C 7'.		

For the evaluation of gene amplification PCR products were submitted to 2% agarose gel electrophoresis using BlueGreen nucleic acid dye (Lab Biotechnology) and a 100-base pair molecular DNA marker (Cellco). The visualization occurred in a transluminator under ultraviolet (UV) light and samples that amplified a 150 bp fragment (base pairs) were considered positive.

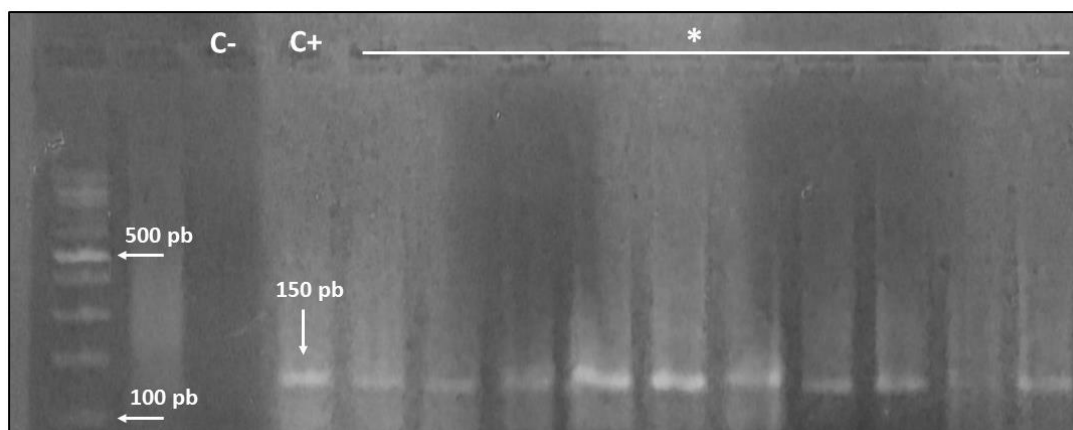
### Data analysis

For data analysis, the GraphPad Prism 8 software was used, applying the Chi-square test, considering  $p < 0.05$  as statistically significant.

## RESULTS

Samples of 117 gastric tissue were collected from dyspeptic patients and 41 were excluded because they did not answer the inclusion criteria. The analyzed samples were 60/76 (78.9%) to females and 16/76 (21.1%) to males and participants' ages ranged from 18 to 83, with an average of 46.6.

Samples were analyzed using PCR and histopathological technique for detection of *H. pylori*. They were considered positive when the bacterium was detected in at least one of the tests and negative when the microorganism was absent in both tests. Positive samples submitted to 16S rRNA gene amplification generated a 150 bp fragment (**Figure 1**). Results showed that 55/76 (72.4%) were positive and 21/76 (27.6%) negative for *H. pylori*. Among the positive samples, 43/55 (78.2%) were female and 12/55 (21.8%) male, and most were aged 18 to 40 years (45.5%) (**Table 2**).

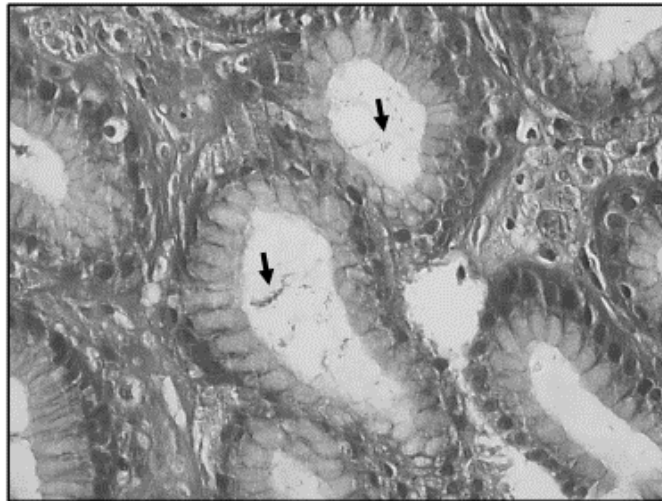


**Figure 1** – Agarose gel electrophoresis of the PCR amplified products of the 16S rRNA ribosomal gene (*hpx/hpx1*). M: 100 bp molecular DNA marker; C-: negative control; C+: positive control; \* DNA from gastric tissue samples from dyspeptic patients.

**Table 2** – Profile of dyspeptic patients according to sex and age group

Variables	Total (N=76)		<i>H. pylori</i> -positive (n=55)		<i>H. pylori</i> -negative (n=21)	
	n	%	n	%	n	%
<b>Sex</b>						
Female	60	78.9	43	78.2	17	80.9
Male	16	21.1	12	21.8	4	19.1
<b>Age range</b>						
18 - 40	27	35.5	25	45.4	2	9.5
41 - 60	35	46.1	21	38.2	14	66.7
> 60	14	18.4	9	16.4	5	23.8

The samples submitted to histopathological examination were positive when showed the presence of *H. pylori* by Giemsa staining (**Figure 2**).



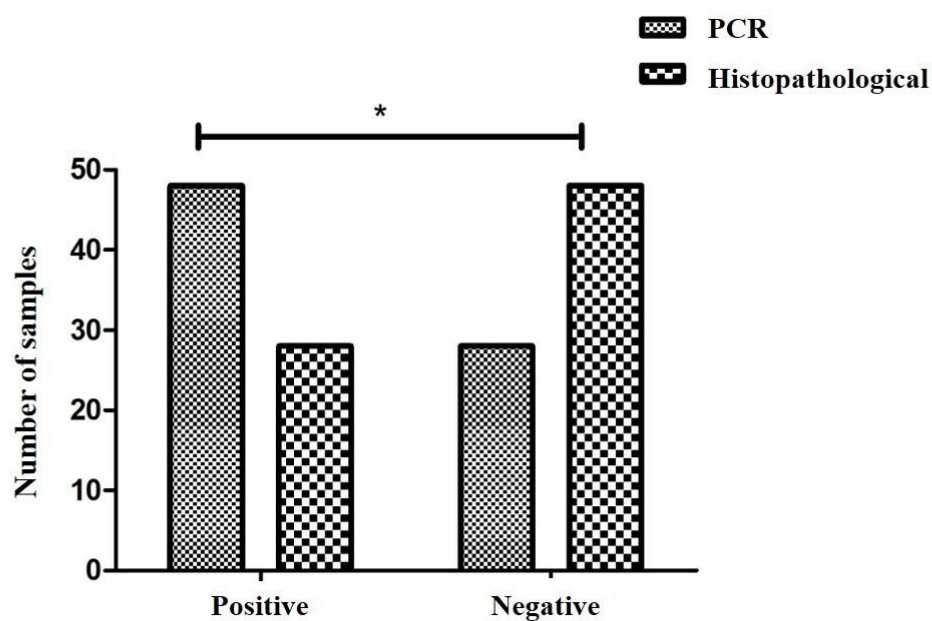
**Figure 2** –Histological section image of the gastric antrum (400x magnification), stained by Giemsa's technique, showing the presence of *H. pylori*. \* Arrow: indicates the presence of *H. pylori*.

The results showed that 26 (34.2%) samples were positive for the PCR technique and negative for the histopathological, while only 7 (9.2%) samples were positive for histopathological and negative for PCR. Moreover, 22 (28.9%) samples were positive and 21 (27.6%) negative for both tests (**Table 3**).

**Table 3** –Comparison of positive and negative results according to the molecular and histopathological tests

PCR	Golden pattern		Total
	Positive	Negative	
<b>Positive</b>	22	26	48
<b>Negative</b>	7	21	28

The PCR technique was about 1.7 times more sensitive than the histopathological diagnosis. The results showed that the molecular tool detected 48/76 (63.2%) positive samples, while the histological technique only 28/76 (36.8%). Statistical analyzes showed a significant difference between the methods ( $p < 0.05$ ) (**Figure 3**).



**Figure 3** –Results comparison obtained by the PCR method and histopathological test. \*  $p < 0.005$

Gastric pathologies were classified according to the endoscopic and histopathological diagnostics. More than one clinical outcomes could be found in the same infected patient. Results showed that 1/79 (1.3%) patients had gastric adenocarcinoma, 4/79 (5.1%) atrophy, 12/79 (15.2%) duodenitis, 8/79 (10.1%) esophagitis, 44/79 (55.7%) gastritis, 2/79 (2.5%) ulcer, 2/79 (2.5%) metaplasia and 6/79 (7.6%) presented normal endoscopic diagnosis (**Table 4**).

**Table 4** – Clinical outcomes obtained from endoscopic diagnosis and histopathological analysis in *H. pylori* positive patients

<b>Clinical outcomes (n=79)</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Gastric adenocarcinoma	1	1.3
Atrophy	4	5.1
Duodenitis	12	15.2
Esophagitis	8	10.1
Gastritis	44	55.7
Ulcer	2	2.5
Metaplasia	2	2.5
Normal	6	7.6

## DISCUSSION

In the present study the prevalence of infection was 55/76 (72.3%), similar to other developing countries. Other study<sup>(15)</sup> conducted in central Brazil with similar sampling showed prevalence of infection of 77.6%, similar to the present study. Several diagnostic methods are used to screen for *H. pylori* infection and to choose the best test it is required to evaluate parameters of sensitivity, specificity, cost and clinical condition of the patient, therefore it is of utmost importance studies evaluating diagnostic efficacy<sup>(16-18)</sup>. In this study 78.1% patients were female, corroborating with study by Ortiz et al. (2011)<sup>(19)</sup>, which used a similar sample and identified that 65.3% of the individuals were women. The study by Nevoa et al. (2017)<sup>(15)</sup>, analyzed gastric biopsies of 85 patients and most were women (65.8%). The higher prevalence of infected women can be explained by the fact that they seek the public health care more often. The age of the participants in this study ranged from 18 to 83, with a mean of 46.6 years, similar to the study by Nevoa et al. (2017)<sup>(15)</sup>, where the range was from 15 to 89 years with a mean of 40.77 years.

The histopathological method for decades is considered the most common test to identify the infection<sup>(10)</sup>. This diagnostic is considered the gold standard by the IV Brazilian Consensus Conference on *Helicobacter pylori* Infection for detecting the bacterium presence and to evaluate the gastric mucosa conditions. Some studies showed that the histopathological test sensitivity is higher to several techniques used to detect the microorganism. In addition, the gold standard technique is inexpensive and simple to perform<sup>(20-23)</sup>. In contrast, previous studies have shown disadvantages of the technique,

such as the professional's ability to analyze the slides and besides that false negative results occur when the collected fragment does not contain the bacteria. This is due to the irregular distribution of the microorganism in the gastric mucosa, requiring the removal of two fragments from the body and two from the stomach antrum to minimize this event (10, 20, and 21).

The histopathological technique may also be affected by recent use of medications such as bismuth salts, proton pump inhibitors (PPIs) and antibiotics, which lead to decreased bacterial density. After eradication treatment, this methodology presents a decrease in sensitivity that may be even smaller than the urease test, however the histopathological test is commonly used to monitor inflammatory lesions after treatment (10,19). In this study, patients who were undergoing treatment or using PPIs and antibiotics were excluded from the study; therefore, the histological technique may not have been influenced by these factors.

Over the past few decades, molecular detection has dramatically changed the clinical management of many infectious diseases (21). PCR is one of the best molecular methods used in a wide range of clinical applications such as simplicity of execution, high sensitivity and specificity and allows genotyping different strains and identifying virulence and antibiotic resistance genes (24,25). The present study evaluated 76 samples which 48 were positives using PCR, in contrast, only 28 were detected using the histopathological diagnosis, showing the better detection of *H. pylori* using the molecular tool. These data corroborate the study by Ruparelia et al. (2013) (26) which evaluated several parameters of conventional and PCR tests, demonstrating a greater accuracy of molecular methodology. The research by Rasmussen et al. (2010) (27), also showed a better detection of *H. pylori* using PCR compared to the histological test, however, the effectiveness of PCR was lower compared to the Southern Blotting test.

A recent study by Nevoa et al. (2017) (15), compared the sensitivity of the rapid urease test between PCR technique using the *hpx1/hpx2* ribosomal gene and the constitutive urease *h5/h6* gene. The authors demonstrated that regardless of the *H. pylori* gene used for amplification, the PCR technique demonstrated better sensitivity compared to the urease test.

The study by Ortiz et al. (2011) (19) showed an increase in sensitivity from 80.3% using the histopathological test to 90.3% when using the molecular methodology. Furthermore, the authors showed that the molecular test combined with the histological test presented higher sensitivity than the rapid urease test combined with the PCR or the

histological test<sup>(26)</sup>. Our results demonstrated that individually the histological technique presented a positivity of 38.2%, the PCR of 63.2% and when combined presented 72.4%. Besides that, it was observed that 26 (34.2%) samples were positive exclusively for the molecular technique and seven (9.2%) exclusively for the histopathological test. Despite the advantages of PCR, the technique may have some limitations, such as inadequate sample collection and the presence of reaction inhibitors. Additionally, PCR can detect DNA from dead bacteria present in the gastric mucosa of patients after treatment generating false positive results<sup>(23, 28, 29)</sup>. These data reinforce the importance of using the histological PCR technique to increase sensitivity, avoiding possible cases of false negative results.

*H. pylori* infection may manifest asymptotically, in this situation it is not possible to determine the presence of the bacterium based on clinical symptoms or findings. In this sense, a tool with high sensitivity that allows the detection of bacteria in asymptomatic individuals is important. Infection clinical outcomes may be severe or non-severe and will be determined according to the parasite-host relationship. This study showed that gastritis was the main pathology associated with *H. pylori* infection, followed by esophagitis and duodenitis. The study by Barbosa and Schinonni (2011)<sup>(30)</sup> showed that 95% of cases of chronic gastritis have *H. pylori* as etiological agent.

## CONCLUSION

*H. pylori* represent one of the most common bacterial infection in humans, that causes severe anomalies, including chronic gastritis and gastric cancer. An accurate diagnosis of *H. pylori* infection is a critical first step in the successful treatment. The PCR was more advantageous because showed sensitivity about 1.7 times higher than the histopathological. Currently, PCR is not used in the laboratory routine due to its high cost when compared to other techniques, making its use unfeasible, especially in the public health system. As regard, it is required to continue our efforts to achieve more appropriate and reliable diagnostic tests.

## REFERENCES

1. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev. 1997; 10(4): 720-41. PubMed PMID: 9336670.
2. Warren JR. *Helicobacter*: The ease and difficulty of a new discovery (Nobel lecture). ChemMedChem. 2006; 1(7): 672-85. PubMed PMID: 16902916.
3. Miftahussurur M, Nusi IA, Akil F, Syam AF, et al. Gastric mucosal status in populations with a low prevalence of *Helicobacter pylori* in Indonesia. PLoS One. 2017; 12(5): e0176203. PubMed PMID: 28463979.
4. Ben Mansour K, Fendri C, Battikh H, et al. Multiple and mixed *Helicobacter pylori* infections: Comparison of two epidemiological situations in Tunisia and France. Infect Genet Evol. 2016; 37: 43-8. PubMed PMID: 26518911.
5. Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. J Adv Res. 2015; 6(4): 539-47. PubMed PMID: 26199743.
6. McDaniels AE, Wymer L, Rankin C, et al. Evaluation of quantitative real time PCR for the measurement of *Helicobacter pylori* at low concentrations in drinking water. Water Res. 2005; 39(19): 4808-16. PubMed PMID: 16278002.
7. Talaei R, Souod N, Momtaz H, et al. Milk of livestock as a possible transmission route of *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterol Hepatol from Bed to Bench. 2015; 8(Sup1): S30-36. PubMed PMID: 26171135.
8. IARC. Biological Agents. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2012; 100: 1-443. PubMed PMID: 23189750.
9. Zhong C, Li K-N, Bi J-W, et al. Sodium intake, salt taste and gastric cancer risk according to *Helicobacter pylori* infection, smoking, histological type and tumor site in China. Asian Pacific J Cancer Prev. 2012; 13(6): 2481-4. PubMed PMID: 22938408.
10. Coelho LGV, Marinho JR, Genta R, et al. IVth Brazilian Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection. Arq Gastroenterol. 2018; 55(2): 97-121. PubMed PMID: 29668771.
11. Arismendi-morillo G, Hernández I, Mengual E, et al. Comparison of three methods based on endoscopic gastric biopsies for diagnosis of *Helicobacter pylori* active infection in a clinical setting. Arq Gastroenterol. 2011; 48(3): 190-4. PubMed PMID: 21952704.
12. Czinn SJ. *Helicobacter pylori* infection: Detection, investigation, and management. J Pediatr. 2005; 146(3 Suppl): S21-6. PubMed PMID: 15758899.

13. Kato T, Yagi N, Kamada T et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in gastric mucosa by endoscopic features: A multicenter prospective study. *Dig Endosc.* 2013; 25(5): 508-18. PubMed PMID: 23369058.
14. Dixon MF. Chapter 38: Pathology of gastritis and peptic ulceration. In: Mobley HL, Mendz GL, Hazell SL (ed) *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, 1<sup>a</sup> edn. Washington (DC).
15. Nevoa JC, Rodrigues RL, Menezes GL, et al. Molecular technique for detection and identification of *Helicobacter pylori* in clinical specimens: a comparison with the classical diagnostic method. *J Bras Patol e Med Lab.* 2017; 53(1): 13-9.
16. Luscenti R, Gatti LL. Diagnóstico molecular da infecção pelo *Helicobacter pylori* em mucosa gástrica. *Rev Para Med.* 2008; 22(1): 21-26.
17. El Khadir M, Alaoui Boukhris S, et al. *Helicobacter pylori* CagA EPIYA-C motifs and gastric diseases in Moroccan patients. *Infect Genet Evol.* 2018; 66: 120-9. PubMed PMID: 30244090.
18. Miftahussurur M, Yamaoka Y. Diagnostic methods of *Helicobacter pylori* infection for epidemiological studies: critical importance of indirect test validation. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 4819423. PubMed PMID: 26904678.
19. Ortiz JIM, Aldana AÁ, Ibarra JJS, et al. Evaluación de diferentes pruebas para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*. *Investig Andin.* 2011; 13(23): 297-311.
20. Aumpan N, Vilaichone R-K, Chotivitayatarakorn P, et al. High efficacy of rapid urine test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Thai people. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2019; 20(5): 1525-9. PubMed PMID: 31128058.
21. Laine L, Lewin DN, Naritoku W et al. Prospective comparison of H&E, Giemsa, and Genta stains for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Gastrointest Endosc.* 1997; 45(6): 463-7. PubMed PMID: 9199901.
22. Leung JK, Gibbon KJ, Vartanian RK. Rapid staining method for *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. *J Histotechnol.* 1996; 19(2): 131-2.
23. Sabbagh P, Mohammadnia-Afrouzi M, Javanian M, et al. Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* infection: ideals, options, and limitations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019; 38(1): 55-66. PubMed PMID: 30414090.
24. Menoni SMF, Bonon SHA, Zeitune JMR, et al. PCR-based detection and genotyping of *Helicobacter pylori* in endoscopic biopsy samples from Brazilian patients. *Gastroenterol Res Pract.* 2013; 2013:1-8. PubMed PMID: 23401678.
25. Rimbara E, Sasatsu M, Graham DY. PCR Detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples. *Methods Mol Biol.* 2013; 943: 279-87. PubMed PMID: 23104297.

26. Ruparelia JR, Sodagar NR, Patel JS, et al. Comparison of conventional diagnostic modalities with PCR for detection of *Helicobacter pylori* infection in symptomatic patients. Asian J Med Pharm Res. 2013; 105-110: 105-10.
27. Rasmussen LT, de Labio RW, Gatti LL et al. *Helicobacter pylori* detection in gastric biopsies, saliva and dental plaque of Brazilian dyspeptic patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(3): 326-30. PubMed PMID: 20512249.
28. Kalali B, Formichella L, Gerhard M. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Changes towards the Future. Diseases. 2015; 3(3): 122-35. PubMed PMID: 28943614.
29. Raggi CC, Pinzani P, Paradiso A, et al. External quality assurance program for PCR amplification of genomic DNA: An Italian experience. Clin Chem. 2003; 49(5): 782-91. PubMed PMID: 12709370.
30. Barbosa JA, Schinonni MI. *Helicobacter pylori*: Associação com o câncer gástrico e novas descobertas sobre os fatores de virulência. Rev Ciências Médicas e Biológicas. 2011; 10(3): 254-62.

# Capítulo III

---

*Prevalence of Helicobacter pylori cagA, dupA, and vacA genotypes and their association with the severity of gastropathies in patients with dyspepsia*

---

**Prevalence of *Helicobacter pylori* *cagA*, *dupA*, and *vacA* genotypes and their association with the severity of gastropathies in patients with dyspepsia**

**Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes and their association with the severity of gastropathies**

Lucas Luiz de Lima Silva<sup>1</sup>; Ana Karoline Silva Oliveira<sup>1</sup>; Aline Rodrigues Gama<sup>1</sup>; Jaqueline Correa Pontes<sup>1</sup>; Amanda Ferreira Paes Landim Ramos<sup>1</sup>; Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva<sup>3</sup>; Daniela Medeiros Milhomem Cardoso<sup>2</sup>; Angel José Vieira Blanco<sup>4</sup>; Lucas Trevizani Rasmussem<sup>5</sup>; Lilian Carla Carneiro<sup>1</sup>; Mônica Santiago Barbosa<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Núcleo de Estudo da *Helicobacter pylori*, departamento de Biociências e Tecnologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil

<sup>2</sup>Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, departamento de Gastroenterologia, Goiânia, Goiás, Brasil

<sup>3</sup>Faculdade de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Goiás, departamento de Medicina, Brasil

<sup>4</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, departamento de áreas acadêmicas, campus Inhumas, Goiás, Brasil

<sup>5</sup>Faculdade de Medicina de Marília, departamento de Genética, Marília, São Paulo, Brasil

**ABSTRACT**

**Introduction:** *Helicobacter pylori* is a gram-negative bacterium associated with the development of severe gastric pathologies, such as atrophy, metaplasia, and gastric adenocarcinoma. This microorganism is considered a class I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer. The virulence genes in the strain causing infection determine the clinical outcome and can be used as specific markers for the severity of gastric diseases. The aim of this study was to evaluate the prevalence of *H. pylori* infection and associations of *cagA*, *vacA* and *dupA* virulence genes with gastric pathologies. **Methods:** Antral and gastric body biopsies of 117 patients with dyspepsia were analyzed by histological and molecular techniques. Screening for *H. pylori* infection was performed using the *hpx* gene (16S rRNA). Positive samples were evaluated for *vacA*, *cagA*, and *dupA* virulence genes. **Results:** The prevalence of

infection was 64.1%, with a high frequency of strains positive for *cagA* (80.0%), *dupA* (70.7%), and *vacA* (56.0%). The *cagA* gene was detected in all isolates from patients with severe pathologies, whereas the *vacA* gene was not detected in this group. In addition, there were fewer virulence genes in isolates from patients with severe diseases than in isolates from non-severe cases. **Conclusions:** The circulating *H. pylori* strains in the Brazilian Midwest exhibit high heterogeneity in the frequencies of virulence genes. Individual virulence factors and their combinations may influence clinical outcomes.

**Keywords:** Gastrointestinal Diseases, Bacteria, Molecular Pathology, Factors Virulence

## INTRODUCTION

*Helicobacter pylori* is a gram-negative bacterium that colonizes the human gastric mucosa. Infections caused by this microorganism are among the most common worldwide, affecting more than half of the global population. The prevalence of infection is significantly lower in developed countries than in developing countries; in some regions of Brazil, the prevalence is up to 90% (Pacheco et al., 2013; Toscano et al., 2018).

Although *H. pylori* infection can remain asymptomatic, it is considered the leading cause of gastric disorders, such as chronic gastritis, peptic ulcer, adenocarcinoma, and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Based on its clear role in the pathogenesis of gastric cancer, *H. pylori* has been classified by the World Health Organization (WHO) as a class I carcinogen (Kao et al., 2016; McClain et al., 2017). The severity of pathologies associated with bacterial infection depends on the complex and dynamic relationship between the parasite and host, which is determined by several factors, such as host genetic susceptibility, environmental factors, and bacterial virulence factors (Zhang et al., 2016).

*H. pylori* has a highly variable circular genome of 1,667,867 base pairs (bp) and contains genes that encode virulence factors involved in various processes, such as colonization, chronic persistence, and damage to host cells (Tomb et al., 1997). The

microorganism is well-adapted to survive in the inhospitable stomach environment by the synthesis of urease, an important virulence factor that catalyzes the hydrolysis of urea into ammonia and carbon dioxide. This reaction causes a pH increase in the cell membrane and in areas near the colonization site. In addition, hypervariable regions in genes encoding cell surface structures enable the evasion of host immune responses. Bacterial strains may have different virulence genes that directly influence pathogenicity, such as *cagA*, *vacA*, and *dupA* (Tomb et al., 1997; Pandya et al., 2017; Paredes-Osses et al., 2017; Sallas et al., 2017).

The *cagA* gene, located in the chromosomal region called the chromosomal pathogenicity island (*cagPAI*), encodes the CagA protein (cytotoxin-associated gene A), a highly immunogenic antigen that stimulates the production of chemotactic factors in the host gastric epithelium, inducing an intense inflammatory response. This gene is considered an important marker of virulence and is associated with an increased risk for the development of gastritis, peptic ulcer, atrophy, and gastric carcinoma (Backert et al., 2010; Zhang et al., 2016).

The *vacA* gene encodes vacuolating cytotoxin A (VacA), considered an important virulence factor in the pathogenesis of gastric cancer and peptic ulcer. VacA induces vacuoles in gastric epithelial cells. In addition, it induces the release of cytochrome C from mitochondria, leading to apoptosis, the inhibition of T cell proliferation, and the induction of pro-inflammatory responses (Yamaoka, 2010; Sayehmiri et al., 2015; Pandya et al., 2017).

The duodenal ulcer promoter gene (*dupA*) was the first disease-specific virulence factor identified in *H. pylori*. This gene is located in a region of plasticity in the bacterial genome and is associated with duodenal ulcer formation. The *dupA* gene

is also related to neutrophil infiltration in the mucosa and the induction of elevated IL-8 levels by gastric epithelial cells (Lu et al., 2005; Nagashima and Yamaoka, 2015).

Relationships between bacterial virulence factors and gastric diseases have been described in various geographical regions. *H. pylori* strains are highly heterogeneous and this genotypic diversity explains variation in clinical outcomes of infections. The aim of this study was to evaluate the prevalence *H. pylori* infection and associations of *cagA*, *vacA*, and *dupA* virulence genes with the severity of gastroduodenal diseases in patients with dyspepsia in midwestern Brazil.

## **METHODS**

### **Study population and samples**

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital das Clínicas of the Universidade Federal de Goiás (approval no. 2.519.032). A total of 117 patients with dyspepsia undergoing upper digestive endoscopy were included. Informed consent was obtained from all patients who agreed to participate in the study. Patients who used proton pump inhibitors within 2 weeks, histamine-2 receptor blockers in the previous week, or immunosuppressants or antibiotics in the last 8 weeks, patients with active gastrointestinal bleeding, pregnant or lactating patients, and those who were unable to undergo endoscopy were excluded.

Gastric specimens were obtained according to the recommendations of the IV<sup>th</sup> Brazilian Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection (Coelho et al., 2018). From each patient, two fragments of the antrum and gastric body were obtained. The samples were sent to the clinical pathology laboratory of the university hospital

for histopathological analysis and to the Núcleo de Estudo da *Helicobacter pylori*/Universidade Federal de Goiás (NEHP/UFG) for a molecular analysis.

### **Histopathological analysis**

Gastric mucosa biopsies were fixed in 10% buffered formalin, cut, and stained with hematoxylin-eosin and Giemsa. Histological parameters were classified using the criteria described in the Sydney system (Fonseca et al., 2010).

### ***H. pylori* detection and genotyping**

*H. pylori* DNA extraction was performed using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect *H. pylori* by amplifying a 16S ribosomal gene (rRNA) fragment. *H. pylori*-positive samples were used for the detection of the virulence factors *vacA*, *cagA*, and *dupA*.

Each PCR consisted of the following: 33.5 µL of Milli-Q water, 5 µL of PCR Buffer 10× containing MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 2 µL of dNTPs (2.5 mM); 2 µL of each oligonucleotide (10 pmol each); 5 µL of DNA sample (50 ng), and 0.5 µL of Taq DNA Polymerase (2.5 units), for a total volume of 50 µL. For each reaction, positive and negative controls were used. Primer sequences, amplification conditions, and fragment sizes are described in Table 1.

**Table 1** Sequences of primers used for the detection of *H. pylori*, *vacA*, *cagA*, and *dupA*, amplification conditions, and fragment sizes [7]

Gene	Primers	Sequence (5'-3')	Amplification conditions	bp
<b>16S rRNA</b>	<i>hpx1</i>	CTGGAGARACTAAGYCCTCC	94°C, 1 min; 59°C, 1 min; 72°C, 1 min (40 cycles)	150
	<i>hpx2</i>	GAGGAATACTCATTGCGAAGGCGA		
<b><i>vacA</i> S1</b>	<i>SA</i>	ATGGAAATACAACAAACACAC	94°C, 45 s; 54°C, 45 s; 72°C, 45 s (35 cycles)	176
	<i>SCa</i>	CCTGARACCGTTCCTACAGC		
<b><i>cagA</i></b>	<i>cag1</i>	ATGACTAACGAAACTATTGATC	94°C, 1 min; 53°C, 1 min; 72°C, 1 min (40 cycles)	232
	<i>cag2</i>	CAGGATTTTTGATCGCTTTATT		
<b><i>dupA</i></b>	<i>dupA1</i>	CGTGATCAATATGGATGCTT	94°C, 45 s; 52°C, 45 s; 72°C, 45 s (35 cycles)	197
	<i>dupA2</i>	TCTTTCTAGCTTGAGCGA		

PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis, containing Blue Green nucleic acid dye (Lac Biotechnology, São Paulo, Brazil), and visualized under an ultraviolet light source. For a size analysis of the amplified fragment, a 100-bp DNA ladder was used.

### Diagnosis of gastroduodenal pathologies and severity criteria

The endoscopic and histopathological diagnoses of *H. pylori* infection were made, respectively, by the gastroenterology department and the clinical pathology laboratory of the university hospital. Cases were classified as severe or non-severe according to Paredes-Osses et al. (2017) and Bellolio et al. (2019). Atrophy, metaplasia, and adenocarcinoma were considered severe pathologies. Gastritis, duodenitis, esophagitis, ulcer, and xanthelasma were considered non-severe pathologies.

## Statistical analysis

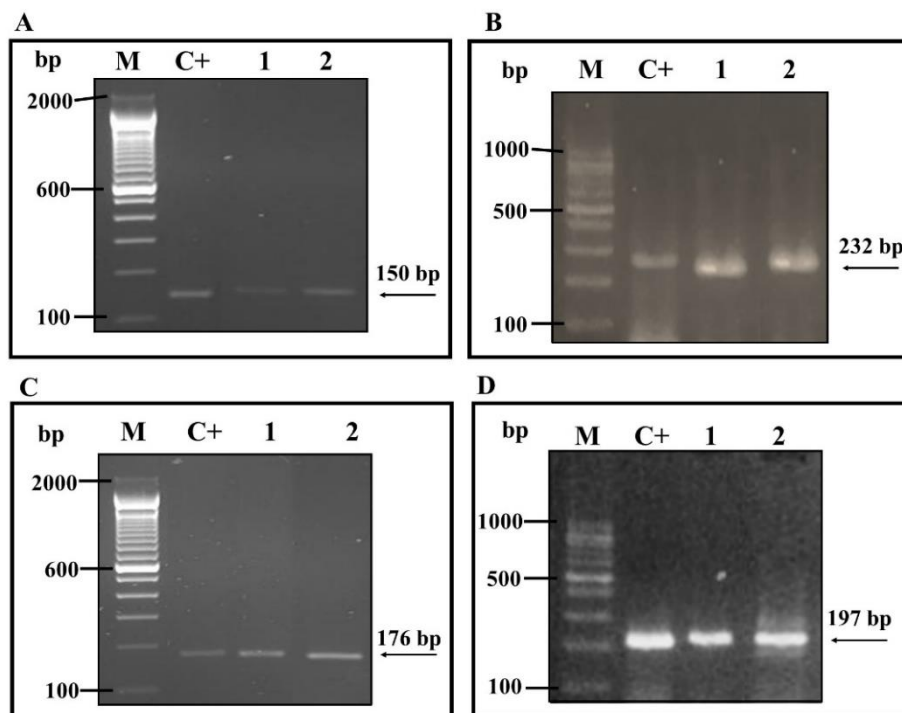
For statistical comparisons, the chi-square test and Fischer's exact test were used and a  $p$ -value of  $<0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### Prevalence of *H. pylori* infection

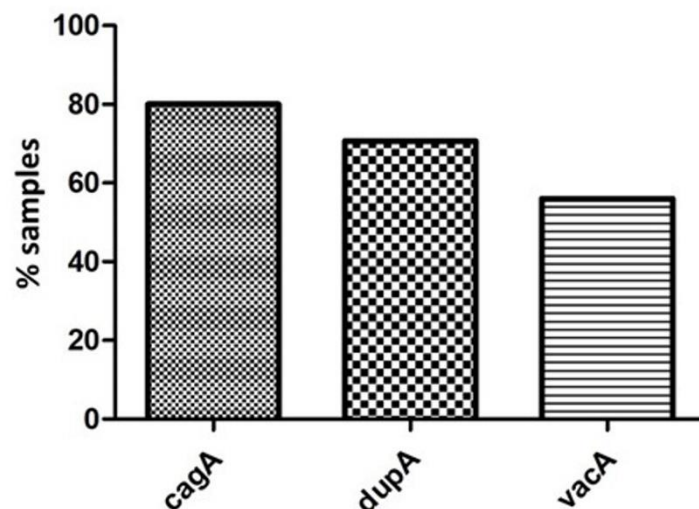
Initially, DNA from 117 gastric biopsy specimens was extracted for the amplification of the 16S rRNA gene *hpx* to screen for *H. pylori* infection. Samples that amplified a 150-bp fragment were considered positive (Figure 1A). The prevalence of infection was 64.1% (75/117); among infected individuals, 72.0% (54/75) were women and 28.0% (21/75) were men. The age of the patients ranged from 18 to 83 years, with a mean of 46.6 years.

The 75 *hpx*-positive samples were used for the detection of virulence genes. Samples were considered positive for the *cagA*, *vacA*, and *dupA* genes when they amplified a fragment of 232 bp (Figure 1B), 176 bp (Figure 1C), and 197 bp (Figure 1D), respectively. These genes were confirmed by Sanger sequencing and a bioinformatics analysis.



**Fig. 1** PCR amplification products of the *H. pylori* ribosomal gene and virulence genes. **M:** molecular weight marker (100 bp); **C+:** positive control. **(A)** Lanes 1 and 2: *hpx*-gene positive samples. **(B)** Lanes 1 and 2: positive samples for the *cagA* gene. **(C)** Lanes 1 and 2: *vacA* gene-positive samples. **(D)** Lanes 1 and 2: positive samples for the *dupA* gene

A high prevalence of virulence genes was found in circulating strains in central western Brazil. The most frequent gene was *cagA*, present in 80.0% (60/75) of samples, followed by *dupA* in 70.7% of samples (53/75) and *vacA* in 56.0% of samples (42/75) (Figure 2).



**Fig. 2** Prevalence of *H. pylori* genotypes in patients with dyspepsia

#### **Associations between clinical outcomes and virulence genes**

Most patients in the present study had more than one endoscopic diagnosis. In patients infected with *H. pylori*, the most frequent non-severe gastric pathology was gastritis (54/75; 72.0%), followed by esophagitis (11/75; 14.7%) and duodenitis (11/75; 14.7%). The most frequent severe pathologies were gastric atrophy (4/75; 5.3%), intestinal metaplasia (2/75; 2.7%), and gastric adenocarcinoma (2/75; 2.7%). In addition, among infected patients, 20.0% (15/75) did not present any gastric pathology (Table 2).

In the group of patients with non-severe pathologies, the most frequent clinical outcome was gastritis, and *dupA*, *cagA*, and *vacA* were present in 73.0%, 70.0%, 69.0% of isolates from these patients, respectively. In patients with severe pathologies, atrophy was the most common clinical outcome, and unlike in the severe group, the *cagA* gene was most frequent, followed by *dupA* and *vacA*. Despite the differences in

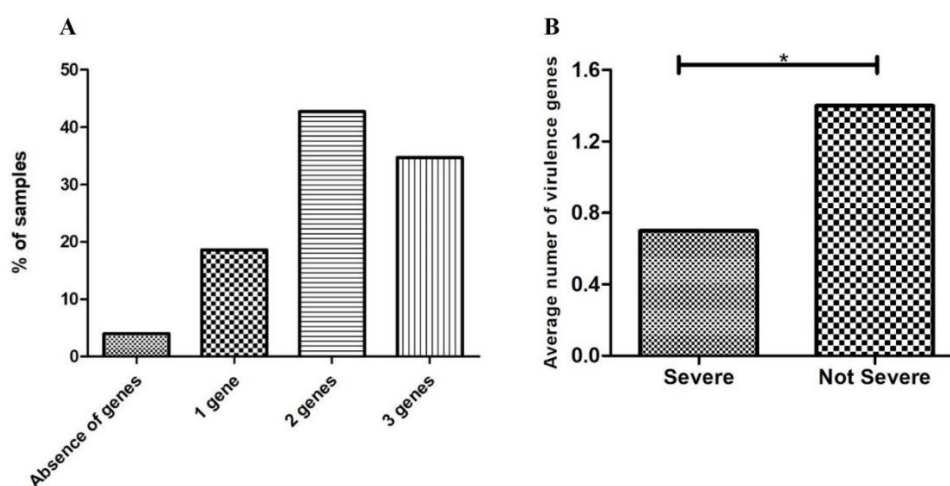
the frequencies of virulence genes between groups, their presence was not associated with any specific clinical outcome (Table 2).

**Table 2.** Clinical profile of patients infected with *H. pylori* and genotypes of isolates

Clinical outcomes	<i>hpx</i> (+)		<i>cagA</i> (+)		<i>vacA</i> (+)		<i>dupA</i> (+)	
	n (75)	f (%)	n (60)	f (%)	n (42)	f (%)	n (53)	f (%)
Gastric adenocarcinoma	2	2.7	2	3.3	1	2.4	0	0
Atrophy	4	5.3	4	6.7	2	4.8	3	5.7
Duodenitis	11	14.7	7	11.7	6	14.3	8	15.1
Esophagitis	11	14.7	8	13.3	4	9.5	6	11.3
Gastritis	54	72.0	42	70.0	29	69.0	39	73.6
Metaplasia	2	2.7	2	3.3	1	2.4	2	3.8
Normal	15	20.0	12	20.0	9	21.4	10	18.9
Ulcer	1	1.3	1	1.7	0	0	1	1.9
Xanthelasma	1	1.3	0	0	0	0	0	0

#### Number of virulence genes and the severity of gastric disorders

*H. pylori*-positive samples were used for the detection of the virulence genes *vacA*, *cagA*, and *dupA*. The results showed that isolates from 3/75 patients (4.0%) did not harbor these genes, those from 14/75 (18.7%) had only one gene, those from 32/75 (42.7%) contained two of the genes, and those from 26/75 (34.7%) harbored all three genes (Figure 3A). The association between the number of virulence genes and clinical outcomes was verified. Interestingly, we observed that the mean number of virulence genes was significantly higher in strains from patients with non-severe pathologies than from severe pathologies ( $p = 0.0199$ ) (Figure 3B).



**Fig. 3(A)** Percentage of isolates with various virulence genes. **(B)** Relationship between the number of virulence genes in isolates and the severity of gastric pathologies. \* $p < 0.005$

In addition, we observed that patients with severe pathologies were 10 years older, on average, than patients with non-severe pathologies ( $p = 0.0047$ ) and had approximately twice the number of gastric diseases ( $p < 0.001$ ) (Table 3).

**Table 3** Associations between severity with patient age and the number of gastric diseases

Variables	Severe (n=7)		Not Severe (n=53)		<i>p</i> -valor
	Average	SD	Average	SD	
Age range	56.7	14.3	46.0	15.2	<b>0.0047</b>
Number of clinical outcomes	1.9	0.6	1.0	0.7	<b>&lt;0.0001</b>

SD: Standard deviation

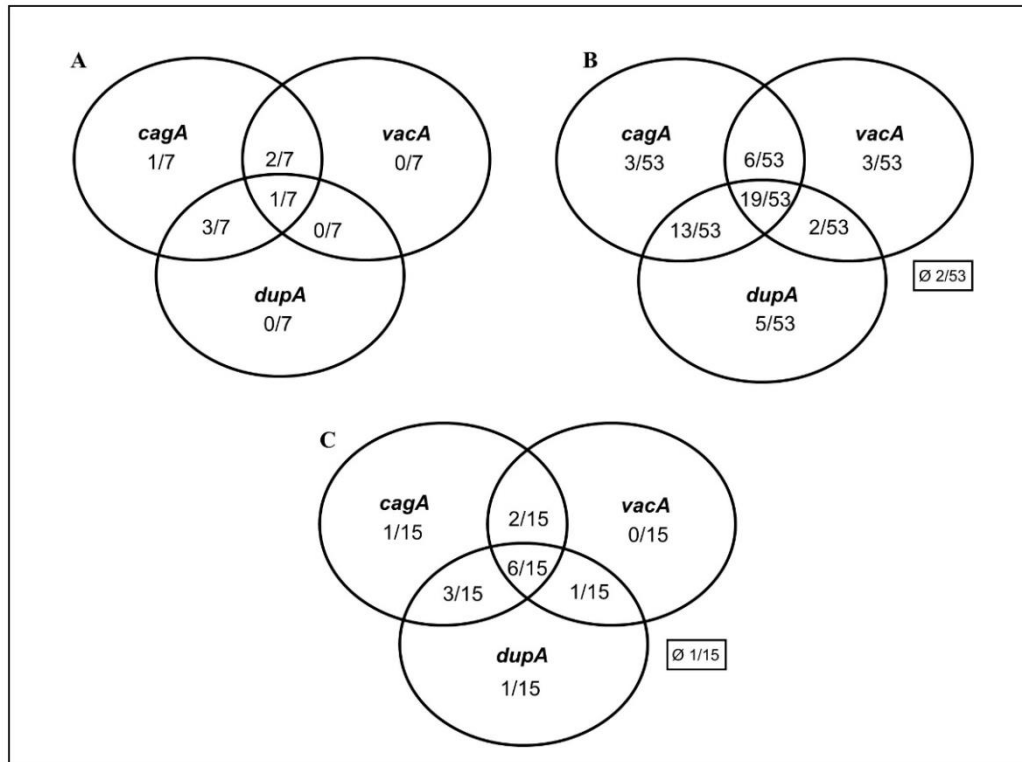
### Gene profile of infective strains in patients

The genotype profiles of strains isolated from individuals with severe and non-severe pathologies were evaluated. In the first group, *cagA* was present in 14.3% (1/7), *cagA* and *vacA* were present in 28.6% (2/7), *cagA* and *dupA* were present in 42.8% (3/7), and all three genes were present in 14.3% (1/7) of isolates. The *vacA* and

*dupA* genes, were not found in any strain isolated from patients with severe pathologies (Figure 4A).

In the group of patients with non-severe pathologies, the *cagA*, *vacA*, and *dupA* genes were present in 5.7% (3/53); 5.7% (3/53), and 9.4% (5/53) of isolates, respectively. The combinations of *cagA* and *dupA*, *cagA* and *vacA*, and *vacA* and *dupA* were identified in 24.5%, 11.3%, and 3.8% of isolates. The simultaneous detection of the three genes was observed in 35.8% of isolates, while 3.8% did not show any virulence genes (Figure 4B).

In the group of patients without gastric pathologies, the *vacA* gene was not found in any of the isolates. Additionally, *cagA* was found in 6.7% of isolates. The same frequency was obtained when analyzing the *dupA* gene alone. The combinations of *cagA* and *dupA*, *cagA* and *vacA*, and *vacA* and *dupA* were present in 20.0%, 13.3%, and 6.7% of isolates, respectively. All three genes were found in 40.0% of isolates in this group. Additionally, 6.6% of individuals were infected with strains that had none of the virulence genes (Figure 4C).



**Fig. 4** Association between severity and the presence of *cagA*, *vacA* and *dupA* virulence genes. **(A)** Individuals with severe pathologies. **(B)** Individuals with non-severe pathologies. **(C)** Individuals without gastric disorders.  $\emptyset$ : absence of all genes

These results showed that the most frequent gene combination in patients classified as severe was *cagA* and *dupA*. In the group of non-severe patients and in the group of individuals without gastric pathologies, strains harboring all three genes were most frequent.

## DISCUSSION

Gastric diseases resulting from *H. pylori* infection are classified as severe and non-severe. Clinical outcomes may be related to the genotypic diversity of strains present in different geographic regions (Lopes et al., 2014; Paredes-Osses et al., 2017; Sallas et al., 2017; Idowu et al., 2019).

The reported prevalences of *H. pylori cagA*-positive strains among patients with dyspepsia in India (72.7%), Iran (70.0%), Greece (73.0%), and Bulgaria (84.7%)

are similar to high prevalence found in the present study (80.0%) (Khodaii et al., 2011; Yordanov et al., 2012; Pandya et al., 2017).

When the CagA oncoprotein is present in host cells, the risks of developing a peptic ulcer and gastric cancer appear to be higher than those for infections with *cagA*-negative strains (Kim et al., 2013; Sallas et al., 2017). In this study, 77.3% of patients with non-severe pathologies were infected with *cagA*-positive strains; however, this gene was present in all strains of patients with severe pathologies. These data suggest that the *cagA* gene is an important marker of severity. In addition, patients with severe pathologies were older, with the potential for a longer time for disease progression.

VacA is a toxin secreted by *H. pylori* with the ability to induce vacuolization in epithelial cells. We detected a low frequency of *vacA* (i.e., 56%), which can be explained by the amplification of only one allelic subtype of the gene. These results corroborate those obtained by Idowu et al. (2019), who reported a *vacA* frequency of 66.2% when only the s1 allele was evaluated. However, this frequency is considered low when compared to those for northern, northeastern, and southeastern regions of Brazil, where several studies have evaluated more than one allelic region, showing frequencies of 84.6%, 86.1%, and 69.4%, respectively (Cavalcante et al., 2012; Rasmussen et al., 2012; Silva Júnior et al., 2013; Vinagre et al., 2015).

Studies of other countries, such as Saudi Arabia, Morocco, and China, have found a *vacA* gene frequency of greater than 90% in patients with dyspepsia (Pinto-Ribeiro et al., 2010; El Khadir et al., 2017; Akeel et al., 2019). The high frequencies found in these studies may also reflect the analysis of several allelic subtypes of the gene.

In the present study, none of the patients with severe pathologies were infected with strains of *H. pylori* that contained only the *vacA* gene; however, the combination

of *vacA* and *cagA* was detected in 28.7% of isolates. A study conducted in northeastern Brazil reported that a high prevalence of the combination of *H. pyloricagA* and *vacA* s1m1 genes was associated with a more severe gastric condition (Cavalcante et al., 2012). Other studies conducted in Venezuela, Cuba, and Colombia have also demonstrated an association between the combination of *cagA* and *vacA* and the risk of developing gastric diseases (Sallas et al., 1997; Ortiz-Princz et al., 2012; Takahashi et al., 2013; Trujillo et al., 2014). In the Moroccan population, *cagA*-positive strains were also the most prevalent type and were most highly associated with the *vacA* allelic subtype, s2m2 (Boukhris et al., 2012).

Studies have demonstrated that *H. pylori* strains with the allelic subtype s2m2 and s2m1 do not induce vacuolization in gastric epithelial cells (Foegeding et al., 2016; Yahiro et al., 2016). According to Molina-Castro et al. (2019), the presence of strains with the combination of *cagA* and *vacA* s1m1 increased the risks of atrophic gastritis and duodenal ulcer by 3.2 and 2.5 times, respectively. In this study, the *vacA* gene alone or in combination with *cagA* showed no association with severe diseases. This result can be explained by the limited analysis of allelic subtypes of the *vacA* gene.

It has been suggested that the detection of *dupA* is not sufficient to assess its role in gastric pathologies. In addition to its presence, it is necessary to evaluate the size of the gene product, as shorter forms of the protein are inactive (Trujillo et al., 2014). Analyses of the whole *dupA* gene cluster may provide a better understanding of its role in the pathogenesis of *H. pylori* infection (Jung et al., 2012).

The *dupA* gene appears to act as a protective factor against gastric cancer and may also be associated with an increased risk of duodenal ulcer (Shiota et al., 2010). The presence and activity of the *dupA* gene as well as its association with gastric diseases is poorly studied, especially in Brazil. Our results demonstrated a high

frequency of *dupA*, although no association with the severity of gastric diseases was found.

All three genes were detected simultaneously in 34.7% of isolates in the present study, corroborating the results of Sallas et al. (2017), who detected a high frequency of the combination of *cagA*, *vacA*, *dupA*, and *oipA*. In this previous study, the combination of *cagA* and *dupA* was associated with a normal gastric mucosa. In contrast, in the present study, the most frequent combination in isolates from patients without gastric alterations was *cagA*, *vacA*, and *dupA* (40.0%).

The study provides the first demonstration that infectious strains in patients with severe diseases have fewer virulence genes when compared to isolates from patients with non-severe pathologies. There is evidence suggesting that an interaction between CagA and VacA can influence the severity of gastrointestinal disease. Studies have demonstrated an antagonistic interaction between CagA and VacA with respect to different biochemical signaling pathways and cellular morphologies. In addition, CagA can block the apoptotic activity of VacA (Bridge and Merrell, 2013). The pathogenic mechanism of DupA is still not well understood and interactions between this protein and other virulence factors have not been established. Therefore, we suggest that severe manifestations of gastrointestinal diseases result from interactions among virulence factors (Šterbenc et al., 2019). Additional studies of different genotypes of these virulence factors as well as proteomic and metabolomic analyses are necessary to better elucidate the mechanisms underlying different clinical outcomes.

## CONCLUSION

Circulating *H. pylori* strains in the Brazilian Midwest exhibited high heterogeneity in the presence of the virulence genes *cagA*, *vacA* and *dupA*. The combination of these genes can directly interfere with the development of severe diseases, such as gastric cancer. Further studies are needed to clarify the roles of interaction among virulence factors in the establishment of gastric pathologies.

## ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the Laboratory of Genetics and Biodiversity of Federal University of Goiás, for DNA sample sequencing.

## REFERENCES

- Akeel M, Shehata A, Elhafey A, Elmakki E, et al. (2019). *Helicobacter pylori vacA*, *cagA* and *iceA* genotypes in dyspeptic patients from southwestern region, Saudi Arabia: Distribution and association with clinical outcomes and histopathological changes. *BMC Gastroenterol.* 19:1–11.
- Backert S, Tegtmeyer N, Selbach M. (2010). The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: the master key hypothesis. *Helicobacter.* 15:163–176.
- Bellolio E, Riquelme I, Riffo-Campos AL, Rueda C, et al. (2019). Assessment of gastritis and gastric cancer risk in the Chilean population using the OLGA system. *Pathol Oncol Res.* 25:1135–1142.
- Boukhris SA, Benajah DA, El Rhazi K, Ibrahim SA, et al. (2012). Prevalence and distribution of *Helicobacter pyloricagA* and *vacA* genotypes in the Moroccan population with gastric disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31:1775–1781.

Bridge DR, Merrell DS. (2013). Polymorphism in the *Helicobacter pylori* CagA and VacA toxins and disease. *Gut Microbes*. 4:101–17.

CavalcanteMQF, Silva CIG, Braga-Neto MB, Fialho ABC, et al. (2012).

*Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 107:561–563.

Coelho LGV, Marinho JR, Genta R, Ribeiro LT, et al. (2018). IVTH Brazilian consensus conference on *Helicobacter pylori* infection. *Arq Gastroenterol*. 55:97–121.

El Khadir M, Alaoui Boukhris S, Benajah DA, Rhazi KE, et al. (2017). VacA and CagA status as biomarker of two opposite end outcomes of *Helicobacter pylori* infection (gastric cancer and duodenal ulcer) in a Moroccan Population. *PLoS One*. 12:e0170616.

Foegeding NJ, Caston RR, McClain MS, Ohi MD, et al. (2016). An overview of *Helicobacter pylori* VacA toxin biology. *Toxins*. 8:173.

Fonseca TL, Moraes EP, Juliano CR, Silva AM, et al. (2010). Detection of *Helicobacter pylori* by phenotypic and genotypic methods. *Dig Dis Sci*. 55:1643–1648.

Idowu A, Mzukwa A, Harrison U, Palamides P, et al. (2019). Detection of *Helicobacter pylori* and its virulence genes (*cagA*, *dupA*, and *vacA*) among patients with gastroduodenal diseases in Chris Hani Baragwanath Academic Hospital, South Africa. *BMC Gastroenterol*. 19:73.

Jung SW, Sugimoto M, Shiota S, Graham DY, et al. (2012). The intact *dupA* cluster is a more reliable *Helicobacter pylori* virulence marker than *dupA* alone. *Infect Immun*. 80:381–387.

Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. (2016). *Helicobacter pylori* infection: an overview of

- bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J.* 39:14-23.
- Khodaii Z, Ghaderian SMH, Najar RA, Nejati H, et al. (2011). *cagA* and *vacA* status and influence of *Helicobacter pylori* infection on serum oxidative DNA damage in Iranian patients with peptic ulcer disease. *Ir J Med Sci.* 180:155–161.
- Kim JY, Kim N, Nam RH, Suh JH, et al. (2013). Association of polymorphisms in virulence factor of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal diseases in South Korea. *J Gastroenterol Hepatol.* 29:984–991.
- Lopes AI, Vale FF, Oleastro M. (2014). *Helicobacter pylori* infection-recent developments in diagnosis. *World J Gastroenterol.* 20:9299–9313.
- Lu H, Yamaoka Y, Graham DY. (2005). *Helicobacter pylori* virulence factors: facts and fantasies. *Curr Opin Gastroenterol.* 21:653–659.
- McClain MS, Beckett AC, Cover TL. (2017). *Helicobacter pylori* vacuolating toxin and gastric cancer. *Toxins.* 9:316-332.
- Molina-Castro S, Garita-Cambronero J, Malespín-Bendaña, Une C, et al. (2019). Virulence factor genotyping of *Helicobacter pylori* isolated from Costa Rican dyspeptic patients. *Microb Pathog.* 128:276–280.
- Nagashima H, Yamaoka Y. (2015). *Helicobacter pylori dupA* and smoking are associated with increased levels of interleukin-8 in gastric mucosa in Iraq-reply. *HumPathol.* 46:931.
- Ortiz-Princz D, Guariglia-Oropeza V, Ávila M, Correnti M, et al. (2010). *Helicobacter pyloricagA* and *vacA* genotypes in Cuban and Venezuelan populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 105:331–335.
- Pacheco SL, Ogata SK, Machado RS, Patrício FRS, et al. (2013). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by means of reduced-dose <sup>13</sup>C-urea breath test and early sampling of exhaled breath. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 57:607–611.
- Pandya HB, Agravat HH, Patel JS. (2017). Prevalence of specific *Helicobacter*

*pyloricaga*, *vacA*, *iceA*, *ureC* genotypes and its clinical relevance in the patients with acid-peptic diseases. *J Clin Diagn Res.* 11:DC23–DC26.

Paredes-Osses E, Sáez K, Sanhueza E, Hebel S, et al. (2017). Association between *cagA*, *vacAi*, and *dupA* genes of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal pathologies in Chilean patients. *Folia Microbiol.* 62:437–444.

Pinto-Ribeiro I, Ferreira RM, Batalha S, Hlaing T, et al. (2010). *Helicobacter pylori vacA* genotypes in chronic gastritis and gastric carcinoma patients from Macau, China. *Toxins.* 8:142.

Rasmussen LT, de Labio RW, Neto AC, Silva LC, et al. (2012). Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies, saliva and dental plaques of dyspeptic patients from Marília, São Paulo, Brazil: Presence of *vacA* and *cagA* genes. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 18:180–187.

Sallas ML, Melchiades JL, Zabaglia LM, Moreno JRP, et al. (2017). Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *dupA* and *oipA* genotypes in patients with gastric disease. *Adv Microbiol.* 7:1–9.

Sayehmiri F, Kiani F, Sayehmiri K, Soroush S, et al. (2015). Prevalence of *cagA* and *vacA* among infected patients in Iran: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dev Ctries.* 9:686–696.

Shiota S, Matsunari O, Watada M, Hanada K, et al. (2010). Systematic review and meta-analysis: the relationship between the *Helicobacter pylori dupA* gene and clinical outcomes. *Gut Pathog.* 2:13.

Silva Júnior MR, Vinagre RMDF, Silva AV, Oliveira CSF, et al. (2013). Differences in virulence markers between *Helicobacter pylori* strains from the Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 46:358–361.

Šterbenc A, Jarc E, Poljak M, Homan M. (2019). *Helicobacter pylori* virulence

- genes. *World J Gastroenterol.* 25:4870–4884.
- Takahashi A, Shiota S, Matsunari O, Watada M, et al. (2013). Intact long-type *dupAas* a marker for gastroduodenal diseases in Okinawan subpopulation, Japan. *Helicobacter.* 18:66–72.
- Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, et al. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 388:539-47.
- Toscano EP, Madeira FF, Dutra-Rulli MP, Gonçalves LOM, et al. (2018). Epidemiological and clinical-pathological aspects of *Helicobacter pylori* infection in Brazilian children and adults. *Gastroent Res Pract.* 2018:8454125.
- Trujillo E, Martínez T, Bravo MM. (2014). Genotipificación de los factores de virulencia *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* en individuos de dos regiones de Colombia con riesgo opuesto de cáncer gástrico. *Biomédica.* 34:567–573.
- Vinagre IDF, Queiroz AL, Silva Júnior MR, Vinagre RMDF, et al. (2015). *Helicobacter pylori* infection in patients with different gastrointestinal diseases from northern Brazil. *Arq Gastroenterol.* 52:266–271.
- Yahiro K, Hirayama T, Moss J, Noda M. (2016). New insights into *VacA* intoxication mediated through its cell surface receptors. *Toxins.* 8:152.
- Yamaoka Y. (2010). Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 7:629–641.
- Yordanov D, Boyanova L, Markovska R, Gergova G, et al. (2012). Significance of *Helicobacter pylori vacA* intermediate region genotyping — a Bulgarian study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 74:253–257.
- Zhang RG, Duan GC, Fan QT, Chen SY. (2016). Role of *Helicobacter pylori* infection in pathogenesis of gastric carcinoma. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 7:97–107.

# Capítulo IV

---

*Helicobacter pylori* virulence *dupA* gene: risk factor or  
protective factor?

---

## ***Helicobacter pylori* virulence *dupA* gene: risk factor or protective factor?**

Lucas Luiz de Lima Silva<sup>1</sup>; Ana Karoline Silva Oliveira<sup>1</sup>; Aline Rodrigues Gama<sup>1</sup>; Amanda Ferreira Paes Landim Ramos<sup>1</sup>; Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva<sup>2</sup>; Angel José Vieira Blanco<sup>3</sup>; José Daniel Gonçalves Vieira<sup>1</sup>; Lucas Trevizani Rasmussem<sup>4</sup>; Lilian Carla Carneiro<sup>1</sup>; Mônica Santiago Barbosa<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Núcleo de Estudo da *Helicobacter pylori*, departamento de Biociências e Tecnologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas, Universidade Católica de Goiás, departamento de Medicina, Goiânia, Goiás, Brazil

<sup>3</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, departamento de Áreas Acadêmicas, campus Inhumas, Goiás, Brazil

<sup>4</sup>Faculdade de Medicina de Marília, departamento de Genética, Marília, São Paulo, Brazil

### **Abstract**

*Helicobacter pylori* is the etiological agent of chronic gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. The duodenal ulcer-promoting gene *dupA*, which is located in the plasticity region of the *H. pylori* genome, is homologous to the *virB* gene which encodes a type IV secretion protein in *Agrobacterium tumefaciens*. Studies have shown associations between *H. pylori dupA*-positive strains and gastroduodenal diseases. However, whether *dupA* acts as a risk factor or protective factor in these diseases remains unclear. Therefore, in this study, we aimed to verify the presence of the *dupA* gene in infectious *H. pylori* strains in the Brazilian mid-west and to investigate its association with the clinical outcomes of patients with dyspepsia. Additionally, the phylogenetic origin of the strains was determined. Gastric biopsies from 117 patients with dyspepsia were analysed using histological and molecular techniques. The *hpx* gene (16S rRNA) was used to screen for *H. pylori* infection, and positive samples were then subjected to *dupA* gene detection and sequencing. The estimated prevalence of *H. pylori* infection was 64.1%, with the *dupA* gene being detected in a high proportion of infectious strains (70.7%). Furthermore, a risk analysis revealed that for women, a *dupA*-positive *H. pylori* infection increased the chance of developing gastritis by 2-fold. The partial *dupA* sequences from isolated

infectious strains in this work are similar to those of strains isolated in western countries. This study provides useful insights for understanding the role of the *H. pylori* *dupA* gene in disease development.

**Keywords:** *H. pylori*, *dupA*, Gene, Gastritis, Molecular Pathology, Factors Virulence

## Introduction

*Helicobacter pylori* is a gram-negative, microaerophilic, rod-shaped bacterium that infects the gastric mucosa in more than half of the human population worldwide [1,2]. The prevalence of *H. pylori* is higher in developing countries owing to the generally lower basic sanitation and hygiene conditions brought on by low socioeconomic infrastructures [3, 4]. Infections with this bacterium can lead to the development of several gastropathies, such as chronic gastritis, peptic ulcer, atrophy, and metaplasia [5,6]. Additionally, *H. pylori* infection is considered one of the main risk factors for the development of gastric adenocarcinoma. As a result, the International Agency for Research on Cancer, subsidised by the World Health Organization, has classified *H. pylori* as a type I carcinogen [7].

*H. pylori* infections have different clinical outcomes depending on the virulence of the bacterial strains, environmental factors, and the genetic characteristics and lifestyles of the hosts [8]. The *cagA* gene, located in the chromosomal region called the chromosomal pathogenicity island (*cagPAI*), encodes the CagA protein (cytotoxin-associated gene A), a highly immunogenic antigen that stimulates the production of chemotactic factors in the host gastric epithelium, inducing an intense inflammatory response. This gene is considered an important marker of virulence and is associated with an increased risk for the development of gastritis, peptic ulcer, atrophy, and gastric carcinoma [8,9].

The *vacA* gene encodes vacuolating cytotoxin A (VacA), considered an important virulence factor in the pathogenesis of gastric cancer and peptic ulcer. VacA induces vacuoles in gastric epithelial cells. In addition, it induces the release of cytochrome C from mitochondria, leading to apoptosis, the inhibition of T cell proliferation, and the induction of pro-inflammatory responses [10–12].

In 2005, Lu et al. [13] described a gene located in the plasticity region of the *H. pylori* genome, which they named the duodenal ulcer-promoting gene (*dupA*). This gene

was found to be homologous to the virulence gene *virB* which encodes a type IV secretion protein in *Agrobacterium tumefaciens*. The *dupA* gene is also related to neutrophil infiltration in the mucosa and the induction of elevated IL-8 levels by gastric epithelial cells [14].

According to Lu et al. [13], infection with *H. pylori dupA*-positive strains was associated with the development of duodenal ulcers, and the presence of the *dupA* gene in the infecting strain was considered a protective factor against gastric atrophy, intestinal metaplasia, and gastric cancer. As a result, this gene was characterised as the first disease-specific virulence gene of *H. pylori* [13]. However, similar to other *H. pylori* virulence genes, the role of this gene in the development of gastropathies varies according to geographical regions [15–17].

Although the pathogenic mechanism of the protein encoded by the *dupA* gene (ie, DupA) is not yet well understood, it may be involved in the induction of interleukin-8 (IL-8) production by the gastric epithelium [13]. Strains carrying the *dupA* gene also appear to be more resistant to stomach acid, which may partly explain the association of this virulence factor with the development of ulcers [18, 19].

Although several bacterial virulence factors have been suggested as markers for digestive diseases [20–24], there is still a lack of information on the biomarkers which are characteristic of the clinical conditions present in infected individuals, especially in South America. Some studies have indicated the usefulness of the *dupA* gene as a virulence biomarker [11, 19, 25–27]. However, the role of this gene in the etiology and pathogenesis of different gastropathies is not fully understood. Bearing in mind that identification of predictive biomarkers for a given clinical condition is a promising strategy for personalized medicine, the aim of this study was to verify the association between presence of the *H. pylori dupA* gene and clinical outcomes in dyspeptic patients in the center-west of Brazil. In addition, a phylogenetic analysis was performed to assess the origin of circulating strains.

## Materials and methods

### **Ethical considerations and participants**

This study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital das Clínicas of the Universidade Federal de Goiás (UFG) (Approval Numbers 2.519.032 and Certificate of Presentation of Ethical Appreciation 83422017.7.0000.5078). Patients with dyspepsia (age: >18 years) who had undergone an upper gastrointestinal tract (GI) endoscopy at the Hospital das Clínicas of UFG were recruited. The exclusion criteria were applied: patients who had used proton pump inhibitors in the 2 weeks preceding sample collection, or blocking agents in the week preceding the procedure, patients who had used immunosuppressants or antibiotics in the past 8 weeks, patients with active gastrointestinal bleeding, and pregnant and lactating women. All participants provided signed informed consent.

### **Screening for *H. pylori* infection and detection of the *dupA* gene**

Two samples of the gastric antrum and gastric body were collected from the 117 patients during the upper GI endoscopy. DNA extraction was performed using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The extracted DNA was used for the molecular screening of *H. pylori* infection by amplifying a fragment of the constitutive ribosomal 16S rRNA gene (*hpx*) using the polymerase chain reaction (PCR).

The *hpx*-positive samples were then subjected to *dupA* gene detection and sequencing. The PCRs were performed using primers previously described in the literature [28] (Table 1). The PCR mixture (final volume: 50  $\mu$ L) comprised 33.5  $\mu$ L of Milli-Q water, 5  $\mu$ L of 10 $\times$  PCR buffer containing MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 2  $\mu$ L of dNTP (2.5 mM), 2  $\mu$ L of each oligonucleotide (10 pmol each), 5  $\mu$ L of DNA sample (50 ng), and 0.5  $\mu$ L of *Taq* DNA polymerase (2.5 units). For each reaction, positive and negative controls were also tested.

After the PCR-amplified fragments had been electrophoresed on a 2% agarose gel, the fragment bands were visualised by nucleic acid staining with Blue Green Loading dye (Lac Biotecnologia, SP, Brazil) and exposure under ultraviolet light. The size of the amplified product was determined by comparison against a 100-bp DNA ladder molecular weight marker (Cellco, SP, Brazil).

### **Diagnosis of gastroduodenal pathologies**

The endoscopic examination of the patients was performed by the Department of Gastroenterology while histopathological analyses of the biopsied gastric mucosal samples were done by the Clinical Pathology Laboratory of Hospital das Clínicas (UFG). Endoscopic examination was performed according to recommendations of the Brazilian Society of Digestive Endoscopy. The procedure was performed by a gastroenterologist using an Olympus CV endoscope (Olympus Medical Europe, Germany). Videoendoscopic images were viewed on a high-definition, flat-panel monitor. Alfentanil (50 mcg) and propofol (40 mg) were administered intravenously before the procedure [29].

For the histopathological examination, the gastric mucosal samples were fixed in 10% buffered formalin and stained with Giemsa and haematoxylin-eosin [30]. Grading of the inflammatory infiltrate was performed according to the Sidney system [31].

#### **DNA sequencing and phylogenetic analysis**

All *dupA* gene amplification products were purified with the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison WI, USA). DNA sequencing was performed using an ABI-PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) in an ABI-PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems). Sequencing was performed at least twice, using the same forward and reverse primers used in the PCR assays. All the sequences were compared with those listed on the GenBank nucleotide and protein databases (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA), using the Blastn and Blastx algorithms, respectively.

To establish the phylogenetic origin of the Brazilian strains, a phylogenetic tree based on *dupA* was built using the gene sequences from the following 17 *H. pylori* strains from different parts of the world (available from GenBank): three sequences from Portugal (PORT: KT290607, KT290572, and KT290619); two from Brazil (BRA: HQ228198 and JF951131); three from Argentina (ARG: FJ763612, FJ763614, and AB649939); four from Japan (JAP: AB739514, AB739579, AB739507, and KC707841); two from China (CHI: KC707837 and KM245039); and three from India (IND: KC894690, KC894688, and KM245039). Additionally, three *dupA* sequences (NEHP04, NEHP05, and NEHP06) which belonged to *H. pylori*-infected patients in our study who had duodenitis, esophagitis, and gastritis, respectively, were included in the phylogenetic tree.

The sequences were first aligned with ClustalX v2.1.0.0 and then manually edited using BioEdit v7.1.7.0. Phylogenetic analysis was performed using Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v10.1. The tree was built using maximum-likelihood analysis, with 1000 bootstraps. The evolutionary model chosen by the algorithm for the set of sequences used was General Time Reversible + Invariant Sites (GTR + I) [32].

### **Statistical analysis**

Descriptive statistics were performed to calculate the absolute frequencies and relative percentages for the categorical variables. Subsequently, inferential statistics were performed using Fisher's exact test to assess possible associations between the variables. Additionally, the relative risk for the development of gastric diseases in relation to the bacterial genetics was calculated. For the inferential statistics, a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ) was adopted. For statistical calculations, the BioEstat® 5.3 software was used.

### **Results**

In this study, gastric biopsies were obtained from 117 patients with dyspepsia, of which 64.1% (75/117) were considered positive for *H. pylori* (mean age: 42 years; standard deviation: 10.8). Among the patients infected by the bacterium, 27 (36.0%) were men and 48 (64.0%) women. The *dupA* gene was detected in 70.7% (53/75) of *H. pylori*-positive samples.

In total, four gastropathies were diagnosed in the study population, with some patients having more than one gastric disorder. Of the individuals infected with *dupA*-positive strains, 67.9%, 15.1%, 11.3% and 5.7% had a diagnosis of gastritis, duodenitis, oesophagitis, and atrophy respectively, and 18.9% had a gastric mucosa without changes (normal). Of the individuals infected with *dupA*-negative strains, 68.2%, 13.6%, and 22.7% and 4.5% had gastritis, duodenitis, oesophagitis and atrophy respectively, and 22.7% had a normal mucosa (Figure 1). These data suggested that the presence of the *dupA* gene in infectious *H. pylori* strains was not associated with the development of these gastropathies in the population studied ( $p$ -value=0.8059).

The most prevalent gastropathy among individuals infected with a *dupA*-positive strain was gastritis. Stratification by sex revealed that 88.6% of the women infected with *dupA*-positive strains had gastritis, whereas only 44.4% of the men likewise infected had

this disease, with the difference between the two groups being statistically significant ( $p = 0.0020$ ) (Table 2). Additionally, the relative risk analysis showed that for women, a *dupA*-positive *H. pylori* infection increased the chance of developing gastritis by 2-fold.

To evaluate the phylogenetic relationships of the *H. pylori* strains analysed in the present work with *H. pylori* strains from other geographical regions, partial sequences (~200 bp) of the *dupA* gene from the Brazilian strains were used for the construction of the phylogenetic tree. These partial sequences amplified from the infectious strains showed 100% homology with one another (data not shown).

The phylogenetic tree consisted of two main clades, one of which grouped the strains from the eastern countries (except for the KT290619 sequence) and the other of which grouped the strains from the western countries. The sequences obtained in this study were grouped with those from the western countries (Figure 2). The KT290619 sequence was positioned in an intermediate zone between the two main clades and was therefore used to root the phylogenetic tree.

## Discussion

*H. pylori* plays a critical role in development of various digestive diseases. However, there is no consensus regarding the main virulence factor involved in the etiology and pathogenesis of each disease [33]. Several studies have been carried out to elucidate the role of *dupA* in the development of gastric disorders [14].

In this study, carried out in the mid-western region of Brazil, the *dupA* gene was detected in 70.7% of the infectious *H. pylori* strains but was not associated with gastropathies. Similarly, in another study carried out in the south-eastern region of Brazil, the *dupA* gene was found in 92.3% of infectious *H. pylori* strains but was also not associated with the development of gastric diseases, despite its high frequency in the region [34]. Similar results were found in the study by Pacheco et al. [35], carried out on patients with dyspepsia in the state of São Paulo, Brazil, where the *dupA* gene was detected in 92.4% of samples positive for *H. pylori* and was not associated with gastric diseases. Other studies in Belgium, China, South Africa, and the USA have also found no association between the gene and gastric diseases [36].

Talebi et al. [19] demonstrated that infection by *dupA*-positive strains in fact protected against the development of gastric ulcers. Additionally, Lu et al. [13] proposed the use of the *dupA* gene as a protective biomarker for gastric atrophy, intestinal

metaplasia, and gastric cancer. By contrast, that same study revealed a positive association between the presence of the *dupA* gene in the infecting strain and the development of duodenal ulcer. In our study, it was not possible to assess the association of the *dupA* gene with ulcers, atrophy, and gastric cancer owing to the low sample size of infected individuals with these diseases.

In a study by Schmidt et al. [37], the presence of the *dupA* gene was found to be associated with chronic gastritis. This result corroborates our findings, where the presence of *dupA* in the infecting strain showed a positive correlation with the development of gastritis in women. In 2017, Paredes-Osses et al. [11] demonstrated that the severity of gastric diseases was significantly decreased in women infected with *dupA*-positive *H. pylori* strains. By contrast, *dupA* did not have any significant effect on the disease severity in male patients.

The pathogenic mechanisms of DupA in women have not yet been clarified and deserve further investigation. Given that the establishment of gastric diseases is due to virulence factors of the pathogen as well as the genetic characteristics of the host and environmental factors, it would be necessary to validate the host factors that predispose patients to gastroduodenal diseases. A study by Yeh et al. [38] provides evidence that polymorphisms in the matrix metalloproteinase-3 promoter contribute to the increased susceptibility of *H. pylori*-infected women to duodenal ulcers.

The phylogenetic analysis showed that the *dupA* sequences from this study were grouped in the same clade as sequences from strains isolated from patients residing in western countries (Argentina, Brazil, and Portugal). This grouping may have been influenced by geographical proximity or by the migration or transit history of the peoples of those countries. It is important to consider that Brazil was once colonised by Portugal and for many years was dependent on this country, and the intense movement of people between the two countries could have increased the chances of transmission of *H. pylori* strains.

The grouping of the sequences from the eastern countries (China, India, and Japan) had strong statistical support, indicating their total separation from the sequences from the western countries. This genetic separation between western and eastern countries has also been described by Chiurillo et al. [21], who used *H. pylori iceA1* sequences (encoding a virulence factor) from Venezuelan strains. Although the number of *dupA* sequences from western strains is limited in the GenBank database, our phylogenetic tree was similar to that reported for other *H. pylori* virulence genes [39].

The *dupA* sequences isolated in this study revealed a high rate of homology, suggesting that the gene is highly conserved in circulating strains in mid-western Brazil. This is likely related to the fact that isolates from a single individual, a family member, and a specific geographical region are often clonal over short periods of time, despite that the general population structure of *H. pylori* is panmictic [40].

This study was limited by the small number of samples screened. Therefore, a more comprehensive phylogeographic analysis with a larger number of samples is needed to elucidate the impact of the genetic heterogeneity of *H. pylori* on patients with dyspepsia in Brazil. Notwithstanding, this is the first study that has used partial sequences of *dupA* from *H. pylori* strains in Brazil to determine their phylogenetic relationships and origin.

## Conclusion

Presence of *dupA* in the infecting strain cannot be considered a biomarker of gastropathies in the study population. However, in women, infection with *dupA*-positive *H. pylori* increases the risk of developing gastritis. The *dupA* gene is highly conserved among circulating strains in mid-western Brazil. Our data provide perspectives for future studies aiming to evaluate parasite-host relationship factors, which can influence development of gastropathies.

## DECLARATIONS

**Funding:** Own funding

**Conflicts of interest/Competing interests:** Lucas Silva, Ana Oliveira, Aline Gama, Amanda Ramos; Antonio Silva, Angel Blanco, José Vieira, Lucas Rasmussem, Lilian Carneiro and Mônica Barbosa, declare that they have no conflict of interest.

**Availability of data and material:** All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

**Code availability:** Not applicable

## Ethical approval

The study was conducted according to the ethical standards of the Research Ethics Committee of the University Hospital of the Federal University of Goiás (HC/UFG), under the opinion number 2.519.032, according to Resolution CNS/196/96. **Authors' contributions:** LLLS and AKSO performed data collection, data analysis, interpretation

and wrote the scientific work; ARG and JDGV helped in scientific writing and data collection; AMTCS, AJVB and LTR data analysis; LLC and MSB conceived the study, participated in its design, coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## References

1. Burucoa C, Axon A (2017) Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 22:e12403. <https://doi.org/10.1111/hel.12403>
2. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JY, Kaplan GG, Ng SC (2017) Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 153:420–429. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
3. Guisset M, Coton T, Rey P, Debonne JM (1997) *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Med Trop (Mars)* 57:77–82. <https://doi.org/10.4103/1319-3767.54743>
4. Zamani M, Ebrahimitabar F, Zamani V, Miller WH, Alizadeh-Navaei R, Shokri-Shirvani J, Derakhshan MH (2018) Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 47:868–876. <https://doi.org/10.1111/apt.14561>
5. Baj J, Forma A, Sitarz M, Portincasa P, Garruti G, Krasowska D, Maciejewski R (2020) *Helicobacter pylori* virulence factors-mechanisms of bacterial pathogenicity in the gastric microenvironment. *Cells* 10:27. <https://doi.org/10.3390/cells10010027>
6. Buzás GM (2018) Benign and malignant gastroduodenal diseases associated with *Helicobacter pylori*: a narrative review and personal remarks in 2018. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 64:280–296. <https://doi.org/10.23736/S1121-421X.18.02481-9>
7. IARC Working Group (1994) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon.
8. Zhang RG, Duan GC, Fan QT, Chen SY (2016) Role of *Helicobacter pylori* infection in pathogenesis of gastric carcinoma. *World J Gastrointest Pathophysiol* 7:97–107. <https://dx.doi.org/10.4291/wjgp.v7.i1.97>
9. Backert S, Tegtmeyer, Selback M (2010) The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis. 15:163–176. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2010.00759.x>
10. Pandya HB, Agravat HH, Patel JS (2017) Prevalence of specific *Helicobacter pylori* *cagA*, *vacA*, *iceA*, *ureC* genotypes and its clinical relevance in the patients with acid-peptic diseases. *J Clin Diagn Res* 11:DC23–DC26.

<https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/27812.10457>

11. Paredes-Osses E, Sáez K, Sanhueza E, Hebel S, González C, Briceño C, García Cancino A (2017) Association between *cagA*, *vacAi*, and *dupA* genes of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal pathologies in Chilean patients. *Folia Microbiol (Praha)* 62:437–444. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0514-y>
12. Sayehmiri F, Kiani F, Sayehmiri K, Soroush S, Asadollahi K, Alikhani MY, Delpisheh A, Emaneini M, Bogdanović L, Varzi AM, Zarrilli R, Taherikalani M (2015) Prevalence of *cagA* and *vacA* among *Helicobacter pylori*-infected patients in Iran: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dev Ctries* 9:686–696. <https://doi.org/10.3855/jidc.5970>.
13. Lu H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y (2005) Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 128:833–848. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.01.009>
14. Alam J, Sarkar A, Karmakar BC, Ganguly M, Paul S, Mukhopadhyay AK (2020) Novel virulence factor *dupA* of *Helicobacter pylori* as an important risk determinant for disease manifestation: An overview. *World J Gastroenterol* 26:4739–4752. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i32.4739>
15. Matsunari O, Shiota S, Suzuki R, Watada M, Kinjo N, Murakami K, Fujioka T, Kinjo F, Yamaoka Y (2012) Association between *Helicobacter pylori* virulence factors and gastroduodenal diseases in Okinawa, Japan. *J Clin Microbiol* 50:876–883. <https://doi.org/10.1128/JCM.05562-11>
16. Camilo V, Sugiyama T, Touati E (2017) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 22:1–6. <https://doi.org/10.1111/hel.12405>
17. Vinagre IDF, de Queiroz AL, da Silva Júnior MR, Vinagre RMDF, Martins LC (2015) Infecção pelo *Helicobacter pylori* em pacientes com diferentes doenças gastrointestinais do Norte do Brasil. *ArqGastroenterol* 52:266–271. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032015000400004>
18. Alam J, Maiti S, Ghosh P, De R, Chowdhury A, Das S, Macaden R, Devarbhavi H, Ramamurthy T, Mukhopadhyay AK (2012) Significant association of the *dupA* gene of *Helicobacter pylori* with duodenal ulcer development in a South-east Indian population. *J Med Microbiol* 61:1295–1302. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.038398-0>
19. Talebi BAA, Taghvaei T, Wolfram L, Kusters JG (2012) Infection with *Helicobacter pylori* strains lacking *dupA* is associated with an increased risk of gastric ulcer and gastric cancer development. *J Med Microbiol* 61:23–30. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.027052-0>
20. Kusters JG, Van Vliet AHM, Kuipers EJ (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 19:449–490. <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>

21. Chiurillo MA, Moran Y, Cañas M, Valderrama E, Granda N, Sayegh M, Ramírez JL (2013) Genotyping of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes shows high diversity of strains infecting patients in western Venezuela. *Int J Infect Dis* 17:e750–e756. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.03.004>
22. Liu J, He C, Chen M, Wang Z, Xing C, Yuan Y (2013) Association of presence/absence and on/off patterns of *Helicobacter pylori oipA* gene with peptic ulcer disease and gastric cancer risks: a meta-analysis. *BMC Infect Dis* 13:555. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-555>
23. Yong X, Tang B, Li BS, Xie R, Hu CJ, Luo G, Qin Y, Dong H, Yang SM (2015) *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways. *Cell Commun Signal* 13:30. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-555>
24. McClain M, Beckett AC, Cover TL (2017) *Helicobacter pylori* vacuolating toxin and gastric cancer. *Toxins (Basel)* 9:316. <https://doi.org/10.3390/toxins9100316>
25. Wang MY, Chen C, Gao XZ, Li J, Yue J, Ling F, Wang XC, Shao SH (2013) Distribution of *Helicobacter pylori* virulence markers in patients with gastroduodenal diseases in a region at high risk of gastric cancer. *Microb Pathog* 59–60:13–18. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.04.001>
26. Liu J, Liu H, Zhang T, Ren X, Nadolny C, Dong X, Huang L, Yuan K, Tian W, Jia Y (2014) Serum *Helicobacter pylori* NapA antibody as a potential biomarker for gastric cancer. *Sci Rep* 4:4143. <https://doi.org/10.1038/srep04143>
27. Souod N, Sarshar M, Dabiri H, Momtaz H, Kargar M, Mohammadzadeh A, Abdi S (2015) The study of the *oipA* and *dupA* genes in *Helicobacter pylori* strains and their relationship with different gastroduodenal diseases. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 8:S47–S53.
28. Sallas ML, Melchiades JL, Zabaglia LM, Moreno JRP, Orcini WA, Chen ES, Smith MAC, Payão SLM, Rasmussen LT (2017) Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *dupA* and *oipA* genotypes in patients with gastric disease. *Adv Microbiol* 7:1–9. <https://doi.org/10.4236/aim.2017.71001>
29. Emura F, Sharma P, Arantes V, Cerisoli C, Parra-Blanco A, Sumiyama K, Araya R, Sobrino S, Chiu P, Matsuda K, González R, Fujishiro M, Tajiri, H. (2019) Principles and practice to facilitate complete photodocumentation of the upper gastrointestinal tract: World Endoscopy Organization position statement. *Dig Endosc* 32:168–179. <https://doi.org/10.1111/den.13530>
30. Coelho LGV, Marinho JR, Genta R, Ribeiro LT, Passoss MDCF, Zaterka Set al (2018) IVth Brazilian consensus conference on *Helicobacter pylori* infection. *Arq Gastroenterol* 55:97–121. <https://doi.org/10.1590/s0004-2803.201800000-20>

31. Stolte M, Meining A (2001) The updated Sydney system: classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment. *Can J Gastroenterol* 15:591–598. <https://doi.org/10.1155/2001/367832>
32. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
33. Abadi AT, Perez-Perez G (2016) Role of *dupA* in virulence of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 22:10118–10123. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i46.10118>
34. Gomes LI, Rocha GA, Rocha AM, Soares TF, Oliveira CA, Bittencourt PF, Queiroz DM (2008) Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with *dupA*-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients. *Int J Med Microbiol* 298:223–230. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.05.006>
35. Pacheco AR, Proença-Módena JL, Sales AI, Fukuhara Y, da Silveira WD, Pimenta-Módena JL, de Oliveira RB, Brocchi M (2008) Involvement of the *Helicobacter pylori* plasticity region and *cag* pathogenicity island genes in the development of gastroduodenal diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 11:1053-9. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0549-8>
36. Argent RH, Burette A, Miendje Deyi VY, Atherton JC (2007) 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* 45:1204–1206. <https://doi.org/10.1086/522177>
37. Schmidt HM, Andres S, Kaakoush NO, Engstrand L, Eriksson L, Goh KL, Fock KM, Hilmi I, Dhamodaran S, Forman D, Mitchell H (2009) 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*, 1:1-5. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-1-5>
38. Yeh YC, Cheng HC, Chang WL, Yang HB, Sheu BS (2010) Matrix metalloproteinase-3 promoter polymorphisms but not *dupA-H. pylori* correlate to duodenal ulcers in *H. pylori*-infected females. *BMC Microbiol* 10:218. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-218>
39. Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y (2012) Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infect Genet Evol* 12:203–213. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.002>
40. Israel DA, Salama N, Krishna U, Rieger UM, Atherton JC, Falkow S, Peek RM Jr (2001) *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14625–14630. <https://doi.org/10.1073/pnas.251551698>

**Table 1** Primer sequences, PCR amplification conditions, and gene fragment sizes

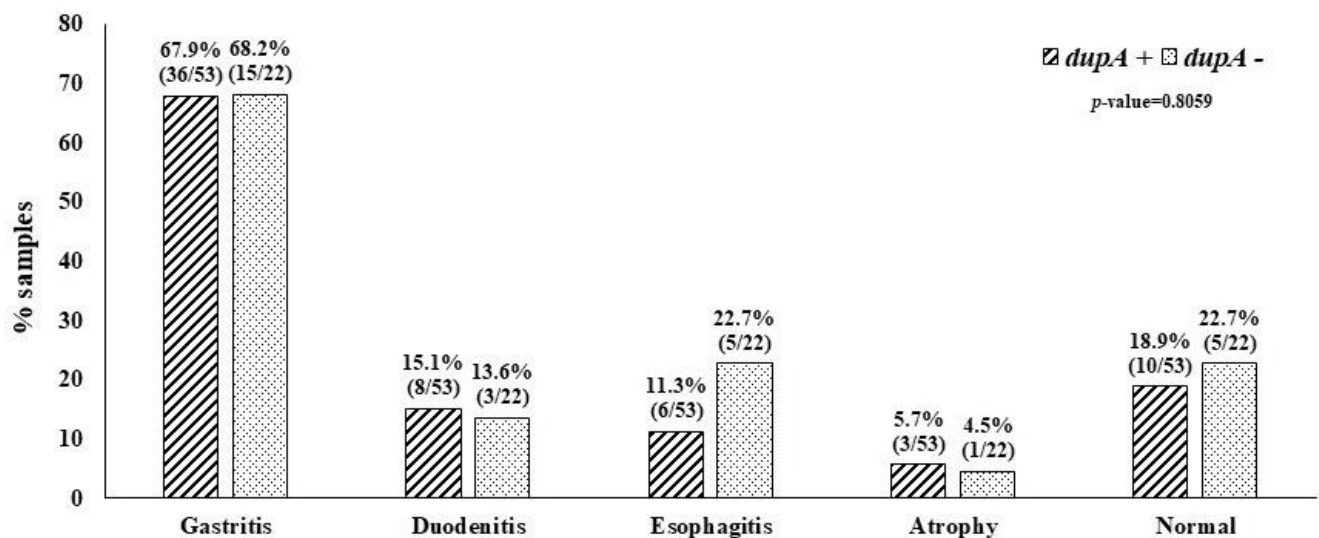
Gene	Primers	Sequence (5'-3')	Amplification condition	Size (bp)
16S rRNA	<i>hpx1</i>	CTGGAGARACTAAGYCCTCC	94°C, 1 min; 59°C, 1 min; 72°C, 1 min (40 cycles)	150
	<i>hpx2</i>	GAGGAATACTCATTGCGAAGGCGA		
<i>dupA</i>	<i>dupA1</i>	CGTGATCAATATGGATGCTT	94°C, 45 s; 52°C, 45 s; 72°C, 45 s (35 cycles)	197
	<i>dupA2</i>	TCTTTCTAGCTTGAGCGA		

**Table 2.** *Helicobacter pylori dupA* positivity in patients with gastritis

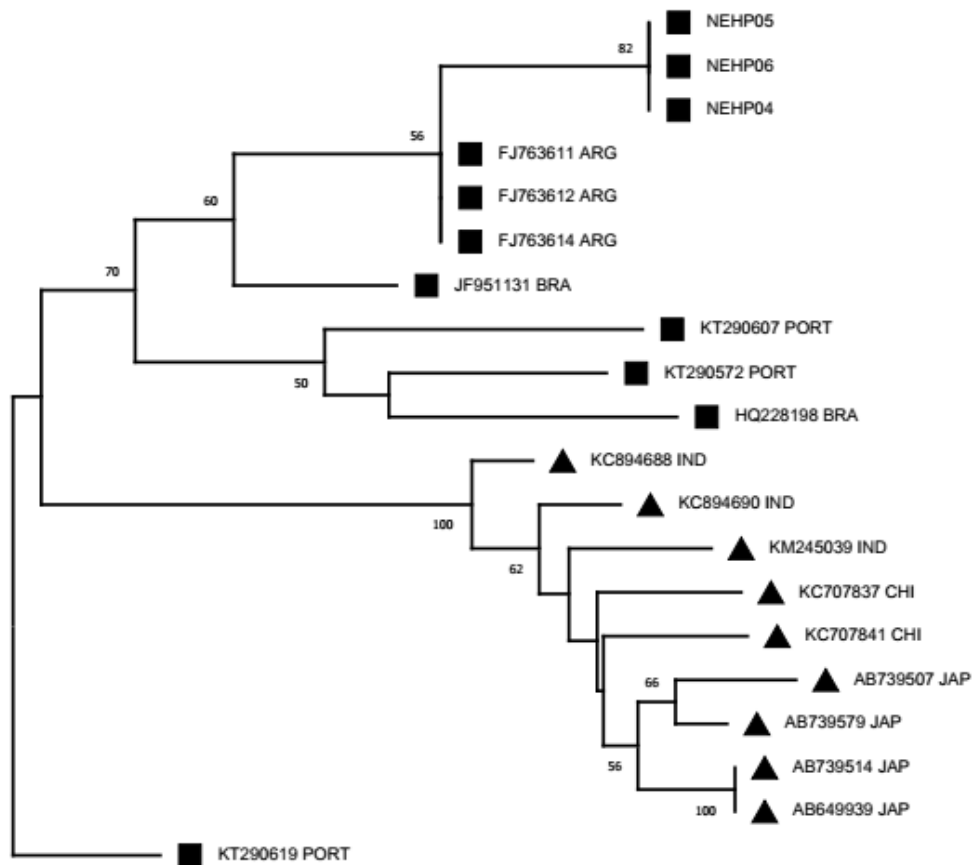
<i>dupA</i> +	Female		Male		<i>p</i> -value
	<i>n</i>	<i>f</i> (%)	<i>n</i>	<i>f</i> (%)	
With gastritis	31	88.6	8	44.4	0.002
Without gastritis	4	11.4	10	55.6	
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>100</b>	<b>18</b>	<b>100</b>	

### Figure captions

**Fig. 1** Gastric disease profile of patients infected with *dupA*-positive and *dupA*-negative *Helicobacter pylori* strains.



**Fig. 2** Phylogenetic tree based on the partial sequences of the *dupA* gene of *Helicobacter pylori* strains from Brazil (local strains) and sequences from strains reported in different parts of the world (available in public databases). Triangles: strains from eastern countries; squares: strains from western countries.



# Capítulo V

---

*Conclusão*

---

## CONCLUSÃO

---

- A técnica de PCR demonstrou sensibilidade 1,7 vezes maior que o exame histopatológico na detecção de *H. pylori*;
- A prevalência da infecção por *H. pylori* foi estimada em 64,1% na população de Goiás;
- O *cagA* foi o gene mais detectado, presente em 80,0% nas amostras de DNA de *H. pylori*, seguido de *dupA* (70,7%) e *vacA* (56,0%);
- Cepas circulantes de *H. pylori* no Centro-Oeste do Brasil apresentaram altas heterogeneidade na presença dos genes de virulência *cagA*, *vacA* e *dupA*;
- A combinação dos genes de virulência na cepa infectante pode interferir diretamente no desenvolvimento de doenças gástricas graves como o câncer gástrico;
- A presença de *dupA* na cepa infectante não foi considerado um fator de risco ou de proteção para gastropatias;
- A infecção por *H. pylori dupA* positiva aumenta a chance de desenvolvimento de gastrite em mulheres;
- As sequências de *dupA* agruparam no mesmo clado que sequências oriundas de países ocidentais e a alta homologia entre elas, sugere que o gene *dupA* é altamente conservado nas cepas circulantes do estado de Goiás;
- Mais estudos são necessários para esclarecer o papel da interação entre os vários fatores de virulência de *H. pylori* no estabelecimento de patologias gástricas;
- É necessária uma análise filogeográfica mais abrangente para elucidar impacto da heterogeneidade genética de *H. pylori* em pacientes dispépticos do Brasil.

---

---

*Referências bibliográficas*

---

---

- Abadi ATB, Taghvaei T, Wolfram L, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains lacking dupA is associated with an increased risk of gastric ulcer and gastric cancer development. *Journal of Medical Microbiology*, v. 61, n. 1, p. 23–30, 2012.
- Ables, AZ, Simon I, Melton ER. Update on *Helicobacter pylori* treatment. *American Family Physician*, v. 75, n. 3, p. 351–358, 2007.
- Adu-Aryee NA, Aabakken L, Dedey F, et al. Comparison of endoscopic based diagnosis with *Helicobacter urease* test for *Helicobacter pylori* infection. *BMC Research Notes*, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2016.
- Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, et al. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. v. 20, n. 19, p. 5137-5142, 1992.
- Alm RA, Trust TJ. Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *Journal of molecular medicine*. v. 77, n. 12, p. 834-846, 1999.
- Alzahrani S, Lina TT, Gonzalez J, et al. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 36, p. 12767–12780, 2014.
- Amieva MR, El-Omar EM. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, v. 134, n. 1, p. 306–323, 2008.
- Andersen LP, Wadström T. Basic bacteriology and culture. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, eds. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, Washington (DC): ASM Press; 2001.
- Arismendi-Morillo G, Hernández I, Mengual , et al. Comparison of three methods based on endoscopic gastric biopsies for diagnosis of *Helicobacter pylori* active infection in a clinical setting. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 48, n.3, p. 190-194, 2011.
- Aspholm M, Olfat, F, Nordén J, et al. SabA is the *Helicobacter pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS Pathogens*, v. 2, n. 10, p. 0989–1001, 2006.
- Atapoor S, Dehkordi FS, Rahimi E. Detection of *Helicobacter pylori* in various types of vegetables and salads. *Jundishapur Journal of Microbiology*, v. 7, n. 5, p. 1–4, 2014.
- Avenaud P, Marais A, Monteiro L, et al. Detection of *Helicobacter* species in the liver of patients with and without primary liver carcinoma. *Cancer*, v. 89, n. 7, p. 431-1439, 2000.
- Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *Journal of Advanced Research*, v. 6, n. 4, p. 539–547, 2015.
- Bauer B, Meyer TF. The human gastric pathogen *Helicobacter pylori* and its association with gastric cancer and ulcer disease. *Ulcers*, v. 2011, p. 1–23, 2011.
- Bazin T, Mfondi AN, Julie C, et al. Contribution of genetic amplification by PCR for

the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in patients receiving proton pump inhibitors. *United European Gastroenterology Journal*, v. 6, n. 8, p. 1267–1273, 2018.

Bellolio E, Riquelme I, Riffo-Campos A, et al. Assessment of Gastritis and Gastric Cancer Risk in the Chilean Population Using the OLGA System. *Pathology Oncology Researh*, v. 25, n. 3, p. 1135-1142, 2019.

Bittencourt PFS, Rocha GA, Penna FJ, et al. Úlcera péptica gastroduodenal e infecção pelo *Helicobacter pylori* na criança e adolescente. *Jornal de Pediatria*, v. 82, n. 5, p. 325–334, 2006.

Blaser MJ, Musser JM, Berg DE. Bacterial polymorphisms *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *Journal Clinical Investigation.*, v. 107, n. 7, p. 767–773, 2001.

Boneca IG, Reuse H, Epinat JC, et al. A revised annotation and comparative analysis of *Helicobacter pylori* genomes. *Nucleic Acids Research*, v. 31, n. 6, p. 1704–1714, 2003.

Boto REF, Almeida P, Queiroz JA. Thiocarbocyanine as ligand in dye-affinity chromatography. *Biomedical Chromatography*, v. 288, n. 3, p. 278–288, 2008.

Bridge DR, Merrell SD. Polymorphism in the *Helicobacter pylori* CagA and VacA toxins and disease. *Gut Microbes*, v. 4, n. 2, p. 101–117, 2013.

Brown LM. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic Reviews*, v. 22, n. 2, p. 283–297, 2000.

Burkitt MD, Duckworth CA, Williams JM, et al. *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: Insights from in vivo and ex vivo models. *Disease Models and Mechanisms*, v. 10, n. 2, p. 89–104, 2017.

Camilo V, Sugiyama T, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, v. 22, p. 1–6, 2017.

Chauhan N, Tay ACY, Marshall BJ, et al. *Helicobacter pylori* VacA, a distinct toxin exerts diverse functionalities in numerous cells: An overview. *Helicobacter*, v. 24, n. 1, p. 1–9, 2019.

Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, et al. Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *The American Journal of Gastroenterology*, v. 112, n. 2, p. 212–238, 2017.

Coelho LGV, Marinho JR, Genta R, et al. IVth Brazilian consensus conference on *Helicobacter pylori* infection. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 55, n. 2, p. 97–121, 2018.

Coelho LGV, Trindade OR, Leão LA, et al. Prospective study for validation of a single protocol for the 13C-urea breath test using two different devices in the diagnosis of *H. pylori* infection. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 56, n. 2, p. 197–201, 2019.

Costa K, Bacher G, Allmaier G, et al. The morphological transition of *Helicobacter pylori* cells from spiral to coccoid is preceded by a substantial modification of the cell wall. *Journal of Bacteriology*, v. 181, n. 12, p. 3710-3715, 1999.

Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 4. p. 320-332. 2005.

Croxen MA, Sisson G, Melano R, et al. The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor tlpB (HP0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa. *Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 7, p. 2656–2665, 2006.

Desai HG, Gill HH, Shankaran K, Mehta PR, et al. Dental plaque: a permanent reservoir of *Helicobacter pylori*? *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 26, n. 11, p. 1205-1208, 1991.

Dimitriadi D. *Helicobacter pylori*: A sexually transmitted bacterium? *Central European Journal of Urology*, v. 67, n. 4, p. 407–409, 2014.

Dore MP, Malaty HM, Graham DY, et al. Risk Factors Associated with *Helicobacter pylori* infection among children in a defined geographic area. *Clinical Infect Disease*. v. 35, n. 3, p. 240–245, 2002.

Emara MH, Mohamed SY, Abdel-Aziz HR. *Lactobacillus reuteri* in management of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients: A double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, v. 7, n. 1, p. 4–13, 2014.

Eslick GD. *Helicobacter pylori* infection transmitted sexually via oral-genital contact: A hypothetical model. *Sexually Transmitted Infections*, v. 76, n. 6, p. 489–492, 2000.

Falush D, Kraft C, Taylor NS, et al. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, v. 98, n. 26. p. 15056-15061, 2001.

Fashner J, Gitu AC. Diagnosis and treatment of peptic ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection. *American Family Physician*, v. 91, n. 4, p. 236–242, 2015.

Felsenstein, J. Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist*. The University of Chicago Press/The American Society of Naturalists. v. 125, n. 1, p. 1-15, 1985.

Foegeding NJ, Caston RR, McClain, et al. An overview of *Helicobacter pylori* VacA toxin biology. *Toxins*, v. 8, n. 6, p. 1–21, 2016.

Garza-González E, Perez-Perez GI, Maldonado-Garza, et al. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 6, p. 1438–1449, 2014.

Hansen LM, Dekalb DJ, Cai LP, et al. Identification of Pathogenicity Island Genes Associated with Loss of Type IV Secretion Function During Murine Infection with *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*. v. 20, n. 6, p. 19, 2020.

Harvey VC, Acio CR, Bredehoft AK, et al. Repetitive sequence variations in the promoter region of the adhesin-encoding gene *sabA* of *Helicobacter pylori* affect transcription. *Journal of Bacteriology*, v. 196, n. 19, p. 3421–3429, 2014.

Höcker M, Hohenberger P. *Helicobacter pylori* virulence factors - One part of a big picture. *Lancet*, v. 362, n. 9391, p. 1231–1233, 2003.

Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. v. 153, n. 2, p. 420-429, 2017.

Israel DA, Peek Jr RM. Surreptitious manipulation of the human host by *Helicobacter pylori*. *Gut Microbes*, v. 1, n. 2, p. 119–127, 2010.

Junqueira ACM, Ratan A, Acerbi E. et al. The microbiomes of blowflies and houseflies as bacterial transmission reservoirs. *Science Reports*, v. 7, p. 16324, 2017.

Kalali B, Mejías-Luque R, Javaheri A, et al. *Helicobacter pylori* virulence factors: Influence on immune system and pathology. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, 2014.

Kalali B, Formichella L, Gerhard M. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Changes towards the Future. *Diseases*, v. 3, n. 3, p. 122–135, 2015.

Kavitt RT, Lipowska AM, Anyane-Yeboah, et al. Diagnosis and Treatment of Peptic Ulcer Disease. *American Journal of Medicine*, v. 132, n. 4, p. 447–456, 2019.

Kersulyte D, Mukhopadhyay AK, Valapatiño B, et al. Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 11, p. 3210–3218, 2000.

Kim IJ, Blanke SR. Remodeling the host environment: modulation of the gastric epithelium by the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA). *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 2, n.1, p. 37, 2012.

Ko JS, Kim KM, Seo JK, et al. *cagA*, *vacA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Korean children. *Pediatrics International*, v. 50, n. 5, p. 628–631, 2008.

Kodaira MS, Escobar AMU, Grisi S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. *Revista de Saúde Pública*, v. 36, n. 3, p. 356–369, 2002.

Kusters JG, Van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 3, p. 449–490, 2006.

Kutter S, Buhrdorf R, Hass J, et al. Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori*

*cag* type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *Journal of Bacteriology*, v. 190, n. 6, p. 2161–2171, 2008.

Ladeira MSP, Salvadori DMF, Rodrigues MAM. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 4, p. 335–342, 2003.

Liu J, He C, Chen M, et al. Association of presence/absence and on/off patterns of *Helicobacter pylori oipA* gene with peptic ulcer disease and gastric cancer risks: A meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, v. 13, n. 1, 2013.

Liu J, Liu H, Zhang T, et al. Serum *Helicobacter pylori* NapA antibody as a potential biomarker for gastric cancer. *Scientific Reports*, v. 4, n. May, p. 1–2, 2014.

Liu KSH, Wong IOL, Leung WK. *Helicobacter pylori* associated gastric intestinal metaplasia: Treatment and surveillance. *World Journal of Gastroenterology*, v. 22, n. 3, p. 1311–1320, 2016.

Lopes AI, Vale FF, Oleastro M. *Helicobacter pylori* infection - Recent developments in diagnosis. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 28, p. 9299–9313, 2014.

Lu H, Hsu P, Graham DY, et al. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2005.

Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection - The Maastricht IV/ Florence consensus report. *Gut*, v. 61, n. 5, p. 646–664, 2012.

Mantero P, Matus GS, Corti RE, et al. *Helicobacter pylori* and corpus gastric pathology are associated with lower serum ghrelin. *World Journal of Gastroenterology*, v. 24, n. 3, p. 397–407, 2018.

Marshall B, Adams PC. *Helicobacter pylori*: A nobel pursuit? *Canadian Journal of Gastroenterology*. v. 22, n. 11, p. 895–896, 2008.

Marshall BJ, Warren JR. Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of Patients With Gastritis and Peptic Úlceration. *The Lancet*, v. 323, n. 8390, p. 1311–1315, 1984.

Matsunari O, Shiota R, Suzuki R, et al. Association between *Helicobacter pylori* virulence factors and gastroduodenal diseases in Okinawa, Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 3, p. 876–883, 2012.

McClain MS, Beckett AC, Cover TL. *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin and Gastric Cancer. *Toxins*, v. 9, n. 10, p. 316, 2017.

McDonald AM, Sarfati D, Baker MG, et al. Trends in *Helicobacter pylori* infection among Māori, Pacific, and European Birth cohorts in New Zealand. *Helicobacter*. v. 20, n; 2, p. 139, 145, 2015.

Merrell DS, Goodrich ML, Otto G, et al. pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 6, p. 3529–3539, 2003.

- Nagase L, Hayashi T, Senda T, et al. Dramatic increase in SHP2 binding activity of *Helicobacter pylori* Western CagA by EPIYA-C duplication: Its implications in gastric carcinogenesis. *Scientific Reports*, v. 5, n. October, p. 1–13, 2015.
- Noach LA, Rolf TM, Tytgat GNJ. Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal Mucosa. *Journal of Clinical Pathology*, v. 47, n. 8, p. 699–704, 1994.
- Noto JM, Chopra A, Loh JT, et al. Pan-genomic analyses identify key *Helicobacter pylori* pathogenic loci modified by carcinogenic host microenvironments. *Gut*, v. 67, n. 10, p. 1793-1804, 2018.
- Pakbaz Z, Shirazi MH, Ranjbar R., et al. Frequency of *sabA* gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients in Tehran, Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, v. 15, n. 9, p. 767–770, 2013.
- Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 2, n. July, p. 92, 2012.
- Pang SS, Nguyen STS, Perry AJ, et al. The three-dimensional structure of the extracellular adhesion domain of the sialic acid-binding adhesin SabA from *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 10, p. 6332–6340, 2014.
- Paredes-Osses E, Sáez K, Sanhueza E, et al. Association between *cagA*, *vacAi*, and *dupA* genes of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal pathologies in Chilean patients. *Folia Microbiologica*, v. 62, n. 5, p. 437–444, 2017.
- Peek Jr, RM. *Helicobacter pylori* infection and disease: from humans to animal models. *Disease Model Mechanisms*, v. 1, n. 1, p. 50-55, 2008.
- Peng C, Hu Y, Ge ZM, et al. Diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infections in children and elderly populations. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, v. 5, n. 4, p. 243–251, 2019.
- Pflock M, Kennard S, Finsterer N, et al. Acid-responsive gene regulation in the human pathogen *Helicobacter pylori*. *Journal of Biotechnology*, v. 126, n. 1, p. 52–60, 2006.
- Pride DT, Meinersmann RJ, Blaser MJ. Allelic variation within *Helicobacter pylori* *babA* and *babB*. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 2, p. 1160–1171, 2001.
- Ramos AFPL, Silva LLL, Silva AMTC, et al. *Helicobacter pylori* infection and risk factors in the development of the gastroduodenal diseases in a population from the central-west region of Brazil. *Sapiencia*, p. 181–196, 2019.
- Reshetnyak VI, Reshetnyak T M. Significance of dormant forms of *Helicobacter pylori* in ulcerogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, v. 23, n. 27, p. 4867–4878, 2017.

- Ricci, V, Romano M, Boquet P. Molecular cross-talk between *Helicobacter pylori* and human gastric mucosa. *World Journal of Gastroenterology*, v. 17, n. 11, p. 1383–1399, 2011.
- Sachs G, Scott DR. *Helicobacter pylori*: Eradication or preservation. *F1000 Medicine Reports*, v. 4, n. 1, p. 2–6, 2012.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1 jul. 1987.
- Sakagami T, Dixon M, O'Rourke J, et al. Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. *Gut*, v. 39, n. 5, p. 639–648, 1996.
- Salama N, Guillemin K, McDaniel TK, Sherlock G, Tompkins L, Falkow S. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 26, p. 14668–14668, 2000.
- Scott DR, Marcus EA, Wen Y, et al. Cytoplasmic histidine kinase (HP0244)-regulated assembly of urease with UreI, a channel for urea and its metabolites, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, is necessary for acid survival of *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*, v. 192, n. 1, p. 94–103, 2010.
- Shi R, Xu S, Zhang H, et al. Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in chinese populations. *Helicobacter*, v. 13, n. 2, p. 157–165, 2008.
- Sobala GM, Crabtree JE, Dixon MF, et al. Acute *Helicobacter pylori* infection: Clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut*, v. 32, n. 11, p. 1415–1418, 1991.
- Solnick JV, Vandamme P. Taxonomy of the *Helicobacter* Genus. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, eds. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001.
- Souod N, Sarshar M, Dabiri H. et al. The study of the *oipA* and *dupA* genes in *Helicobacter pylori* strains and their relationship with different gastroduodenal diseases. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, v. 8, n. Suppl 1, p. S47-53, 2015.
- Sozzi M, Tomasini ML, Vindigni C, et al. Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 146, n. 5, p. 262–270, 2005.
- Steer HW. Surface morphology of the gastroduodenal mucosa in duodenal ulceration. *Gut*, v. 25, n. 11, p. 1203–1210, 1984.
- Šterbenc, A. Jarck E, Poljack, et al. *Helicobacter pylori* virulence genes. *World Journal of Gastroenterology*, v. 25, n. 33, p. 4870–4884, 2019.
- Stolte M, Meining A. The updated Sydney system: Classification and grading of

gastritis as the basis of diagnosis and treatment. *Canadian Journal of Gastroenterology*, v. 15, n. 9, p. 591–598, 2001.

Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infections. *The New English Journal of Medicine*, v. 347, n. 15, p. 1175–1186, 2002.

Sullivan PB, Thomas JE, Wight DG, et al. *Helicobacter pylori* in Gambian children with chronic diarrhoea and malnutrition. *Archives of Disease in Childhood*, v. 65, n. 2, p. 189–191, 1990.

Suzuki RB, Lopes RAB, Lopes GAC, et al. Low *Helicobacter pylori* primary resistance to clarithromycin in gastric biopsy specimens from dyspeptic patients of a city in the interior of São Paulo, Brazil. *BMC Gastroenterology*, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2013.

Takahashi-Kanemitsu, A, Knight CT, Hatakeyama M. Molecular anatomy and pathogenic actions of *Helicobacter pylori* CagA that underpin gastric carcinogenesis. *Cellular and Molecular Immunology*, v. 17, n. 1, p. 50–63, 2020.

Talaei R, Souod N, Momtaz H, et al. Milk of livestock as a possible transmission route of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, v. 8, n. 2, p. S30–S36, 2015.

Teixeira TF, Souza IKF, Rocha RDR. *Helicobacter pylori*: infecção, diagnóstico laboratorial e tratamento. *Percurso Acadêmico*, v. 6, n. 12, p. 481, 2017.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 24, p. 4876–4882, 15 dez. 1997.

Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. v. 388, n. 6642, p. 539–547, 1997.

Vinagre IDF, Queiroz AL, Silva Junior MR, et al. Infecção pelo *Helicobacter pylori* em pacientes com diferentes doenças gastrointestinais do Norte do Brasil. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 52, n. 4, p. 266–271, 2015.

Wang YK, Kuo FC, Liu MC, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, n. 40, p. 11221–11235, 2015.

Wannmacher LA. erradicação do *Helicobacter pylori*. Organização Pan-Americana da Saúde/ Organização Mundial da Saúde - Brasil, 2007., p. 1–6, 2009.

Watari J, Chen N, Amenta PS, et al. *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 18, p. 5461–5473, 2014.

Weeks DL, Sachs G. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology*, v. 40, n. 6, p. 1249–1259, 2001.

Yahiro K, Hirayama T, Moss J, et al. New insights into VacA intoxication mediated through its cell surface receptors. *Toxins*, v. 8, n. 5, p. 1–12, 2016.

Yamashita Y, Hatakeyama M. PAR1b takes the stage in the morphogenetic and motogenetic activity of *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. *Cell Adhesion and Migration*, v. 7, n. 1, p. 11–17, 2013.

Yamaoka Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. *Journal of Medical Microbiology*, v. 57, n. 5, p. 545–553, 2008.

Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 13, p. 7533–7538, 2000.

Yang JC, Lu CW, Lin CJ. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current status and future concepts. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 18, p. 5283–5293, 2014.

Yong X, Tang B, Li SB, et al. *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways. *Cell Communication and Signaling*, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2015.

Zamani M, Ebrahimtabar F, Zamani V, et al. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 47, n. 7, p. 868–876, 2018.

Zhang XY, Zhang PY, Aboul-Soud MAM. From inflammation to gastric cancer: Role of *Helicobacter pylori*. *Oncology Letters*, v. 13, n. 2, p. 543–548, 2017.

---

*Produção científica durante o doutoramento*

---

Neste tópico é apresentado as principais produções científicas durante o doutoramento, as demais e o currículo completo encontram-se disponíveis no link: <http://lattes.cnpq.br/5468507702490849>

---

### **PREMIAÇÕES/MENÇÕES HONROSAS**

1. Menção Honrosa como melhor trabalho na área de Microbio/Imuno/Parasito, 30ª Semana do ICB: Mas de que serve a ciência?
2. Menção honrosa como melhor trabalho apresentado por área. IV Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde.
3. Menção Honrosa como melhor trabalho na área de Microbio/Imuno/Parasito, 29ª Semana do ICB - ICB 50 anos: uma história em construção.

### **ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS**

1. Pontes, J.C; Silva, I. I. I.; L.C, Carneiro; Santiago, S.B; Barbosa, M. S. **Princípio ativo de plantas do Cerrado Brasileiro com potencial ação antimicrobiana em *Helicobacter pylori* atividade gastroprotetora.** Revista de Biotecnologia & Ciência, v. 7, p. 1-13, 2018.
2. Rodrigues, J.A; Campos, N. A. P.; Santos, B.B; A.F.P.L, Ramos; Pontes, J.C; Silva, L. L. L.; I.M.C, Calassa; A.K.S, Oliveira; L.C, Carneiro; Barbosa, M. S.; Santiago, S.B.**Genes de virulência em *Helicobacter pylori*: componentes estruturais e métodos de detecção.** Saúde & Ciência Em Ação 2013 Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde, v. 3, p. 10, 2018.
3. A.F.P.L, Ramos; Silva, L. L. L.; Silva, A. M. T. C.; Cardoso, D. M. M.; Blanco, A. J. V.; Pontes, J.C; L.C, Carneiro; M.S, Santiago. ***Helicobacter pylori*infection and risk factors in the development of gastroduodenal diseases in a population from the central-west region of Brazil.** Revista sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais, v. 8, p. 181, 2019.

4. Bartelli, T. F.; Silva, L. L. L.; Dias-Neto, E. **Genomics and epidemiology for gastric adenocarcinomas (GE4GAC): a Brazilian initiative to study gastric cancer.** Applied cancer research (online), v. 12, p. 1, 2019.
5. AMORIM, L. S. ; PASSOS, X. P. ; SILVA, A. M. T. C. ; Marques, J.M.S ; JUNIOR, M.C. ; A.K.S, Oliveira ; BARBOSA, M. S. ; SILVA, L. L. L. **Uso de lactobacillus na erradicação de *Helicobacter pylori* e na redução de reações adversas ao tratamento convencional: uma revisão integrativa.** Revista Brasileira Militar de Ciências, v. 6, p. 37, 2020.
6. SILVA, L. L. L.; Gomes, R.S. ; SILVA, M. V. T. ; JOOSTEN, LEO A. B. ; DIAS, F. R. **IL-15 enhances the capacity of primary human macrophages to control *Leishmania braziliensis* infection by IL-32 vitamin D dependent and independent pathways.** PARASITOLOGY INTERNATIONAL, v. 76, p. 1-10, 2020.
7. Matos, G.G. ; FIGUEIREDO, A. M. B. ; GONCALVES, P. H. D. ; SILVA, L. L. L. ; Ribeiro-Dias, F. ***Paracoccidioides brasiliensis* induces IL-32 and is controlled by IL-15/IL-32/ vitamin D pathway in vitro.** MICROBIAL PATHOGENESIS, v. 154, p. 1, 2021.

#### **ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICOS**

1. Jaqueline Correia Pontes, Jordão Correia Pontes, Lucas Luiz de Lima Silva, Aroldo Vieira de Moraes Filho, Carla Afonso Bitencourt, Alexander Itria, Lilian Carla Carneiro, Mônica Santiago Barbosa. **Estimates Spending of Gastric Cancer in Central Brazi.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2020.

#### **CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS**

1. Pontes, J.C; Silva, L. L. L.; L.C, Carneiro; Bitencourt, C. A. S.; Barbosa, M. **S.Potencial antimicrobiano de plantas do cerrado brasileiro com ação em *Helicobacter pylori*.** Ensino, assistência e avaliação de tecnologias na saúde. 1ed.Curitiba: Brazil Publishing, 2019, v., p. 435-.

2. Martins, Hebermar Vieira ; Lima, Michel Gentile ; Barros, Eulélia Antônio de ; Silva, Lucas Luiz de Lima ; Silva, Antonio Márcio Teodoro Cordeiro ; Ataide, Fábio Silvestre. **CRIPCOCOCOSE: ASPECTOS CLÍNICOS-LABORATORIAIS E EPIDEMIOLÓGICOS**. Ciência, Tecnologia e Inovação: Desafio para um Mundo Global 3. 15ed.: Atena Editora, 2019, v., p. 149-158.

3. Lima, Michel Gentile ; Martins, Hebermar Vieira ; Barros, Eulélia Antônio de ; Silva, Antônio Márcio Teodoro Cordeiro ; Silva, Lucas Luiz de Lima ; Ataide, Fábio Silvestre. **CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE *Staphylococcus aureus***. Ciência, Tecnologia e Inovação: Desafio para um Mundo Global 3. 13ed.: Atena Editora, 2019, v., p. 135-141.

### **CARTILHAS EDUCATIVAS ACEITAS PARA PUBLICAÇÃO**

1. Soares, G. A. S.; Oliveira, A. K. S.; Moraes, F. A. S.; Pontes, J. C.; Ramos, A. F. L. P.; Sousa, G.R.; Marques, L. O. R.; Sousa, G.R.; Carneiro, L. C.; Silva, L. L. L.; Barbosa, M. S. **Conheça a bactéria que vive no estômago: *Helicobacter pylori***. Sociedade Brasileira de Ciências Aplicadas a Saúde. Goiânia, 2020.

2. Ramos, A. F. L. P.; Marques, L. O. R.; Sousa, G.R.; Silveira, L.G.; Soares, G. A. S.; Oliveira, A. K. S.; Moraes, F. A. S.; Pontes, J. C.; Carneiro, L. C.; Silva, L. L. L.; Barbosa, M. S. **O que você precisa saber sobre câncer gástrico**. Sociedade Brasileira de Ciências Aplicadas a Saúde. Goiânia, 2020.

---

---

*Apêndices e anexos*

---

---

## APÊNDICÊS

---

### APÊNCICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), em uma pesquisa. Meu nome é Mônica Santiago Barbosa, sou a pesquisadora responsável e minha área de atuação é Diagnóstico Molecular.

Após ler com atenção este documento ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, *assine em todas as folhas e ao final deste documento*, que está em duas vias e também será assinado por mim, pesquisador, em todas as folhas, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis, Dra Mônica Santiago Barbosa nos telefones: (62)98117-2885. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: 32 69 83 38 e 32 69 84 26 ou no endereço: 1a Avenida S/No Setor Leste Universitário, Unidade de Pesquisa Clínica, 2o andar. Horário de funcionamento: 2a a 6a das 7:00 às 17:00hs.

#### INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ PRECISA SABER SOBRE A PESQUISA:

**Título:** Análise de genes de virulência de *Helicobacter pylori* e correlação com patologias gástricas.

Eu \_\_\_\_\_, discente da Universidade Federal de Goiás, te convido a participar de uma pesquisa, a qual tem o objetivo de avaliar a diversidade genética da bactéria *Helicobacter pylori* e entender a sua função nas doenças causadas no estômago.

**Título da Pesquisa:** Análise de genes de virulência de *Helicobacter pylori* e correlação com patologias gástricas.

#### Nome e Rubrica do pesquisador: Rubrica do sujeito participante:

Para o estudo serão coletadas amostras do tecido gástrico por biópsia no momento do exame endoscópico. Você não precisará realizar nenhum exame adicional e não haverá prejuízo da continuidade do acompanhamento/tratamento usual. A pesquisa não apresenta nenhum risco, uma vez que o exame será realizado por uma equipe de médicos especialistas e de destaque na área. A pesquisa irá contribuir para a prevenção de doenças gástricas da população, bem como para um tratamento mais adequado. Você tem a liberdade de não participar da pesquisa e poderá desistir deste estudo a qualquer momento, e isto em nada irá prejudicar o seu tratamento. Sua colaboração é fundamental e muito auxiliará na escolha do tratamento dos pacientes que vierem a apresentar futuras doenças gástricas. Os dados colhidos serão mantidos em total sigilo, e seu nome não será colocado em qualquer publicação. Vale ressaltar que não haverá custos/reembolsos aos participantes. Os dados coletados, serão utilizados apenas para esta pesquisa e não será armazenados para estudos futuros.

**Título da Pesquisa:** Análise de genes de virulência de *Helicobacter pylori* e correlação com patologias gástricas.

#### Nome e Rubrica do pesquisador: Rubrica do sujeito participante:

---

## APÊNCICE B– Questionário sociodemográfico

**“Características sociodemográficas e correlação com a infecção por *Helicobacter pylori* em pacientes submetidos à endoscopia digestiva alta em um Hospital Universitário de Goiás.”**

Prezado (a) voluntário, este questionário visa coletar dados sobre vários aspectos relacionados às suas condições de vida durante a infância bem como as atuais. As informações aqui declaradas serão sigilosas.

**Identificação dos pacientes:** \_\_\_\_\_

**Naturalidade:** \_\_\_\_\_

**Cidade que reside:** \_\_\_\_\_

1. Qual é o seu sexo?  
 Feminino;  
 Masculino.
2. Qual é a sua idade? \_\_\_\_\_
3. Qual é a sua escolaridade?  
 Analfabeto (a);  
 Primeiro grau incompleto;  
 Primeiro grau completo;  
 Segundo grau incompleto;  
 Segundo grau completo;  
 Terceiro grau incompleto;  
 Terceiro grau completo.
4. Qual seu estado civil?  
 Solteiro;  
 Casado (a);  
 Divorciado(a);  
 Viúvo(a).
5. Qual a sua renda mensal familiar?  
 Até dois salários mínimos;  
 De três a cinco salários mínimos;  
 Acima de cinco salários mínimos.
6. Durante a infância, você residia em:  
 Zona rural;  
 Zona urbana.
7. Quais destes itens não estavam presentes em sua residência na infância?  
 Água encanada;  
 Esgoto;  
 Vaso sanitário.
8. Durante a infância com quantas pessoas você costumava dividir os cômodos (quartos, sanitários, cozinha, etc) da sua residência?  
 1;  
 2;  
 3;  
 Mais que 3 pessoas.
9. Qual é a escolaridade da sua mãe ou responsável durante a infância?  
 Primeiro grau incompleto;  
 Primeiro grau completo;  
 Segundo grau incompleto;  
 Segundo grau completo;  
 Terceiro grau incompleto;  
 Terceiro grau completo.
10. Qual sintoma mais atrapalhou em suas atividades diárias no último ano? Caso não apresente nenhum desses sintomas desconsidere esta pergunta.  
 Dor ou queimação no abdômen;  
 Náuseas;  
 Eructações/arrotos frequentes;  
 Azia;  
 Vômito;  
 Não apresento nenhum destes sintomas.
11. Devido aos sintomas citados anteriormente, alguma vez em toda a sua vida você já procurou alguma forma de diagnóstico?  
 Sim;  
 Não.

12. Você já realizou Endoscopia digestiva? Se sim, responda quantas vezes. Se não, desconsidere esta pergunta.

- 1;
- 2;
- 3;
- Mais que 3 vezes.

13. Dentre as Endoscopias digestivas já realizadas, em alguma delas você foi diagnosticado com infecção causada pela bactéria *Helicobacter pylori*? Se nunca realizou uma endoscopia, desconsidere esta pergunta.

- Sim;
- Não.

14. Se algum dos sintomas já te atrapalhou em suas atividades diárias e mesmo assim você ainda não procurou alguma forma de diagnóstico, responda por que não procurou atendimento médico.

- Não possui condições para arcar com consultas e exames;
- Falta de esclarecimento e informações;
- Por não sentir muita dor;
- Outro, exponha o motivo: \_\_\_\_\_

15. Você fuma?

- Sim;
- Não.

16. Você consome bebida alcoólica?

- Sim, socialmente.
- Sim, quase todos os dias.
- Não.

17. Você faz ingestão de café?

- Sim, as vezes.
- Sim, todos os dias.
- Não.

18. A forma de abastecimento de água utilizada neste domicílio é:

- rede geral de distribuição;
- água da chuva armazenada em cisterna;
- carro-pipa;
- rios, açudes, lagos e igarapés;
- outro.

19. O lixo deste domicílio é:

- coletado diretamente por serviço de limpeza;
- colocado em caçamba de serviço de limpeza;
- enterrado (na propriedade);
- jogado em terreno baldio ou logradouro;
- tem outro destino;
- queimado (na propriedade);
- jogado em rio, lago ou mar;
- outro.

## ANEXOS

---

### ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CEP/UFG)

UFG - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE GOIÁS



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Helicobacter pylori* E CORRELAÇÃO COM PATOLOGIAS GÁSTRICAS

**Pesquisador:** Mônica Santiago Barbosa

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 83422017.7.0000.5078

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas Universidade Federal de Goiás - GO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.519.032

##### Apresentação do Projeto:

De acordo com a pesquisadora *Helicobacter pylori* é uma bactéria microaerófila, Gram negativa, de morfologia espiralada e encontrada profundamente nas células epiteliais secretoras de muco no estômago humano, pois nesta região o pH neutro é prevalente. Está relacionada como a principal causa de várias patologias gastrintestinais, gastrite crônica, úlcera péptica, câncer gástrico e linfoma gástrico (MALT), e é classificada como carcinógeno tipo I pela WorldHealth Organization. A sua distribuição é universal e acomete mais de 90% da população mundial, sendo mais comum nos países em desenvolvimento, provavelmente devido à possível forma de transmissão fecal-oral e das condições precárias de saneamento básico nestes países.

Apesar da infecção por *H. pylori* estar associada à patologias gastroduodenais, nem todos os indivíduos infectados apresentam alterações clinicamente significantes.

Trata-se de um estudo pioneiro no estado de Goiás, que tem o intuito de contribuir para a saúde pública, avaliando a prevalência da infecção por *H. pylori* em pacientes dispépticos, além de caracterizar geneticamente (genes *cag A*, *vac A*, *oip A* e *babA2*) as cepas isoladas e correlaciona-las com os achados endoscópicos.

##### Critério de Inclusão:

Serão incluídas na pesquisa, amostras de pacientes que serão submetidos ao exame endoscópico que estiverem infectados com a bactéria *H. pylori*. O diagnóstico será realizado pelo médico

**Endereço:** 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica  
**Bairro:** St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020  
**UF:** GO **Município:** GOIANIA  
**Telefone:** (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cepcufg@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 2.519.032

endoscopista no momento do exame, utilizando o teste da Urease.

**Critério de Exclusão:**

Os critérios de exclusão serão os seguintes: paciente que estão tomando antibióticos nas últimas oito semanas, inibidores da bomba de prótons nas últimas duas semanas ou agentes bloqueadores na última semana; pacientes que estão fazendo uso de imunossupressores, pacientes com sangramento gastrointestinal ativo, gravidez, amamentação e história de gastrectomia. Também serão excluídos do estudo pacientes que não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**Metodologia Proposta:**

A extração do DNA será realizada segundo o protocolo de extração de DNA fornecido pelo KitQIamp DNA minikit® (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos). A quantidade e a pureza do DNA genômico serão determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) no Laboratório Multiusuário do IPTSP- UFG. O DNA genômico será amplificado utilizando-se o método da PCR com oligonucleotídeos que codificam para os fatores de virulência da bactéria (genes CagA, Vac A, Balb A, UreA). Os produtos da PCR serão analisados através de gel de eletroforese 1,6% corados com brometo de etídio (10mg/mL) em cuba horizontal. Após a eletroforese cada gel será visualizado em luz ultravioleta e a imagem será reproduzida com um fotodocumentador. As amostras serão consideradas positivas analisando o marcador de peso molecular, o controle positivo e controle negativo para os oligonucleotídeos utilizados. O produto da amplificação dos genes de virulência serão sequenciados com a finalidade de avaliar a variabilidade genética e correlaciona-las com as patologias gástricas.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avallar a frequência de infecção por H. pylori em amostras de mucosa gástrica de pacientes dispépticos, realizar a caracterização genotípica dos fatores de virulência da bactéria e correlaciona-los as patologias gástricas. Realizar um estudo sociodemográfico abordando diversos aspectos relacionados com a infecção por H. pylori.

**Objetivo Secundário:**

**Endereço:** 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica  
**Bairro:** St. Leste Universitario **CEP:** 74.605-020  
**UF:** GO **Município:** GOIANIA  
**Telefone:** (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcu fg@yahoo.com.br

Página 02 de 05

Continuação do Parecer: 2.519.032

- Extrair o DNA de fragmentos da mucosa gástrica obtidos por biópsia de pacientes submetidos à endoscopia digestiva, no Hospital das Clínicas
- Universidade Federal de Goiás; - Caracterizar genotipicamente os fatores de virulência CagA, Dup, Vac;
- Correlacionar os fatores de virulência com as patologias gástricas;
- Realizar estudos filogenéticos e correlacionar com amostras já caracterizadas em outros locais;
- Avaliar a associação da infecção por H. pylori com as condições sócio econômicas.
- Realizar estudos epidemiológicos na região Centro-Oeste.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

A pesquisa não apresenta riscos, uma vez que a bactéria não é infecto-contagiosa e o exame será realizado por uma equipe de médicos gastroenterologista gabaritados, além disso o processamento das amostras será realizada sob orientação de doutores renomados na áreas..

Benefícios:

Os resultados da pesquisa irá contribuir para a prevenção de doenças gástricas da população, bem como para um tratamento mais personalizado, uma vez que já está descrito que a bactéria apresenta resistência a antibióticos e a resistência está correlacionada a variabilidade genética.

Benefícios:

Os resultados da pesquisa irá contribuir para a prevenção de doenças gástricas da população, bem como para um tratamento mais personalizado, uma vez que já está descrito que a bactéria apresenta resistência a antibióticos e a resistência está correlacionada a variabilidade genética.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estima-se que este estudo seja viável e aplicável, tendo em vista que os resultados da pesquisa irá contribuir para a prevenção de doenças gástricas da população, bem como para um tratamento mais personalizado, uma vez que já está descrito que a bactéria apresenta resistência a antibióticos e a resistência está correlacionada a variabilidade genética.

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

Todos os termos obrigatórios foram apresentados conforme a Res. 466/12.

Ressalva-se porém que o TCLE apresenta pendências, de acordo com o descrito pela pesquisadora quanto aos riscos e benefícios.

Riscos:

"A pesquisa não apresenta riscos, uma vez que a bateria não é infecto-contagiosa e o exame será realizado por uma equipe de médicos gastroenterologista gabaritados, além disso o processamento das amostras será realizada sob orientação de doutores renomados na áreas".

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica  
Bairro: St. Leste Universitario CEP: 74.605-020  
UF: GO Município: GOIANIA  
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cepcufg@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 2.519.032

**Recomendações:**

No item IV.3.b afirma que "O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deverá conter, obrigatoriamente: (...) explicitação dos possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa, além dos benefícios esperados dessa participação e apresentação das providências e cautelas a serem empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições adversas que possam causar dano, considerando características e contexto do participante da pesquisa".

Recomendamos que a pesquisadora fique atenta em relação a questão dos riscos inerentes a pesquisa. Pois entendemos que independente da capacidade do profissional que vai realizar o exame o risco não deixa de existir.

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

Considera-se que o projeto não possui óbice ético, assim sendo, recomendo a aprovação do mesmo.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás-CEP/HC/UFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e na Norma Operacional CNS 001/13, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Lembramos que o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFG, através de Notificação via Plataforma Brasil, os relatórios trimestrais/semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações.

O CEP/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares.

Situação: Protocolo aprovado.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_874852.pdf	17/01/2018 21:56:49		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	17/01/2018 21:55:45	Mônica Santiago Barbosa	Aceito

**Endereço:** 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica  
**Bairro:** St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020  
**UF:** GO **Município:** GOIANIA  
**Telefone:** (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufig@yahoo.com.br

UFG - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE GOIÁS



Continuação do Parecer: 2.519.032

Declaração de Instituição e Infraestrutura	IPSP.pdf	17/01/2018 21:55:06	Mônica Santiago Barbosa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	HC.pdf	17/01/2018 21:54:36	Mônica Santiago Barbosa	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	17/01/2018 21:42:46	Mônica Santiago Barbosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	06/12/2017 16:11:15	Mônica Santiago Barbosa	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Aprecação da CONEP:**

Não

GOIANIA, 28 de Fevereiro de 2018

---

**Assinado por:**  
**JOSE MARIO COELHO MORAES**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica  
**Bairro:** St. Leste Universitario **CEP:** 74.605-020  
**UF:** GO **Município:** GOIANIA  
**Telefone:** (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufig@yahoo.com.br

Página 05 de 05

