



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AMANDA MONTEIRO SILVA**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA BACTÉRIA *HELICOBACTER PYLORI* NA  
POPULAÇÃO DE SÃO LUÍS, MA**

**São Luís**

**2020**

**AMANDA MONTEIRO SILVA**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA BACTÉRIA *HELICOBACTER PYLORI* NA  
POPULAÇÃO DE SÃO LUÍS, MA**

Artigo apresentado ao curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do  
Maranhão para obtenção do grau de Licenciada  
em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Hivana Patrícia Melo Barbosa Dall’Agnol

**São Luís**

**2020**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Monteiro, Amanda.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA BACTÉRIA HELICOBACTER PYLORI  
NA POPULAÇÃO DE SÃO LUIS, MA / Amanda Monteiro, Selma  
Maluf, Flávia Nascimento. - 2020.

53 f.

Orientador(a): Hivana Dall'Agnol.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2020.

1. CagA. 2. H. pylori. 3. PCR. I. Dall'Agnol,  
Hivana. II. Maluf, Selma. III. Nascimento, Flávia. IV.  
Título.

**AMANDA MONTEIRO SILVA**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA BACTÉRIA *HELICOBACTER PYLORI* NA  
POPULAÇÃO DE SÃO LUÍS, MA**

Artigo apresentado ao curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do  
Maranhão para obtenção do grau de Licenciada  
em Ciências Biológicas.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Hivana Patrícia Melo Barbosa Dall'Agnol  
(Orientadora)

---

Prof. Dr. Juliano dos Santos  
(1º Examinador)

---

Prof. Esp. Rossy-Eric Pereira Soares  
(2º Examinador)

---

Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall'Agnol  
(1º Suplente)

---

Profa. Dra. Denise Fernandes Coutinho  
(2º Suplente)

“You may say I’m a dreamer  
But I’m not the only one...”  
(*Imagine* – John Lennon)

*Dedico esta conquista à minha mãe, Jacira, aos meus irmãos, Carol e Diego, à minha avó, Deuzuíte, e ao meu sobrinho, Calleb.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus, pela dádiva de viver e realizar grandes e pequenos sonhos, pela força dada a mim durante todos os dias de minha vida, por trazer para os meus caminhos pessoas tão incríveis e inspiradoras, por todas as conquistas e aprendizados vividos durante a minha graduação e por nunca me desamparar, sobretudo nos momentos mais difíceis.

Agradeço à minha mãe, Jacira, por toda dedicação e por tantos e grandes ensinamentos de vida, por nunca ter me deixado desistir de concluir este curso e por todas as vezes que segurou a barra comigo e por mim. Por todo amor e apoio, agradeço.

À minha professora e orientadora Hivana por ter me acolhido, por todos os ensinamentos e conselhos, pela paciência e por toda força que me deu nessa etapa final da graduação, por ter sido tão empática e sempre acreditar que tudo daria certo.

A todos os amigos que aqui encontrei e levarei para a vida inteira:

À Carol Dutra, minha eterna parceira, por todos os momentos de alegria e cumplicidade. Obrigada pela amizade de sempre e por estar aqui por mim nos momentos bons e ruins.

À Nagilla Leite, minha amiga do coração, por todos momentos que passamos juntas na Universidade e fora dela, por todas as risadas e colos.

À Karina Penha, a pessoa mais engajada e viajada que eu conheço, e também a mais inspiradora, sensível e com o coração mais bonito que eu conheço. Sou grata a Deus por ter te encontrado aqui.

À Robson, Isla e Karla, por todos os momentos de alegria e descontração, por deixarem a vida acadêmica mais leve.

Aos amigos do meu grupo de pesquisa: Lucas, Ana Butarelli, Raíssa, Mari, Igor, Cris, Malena, Pedro, Nívia, Jedhayne. Em especial, minhas amigas Milene e Iolanda, por sempre vibrarem muito por mim, por todas as vezes que ficamos até tarde no laboratório, juntas,

aguardando resultados. Vocês são dois grandes exemplos de força e dedicação. Vocês me inspiram.

Ao meu grande amigo Maycon, por toda troca nesses anos de graduação e por todos os momentos maravilhosos que vivemos juntos.

À Nurzia, Jesiel, Ricardo, Jenilson por todo apoio e preocupação.

Ao meu amigo Lukas por todo carinho e disponibilidade em ajudar.

Aos amigos Ju, Fer, Luis, Tayhana e Luciana por todas as gargalhadas, apoio e por acreditarem em mim.

À Emilly e Mairla, por dividirem comigo não só as bancadas da vida, mas também momentos maravilhosos, por toda ajuda que me deram principalmente na conclusão desse trabalho.

Ao meu namorado, Bruno, por ter sido tão incrível comigo desde que entrou na minha vida, pelo suporte emocional mesmo quando estava longe, pelo apoio e por sempre acreditar no meu potencial. Pelo amor, cuidado e compreensão de sempre.

Aos Curso de Ciências Biológicas – UFMA e Departamento de Biologia, a todos os professores e funcionários com os quais tive o prazer de conviver e aprender.

Ao Grupo de Pesquisa em Biodiversidade, Bioprospecção e Biotecnologia – UFMA.

Ao LabGeM-UFMA por todo suporte necessário para a realização desta pesquisa.

Ao professor Luis Fernando, do laboratório de Genética Animal, por ter cedido espaço, equipamentos e reagentes para realização da minha pesquisa. Aos alunos dele, Clarence, Rayane e Leo, pela disponibilidade e ajuda.

À professora Denise, do laboratório de Famacognosia II, por ter cedido equipamentos essenciais para a execução da minha pesquisa.

À professora Flávia Nascimento e a Médica Selma Maluf por terem cedido as amostras utilizadas nesta pesquisa.

À Universidade Federal do Maranhão, que era um sonho para mim desde muito nova, por ter me proporcionado ensinamentos para além do âmbito acadêmico, por ter me trazido tantas pessoas inspiradoras e oportunidades acadêmicas. Me orgulho e sempre me orgulharei por fazer parte do ensino superior público do Maranhão.

## SUMÁRIO

<b>1. Referencial Teórico.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1. <i>Helicobacter pylori</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1.1. Contextualização histórica.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1.2. Microbiologia.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.3. Patogênese e fatores de virulência .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.4. Epidemiologia .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.5. Métodos diagnósticos.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.5.1. Testes invasivos.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1.5.2. Testes não-invasivos.....</b>	<b>23</b>
<b>2. Justificativa.....</b>	<b>25</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Referências .....</b>	<b>27</b>
<b>5. Artigo.....</b>	<b>31</b>
<b>5.1. Resumo.....</b>	<b>31</b>
<b>5.2. Introdução.....</b>	<b>32</b>
<b>5.3. Materiais e métodos.....</b>	<b>34</b>
<b>5.3.1. Casuísta e questões éticas.....</b>	<b>34</b>
<b>5.3.2. Coleta e armazenamento das amostras.....</b>	<b>34</b>
<b>5.3.3. Extração do DNA em tecido de biópsia gástrica.....</b>	<b>35</b>
<b>5.3.4. Diagnóstico molecular .....</b>	<b>36</b>
<b>5.4. Resultados .....</b>	<b>37</b>
<b>5.5. Discussão.....</b>	<b>41</b>
<b>5.6. Conclusão.....</b>	<b>43</b>
<b>5.7. Agradecimentos .....</b>	<b>43</b>
<b>5.8. Referências .....</b>	<b>44</b>
<b>5.9. Normas das Revista .....</b>	<b>48</b>

# 1. REFERENCIAL TEÓRICO

## 1.1 *Helicobacter pylori*

### 1.1.1 Contextualização histórica

Relatada pela primeira vez em 1875, os pesquisadores Bottcher e Letulle observaram *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) nas margens de úlceras pépticas. No entanto, não conseguiram cultivar a bactéria em meios artificiais utilizados naquela época e essa descoberta foi esquecida por um tempo (RESHETNYAK, V.; RESHETNYAK, T., 2017).

Devido a sua semelhança morfológica, foi classificada inicialmente como pertencente ao gênero *Campylobacter* e denominada *Campylobacter pyloridis*. A bactéria gram-negativa microaerófila em formato de S foi isolada pela primeira vez em fragmentos de biópsias da mucosa gástrica de indivíduos com gastrite crônica e cultivada por Warren e Marshall, pesquisadores australianos, no início dos anos 80. (MARSHALL; WARREN, 1984). Posteriormente recebeu a denominação de *Campylobacter pylori* (MARSHALL; GOODWIN, 1987) e, finalmente, em 1989, após análises genéticas e bioquímicas, o microrganismo foi designado como o primeiro membro de um novo gênero (*Helicobacter*): *Helicobacter pylori*. (GOODWIN et al., 1989).

Marshall e Warren (1985) propuseram demonstrar a relação entre a colonização do epitélio gástrico humano pela bactéria e o desencadeamento de processos inflamatórios no mesmo, comprovando a patogenicidade de *H. pylori* e sua importância na gênese de gastrite. Neste estudo, Marshall participou como cobaia do seu próprio experimento e ingeriu um concentrado da bactéria isolada, o que promoveu o aparecimento de sintomas característicos de uma gastrite crônica, a qual foi comprovada com exame endoscópico e histológico (MARSHALL; WARREN, 1985). Este estudo promoveu um importante avanço na gastroenterologia e rendeu aos pesquisadores o prêmio Nobel de Medicina de 2005.

A descoberta desta bactéria foi um marco para o entendimento da patogênese de doenças gástricas pois quebrou o dogma de que o estômago era um órgão estéril (MALUF, 2014). Antes da descoberta de *H. pylori* e das pesquisas sobre esta bactéria, a gênese de doenças como gastrite, úlceras gástrica e duodenal, e câncer gástrico era atribuída somente ao desequilíbrio entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e a secreção ácida do estômago (GUIMARÃES; CORVELO; BARILE, 2008). Acreditava-se que as úlceras

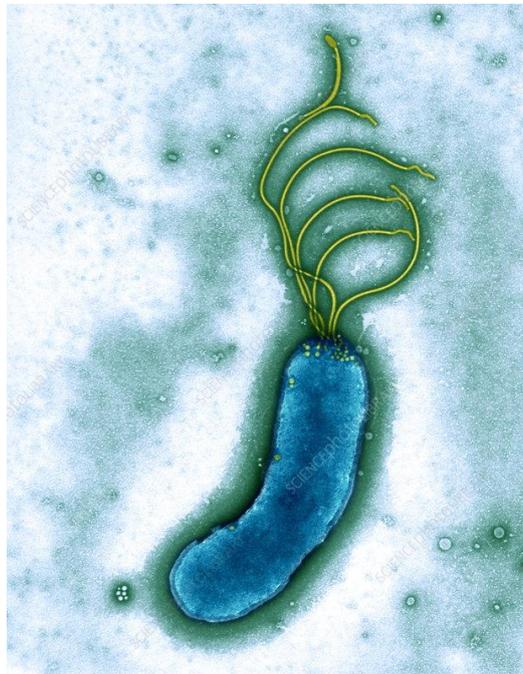
gástricas estavam relacionadas ao ácido clorídrico, úlceras duodenais associadas a alta acidez e os cânceres gástricos com ausência de ácido clorídrico. (GRAHAM; MIFTAHUSSURUR, 2018).

Posteriormente, uma série de estudos epidemiológicos demonstraram a alta prevalência da infecção por *H. pylori* em pacientes com câncer gástrico, levando a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, ligada a Organização Mundial de Saúde, classificar *H. pylori* como carcinógeno de classe I. (PAJARES; GISBERT, 2006; SUZUKI; SHIOTA; YAMAOKA, 2012). É bem estabelecido atualmente que *H. pylori* é o principal agente causador de patologias gástricas e a sua associação ao risco significativamente aumentado de desenvolvimento de câncer gástrico, sendo considerada, isoladamente, o fator precursor mais importante para neoplasia. (RIBEIRO; DE FREITAS COELHO; COELHO, 2019)

Outro campo de estudo corrente é o que tem demonstrado crescentes evidências do potencial papel da inflamação induzida por *H. pylori* no desenvolvimento de outras doenças fora do estômago. Muitos desses estudos têm avaliado o impacto da infecção por *H. pylori* nos mecanismos patogênicos de diferentes doenças extragástricas, especialmente distúrbios cardiovasculares, neurológicos, metabólicos e colorretais (FRANCESCHI; COVINO; BAUDRON, 2019).

### 1.1.2 Microbiologia

*Helicobacter pylori* é uma bactéria gram-negativa com morfologia espiralada, variando em tamanho de 3 a 5µm de comprimento e cerca de 0,5µm de diâmetro, altamente móvel, microaerófila, produtora de urease, catalase e oxidase (RADOSZ-KOMONIEWSKA et al., 2005). Esse microrganismo coloniza a mucosa estomacal, especificamente as microvilosidades, infectando as células epiteliais que secretam muco, preferindo a região antral (MADIGAN et al, 2016). Está associada a várias doenças gastrointestinais, como gastrite crônica, ulcera péptica, linfoma do tecido linfoide associado à mucosa e câncer gástrico (NEVOA et al, 2017).



**Figura 1:** Micrografia eletrônica de transmissão. Morfologia de *Helicobacter pylori*.  
Fonte: Biomedical Imaging Unit, Southampton General Hospital/ Science Photo Library

Em cultura, cresce lentamente, precisa de uma atmosfera microaerófila estrita e temperatura de 37°C. Pode ser encontrada tanto na forma espiral e, em caso de culturas mais velhas, adaptada em formato cocóide. Possui de 4 a 6 flagelos polares com bainha e bulbo terminal, medindo cerca de 3µm de comprimento, que conferem a *H. pylori* grande mobilidade e permitem que a bactéria penetre a camada de muco que protege o epitélio

gástrico. (GRAHAM, 1994; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; LIMA; BARBOSA;SCHINONNI, 2011). Sua alta capacidade de adaptação e resistência ao meio ácido do estômago são devidas, principalmente, à produção de urease, proteína de alto peso molecular (500 a 600kDa), que converte a ureia presente em condições fisiológicas no suco gástrico em amônia e CO<sub>2</sub> (BAHÚ, 2010; MICU et al., 2009). A amônia, que atua como receptor de íons H<sup>+</sup>, neutraliza o pH do suco gástrico ao redor da bactéria conferindo ao patógeno proteção contra os efeitos deletérios da acidez gástrica (WEEKS; SACHS, 2001; VOLAND et al., 2003).

É um patógeno bem adaptado e persiste no hospedeiro mesmo com ação do sistema imunológico, devido à presença de regiões hipervariáveis em genes codificantes de estruturas que permitem a bactéria evadir-se das respostas imunológicas, principalmente através da alteração de seus antígenos de superfície (RODRIGUES et al, 2017).

Segundo o National Center for Biotechnology Information(NCBI),até o presente momento, existem 1.589 genomas depositados publicamente, cujo tamanho total dos genomas tem média de 1,63254 Mb, apresentando uma média de 38,9 de GC% e 1.468-1.694 genes responsáveis por codificar, em média, 1.445 proteínas, sendo algumas dessas linhagens portadoras de apenas um único cromossomo bacteriano circular, enquanto outras possuem adicionalmente até 2 plasmídeos. Esse grande número de genomas sequenciados reflete a diversidade do genoma de *H. pylori*, considerada umas das razões pelas quais os mecanismos de patogênese e infecção da bactéria ainda são pouco esclarecidos. A diversidade genética de *H. pylori*, efeito, principalmente, da sua frequente recombinação gênica, revela que os genótipos das muitas estirpes de *H. pylori* existentes são, também, geograficamente diversas. O gene *cagA*, por exemplo, um dos genes de virulência da bactéria, é codificado pela maioria das cepas do leste asiático, mas por apenas metade a até dois terços das cepas ocidentais (SUGIYAMA et al, 2019).

A distribuição da bactéria é universal e, atualmente, há três meios de transmissão comprovados: (1) fecal-oral, cujo principal meio para contaminação é a água contaminada, normalmente em países em desenvolvimento; (2) oral-oral, tornando-se possível pelo fato da bactéria ter sido encontrada no suco gástrico em regurgitações; e (3) iatrogênica, através da qual a contaminação ocorre pelo uso de equipamentos esterilizados de forma incorreta ou não esterilizados em exames (MENEZES et al, 2015). Más condições sanitárias, de vida e econômicas são considerados os fatores de risco para a infecção por *H.pylori* (COELHO et al, 2018; VARGAS et al, 2019).

### 1.1.3 Patogênese e Fatores de virulência

A mucosa gástrica é bem protegida contra infecções bacterianas. No entanto, *H. pylori* está altamente adaptada a este ambiente. A persistência e colonização da mucosa gástrica pela bactéria se deve a vários mecanismos que conferem à bactéria a capacidade de sobreviver no ambiente hostil, ácido e agressivo do estômago e que são coadjuvantes na instalação da infecção (BARBOSA, 2014; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Os fatores de virulência da bactéria e a resposta inflamatória da mucosa do hospedeiro constituem os principais mecanismos patogênicos envolvidos nos diferentes quadros clínicos da infecção. (OLIVEIRA, 2014).

A forma espiralada da bactéria e a motilidade conferida pelos seus flagelos são um importante fator de colonização, pois permitem a bactéria mover-se no suco gástrico e atravessar rapidamente o muco que recobre o estômago, atingindo a superfície epitelial. Estudos mostraram experimentalmente que cepas sem flagelos ou com defeitos em sua estrutura flagelar são incapazes de promover a colonização do epitélio gástrico (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015)

O suco gástrico do estômago limita a colonização de *H. pylori*, tendo em vista que a bactéria só sobrevive alguns minutos no lúmen gástrico. Desta forma, ao entrar em contato com este necessita iniciar rapidamente a produção de urease. A produção dessa enzima constitui o principal mecanismo de adaptação ao meio ácido do estômago, isto porque ela catalisa a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono (COELHO, 2016; RODRIGUES et al, 2017)

A amônia, quando secretada, ocasiona o aumento do pH na membrana celular da bactéria e nas áreas próximas do local de colonização, neutralizando o ácido gástrico. Além disso, a amônia gerada pela urease também danifica o epitélio gástrico. Os principais genes constitutivos relacionados à produção de urease pela bactéria são os genes *ureA* e *ureB* que codificam as duas subunidades que compõe a enzima, os genes *ureE*, *ureF*, *ureG* e *ureH*, que codificam proteínas acessórias importantes na ativação da urease e o gene *ureI*, que codifica uma proteína presente na membrana externa do *H. pylori* que funciona como um canal, atuando na internalização da ureia. Os íons de níquel necessários para a atividade da urease são transportados pela membrana citoplasmática por uma proteína de alta afinidade, *nixA*, codificada pelo gene *nixA* (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003; RODRIGUES et al, 2017).

Outro fator de colonização é a capacidade de degradar a mucina gástrica, composta por glicoproteínas de alto peso molecular cuja função é a proteção do epitélio gástrico. A degradação proteolítica do muco gástrico é um mecanismo pelo qual se favorece a adesão da bactéria à célula epitelial gástrica e posterior desenvolvimento da doença (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015)

A adesão à superfície das células epiteliais gástricas é a etapa final da associação do microrganismo com a mucosa. Este processo, essencial para a colonização da mucosa gástrica e para a manutenção de uma infecção crônica, é mediado por adesinas e a principal responsável pela interação entre *H. pylori* e mucosa é a BabA (Blood group antigen-binding adhesin), codificada pelo gene *babA*, envolvida na adesão da bactéria ao antígeno do grupo sanguíneo Lewis, presente nas células gástricas. O gene *babA* está associado à evolução clínica da inflamação por *H. pylori*, como gastrites ativa e crônica, além do desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico (NECCHI et al., 2007; COELHO, 2016).

A expressão das proteínas adesinas difere entre as cepas e é variável dentro de uma mesma cepa ao longo do tempo, levando a capacidade de adaptação dinâmica através de ativação/desativação da expressão do gene, inativação do gene, ou recombinação (ASPHOLM-HURTIG et al., 2004). Algumas estirpes de *H. pylori* não expressam a adesina BabA, contudo apresentam o gene *babA*, que pode ser ativado por recombinação genética (FOX; WANG, 2007; AZEVEDO et al, 2008).

A adesão às células epiteliais, além de garantir à *H. pylori* acesso a nutrientes provenientes do hospedeiro, contribui para ação de outros fatores de virulência. A adesão mediada pela BabA pode ocasionar, por exemplo, a translocação da oncoproteína CagA e da toxina vacuolizante VacA para a célula hospedeira e consequente indução da inflamação gástrica (POSSELT; BACKERT; WESSLER, 2013; COELHO, 2016).

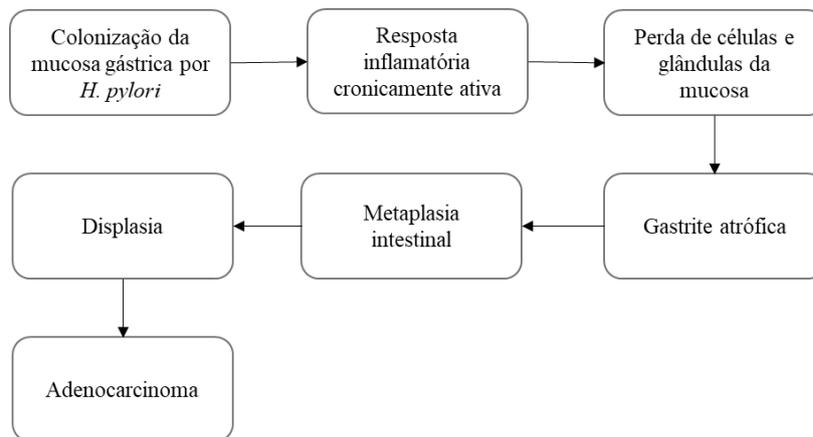
A citotoxina *vacA*, codificada pelo gene *vacA*, desempenha um papel importante nas etapas iniciais da colonização e sua presença implica na persistência da infecção bacteriana. Esta é capaz de causar vacuolização citoplasmática nas células eucarióticas, induzindo a apoptose (YAMAZAKI et al, 2005 ). Além disso, altera a junção célula-célula, modifica a resistência elétrica e cria canais de membrana, gerando uma rota de permeabilidade célula-bactéria de pequenas moléculas orgânicas e íons, como ferro, que são essenciais para o crescimento microbiano. Todas as cepas da *H. pylori* contém o gene *vacA*, no entanto, nem todas são capazes de induzir vacuolização celular, devido a diversidade

genética observada em duas regiões do gene (região da sequência sinal “s”, e região mediana “m”) (MONTECUCCO et al., 2001).

A proteína CagA, codificada pelo gene *cagA* (*cytotoxin associated gene*), o primeiro gene identificado em *H. pylori* e fortemente associado ao risco para o desenvolvimento de câncer gástrico, é um dos vários genes que compõem a ilha de patogenicidade *cag* (*cagPAI*). A ilha de patogenicidade *cagPAI* é um componente do genoma de *H. pylori* (podendo estar presente, ausente ou incompleta) encontrada em 60% a 70% das estirpes. Contém 31 genes, dentre os quais, além do *cagA*, estão o *cagE*, *cagT* e *cagL*, que são homólogos aos de outras bactérias que codificam componentes do sistema de secreção do tipo IV (T4SS), cuja função é transferir proteínas e complexos núcleo-proteicos através das membranas. O sistema de secreção do tipo IV forma uma estrutura tipo pilus, semelhante a uma seringa, utilizada no transporte da proteína CagA e outros fatores de virulência de *H. pylori* para a célula gástrica epitelial, permitindo que a bactéria module vias de metabolismo celular da célula hospedeira, incluindo a expressão de proto-oncogenes (PEEK et al, 1999; HATAKEYAMA, 2009; BACKERT; CLYNE, 2011; OLIVEIRA, 2014).

As cepas *cagA* positivas tendem a ser mais virulentas e, portanto, altamente associadas às formas mais graves da infecção, principalmente na carcinogênese gástrica. Ao ser injetada na célula hospedeira, a proteína CagA induz alterações na fosforilação de tirosinas, nas vias de sinalização e de transdução da célula hospedeira, resultando em rearranjos do citoesqueleto e alterações morfológicas que levam à variação do comprimento da proteína e qualquer variação em seu comprimento pode levar a diferentes respostas do hospedeiro, incluindo diferentes graus de resposta inflamatória (KIKUCHI et al., 1999).

A infecção por *H. pylori* desencadeia uma inflamação aguda da mucosa gástrica, causando dor, náusea e vômito. Esta fase, porém, na maioria dos casos, é despercebida. A gastrite crônica causada por *H. pylori*, caso não seja tratada, perdura por longos períodos de latência, entretanto, alguns casos podem evoluir para patologias mais graves, como gastrite crônica atrófica e metaplasia intestinal, avançando para displasia, até que se desenvolva uma neoplasia de rápida evolução e elevada morbimortalidade: o carcinoma gástrico (Figura 2). Como consequências da inflamação ativa e destruição das células epiteliais e criptas da mucosa gástrica, a gastrite atrófica e metaplasia intestinal são consideradas condições pré-neoplásicas. Dessa forma, é de extrema importância a detecção desta cascata ainda na sua fase inicial, em tempo de interrompê-la (RIBEIRO; DE FREITAS COELHO; COELHO, 2019).



**Figura 2:** Cascata do desenvolvimento de câncer gástrico e suas condições pré-neoplásicas. Fonte: Adaptada de Pelayo C, 2011

#### 1.1.4 Epidemiologia

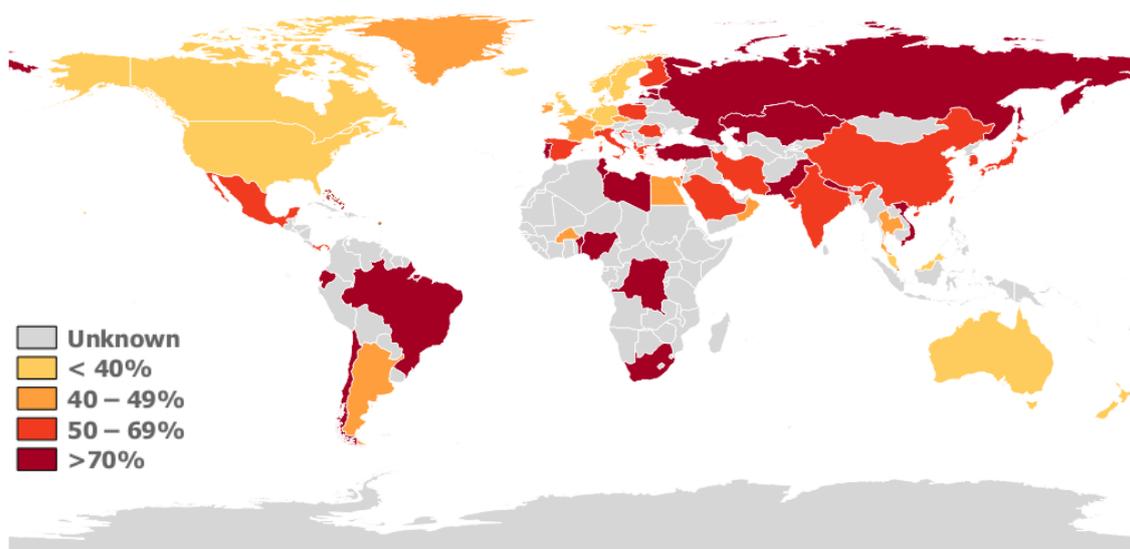
Estima-se que mais de 50% da população mundial tem a mucosa gástrica colonizada por *H. pylori*, sendo esta uma das infecções mais comuns e prevalentes em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento (RESHETNYAK, V.; RESHETNYAK, T., 2017).

A ocorrência da infecção por *H. pylori* é diferenciada em regiões geográficas distintas e a elevada prevalência desse microrganismo está relacionada às condições de vida, saneamento básico, etnia, idade e à exposição dos indivíduos a bactéria, o que normalmente acontece na primeira fase da vida (KODAIRA; ESCOBAR; GRISI, 2002; LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003; RODRIGUES et al, 2017).

A prevalência varia de 35% a 90% em diferentes populações; nos países em desenvolvimento apresenta-se em 70% a 90% da população e nos países desenvolvidos apresenta-se em 35% a 40% da população (ALHUSSAINI, 2016; FERNANDES; BONATTO, G.; BONATTO, M.; 2016; RESHETNYAK, V.; RESHETNYAK, T., 2017).

Hooi et al (2017), em uma análise de 184 artigos publicados entre 1970 a 2016 sobre a prevalência de infecção por *H. pylori*, avaliaram as mudanças na prevalência global da infecção. Com base nas estimativas de prevalências regionais, aproximadamente 4,4 bilhões de indivíduos foram infectados por *H. pylori* em todo o mundo em 2015. A maior e a menor prevalência foram observadas, respectivamente, no continente africano (aproximadamente 70%) e na Oceania (aproximadamente 24%) e os países Nigéria (87,7%) e Suíça (18,9%) apresentaram a maior e menor prevalência, respectivamente (VENERITO et al, 2018).

Após os anos 2000, a prevalência da infecção por *H. pylori* foi menor na Europa, decaindo de 48,8% para 39,8%, na América do Norte (42,7% para 26,6%) e Oceania (26,6% para 18,7%) . No entanto, nada mudou na Ásia, que de 53,6% subiu para 54,3%, e no Caribe e na América Latina, que decaiu de 62,8% para 60,2%(VENERITO et al, 2018).



**Figura 3:** Prevalência global da infecção por *Helicobacter pylori*. Fonte: HOOI et al, 2017

Conforme o padrão mundial, a infecção por *H. pylori* no Brasil marca a desigualdade socioeconômica, tendo em vista a maior prevalência em populações com piores condições de vida quando comparadas aos indivíduos com melhor nível socioeconômico e de escolaridade. Além do status socioeconômico, outros dois fatores de risco para adquirir infecção por *H. pylori* são condições de vida inadequadas e status sanitário. Em regiões onde há condições de saúde precárias, a taxa de infecção em crianças com idade entre 2 a 5 anos é de até 50% e o percentual de adultos infectados é de 70% a 90% (COELHO et al, 2018).

*H. pylori* é responsável por aproximadamente 90% dos casos de câncer gástrico no mundo (KOTILEA; BONTEMS; TOUATI, 2019). Estima-se que, em 2018, tenham surgido quase um milhão de novos casos de câncer gástrico (1.033.701 casos, 5,7% do total) no mundo, tornando-se a quinta neoplasia mais comum e a terceira causa de morte por câncer (782.685 mortes) (BRAY et al, 2018; RIBEIRO et al, 2019). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2018) a estimativa para o biênio 2018/2019 foi de 21.290 novos casos de câncer no estômago (13.540 em homens e 7.750 em mulheres) no Brasil. Entre os homens é o quarto tipo mais incidente e o sexto entre as mulheres. Na região nordeste, é o segundo tipo mais incidente entre os homens, perdendo apenas para o câncer de próstata.

No estado do Maranhão, no período de 15 anos (2000-2014), foram registradas 2087 mortes por câncer de estômago e foram estimados mais de 400 novos casos apenas para o ano de 2018. Na capital São Luís é o segundo mais incidente entre homens e o quinto entre mulheres. A incidência estimada de novos casos no biênio 2018/2019 foi de 130 novos casos, o que corresponde a um risco estimado de 16,67 novos casos a cada 100 mil homens e 7,95 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2018).

#### 1.1.5 Métodos diagnósticos

A depender da técnica utilizada na coleta de amostras, o diagnóstico da infecção da mucosa gástrica por *Helicobacter pylori* pode ser classificado em dois métodos: invasivos e não invasivos. Dentre os métodos invasivos, os quais necessitam de biopsias gástricas, são incluídos o teste rápido de urease, cultura, histopatológico, imunohistoquímica, técnica de hibridização fluorescente e testes moleculares (PCR). Os não invasivos incluem o teste respiratório com ureia contendo carbono marcado, teste de antígenos fecais e sorológico (VARGAS et al, 2019). Cada teste possui vantagens e limitações com relação à custos, reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade.

### 1.1.5.1 Testes invasivos

#### a) Teste Rápido de Urease (TRU)

É o teste invasivo mais amplamente utilizado, sendo considerado, atualmente, o método mais utilizado para detectar *H. pylori* na atividade diária, pois se trata de um teste fácil, rápido, eficiente e de baixo custo. Este teste baseia-se na presença da enzima urease, produzida por *H. pylori*. Uma amostra de biópsia gástrica é colocada em meio com um indicador de pH e a degradação da uréia é acompanhada por um aumento de pH detectado pela mudança de cor do indicador. No Brasil, o TRU somado ao teste histopatológico são os mais utilizados na pesquisa da *H. pylori* (RODRIGUES; NASCIMENTOS; MENEZES, 2016; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2016).

#### b) Histopatológico

Técnica realizada após endoscopia digestiva alta, dois ou mais fragmentos da mucosa gástrica são coletados do antro e do corpo gástrico e são corados para posterior identificação da bactéria (WANG et al, 2014). É considerado o método padrão-ouro para detectar a infecção pois além de fornecer informações sobre a presença da bactéria, permite avaliar alterações morfológicas na mucosa gástrica (PARIHAR; HOLLERAN; MCNAMARA, 2015). As biópsias de antro e corpo são geralmente recomendadas na prática clínica, porém a estratégia mais sensível consiste em obter duas biópsias de antro e duas biópsias de corpo (COSGUN et al, 2016; COELHO et al, 2018). Alguns fatores afetam a precisão do teste, tais como localização da retirada do fragmento, número de biópsias, técnica de coloração, uso de inibidores da bomba de prótons (IBPs), antibióticos e nível de experiência do patologista (COELHO et al, 2018).

### c) Cultura

Técnica com uso limitado devido às exigências para o crescimento bacteriano, que necessita de um meio de cultura complexo, com baixas concentrações de oxigênio e de CO<sub>2</sub> (5% de oxigênio e 10% de dióxido de carbono), temperatura ótima de 37°C e pH neutro (KUSTERS, 2006). Além do diagnóstico, esta técnica possibilita determinar a sensibilidade da bactéria aos antimicrobianos e sua capacidade de produzir citotoxinas (KROGFELT, 2005). No entanto, é um método caro e lento em relação ao TRU e histopatológico, além de apresentar especificidade e sensibilidade inferiores a estes (TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2016; VARGAS et al, 2019)

### d) PCR

Análises moleculares através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido frequentemente utilizadas para detecção bacteriana a partir da amplificação direta nas amostras de biópsia gástrica, bem como posteriormente ao cultivo e isolamento da bactéria presente nestas amostras (ASSUMPCÃO et al., 2010) Adicionalmente, a PCR permite identificar mutações pontuais, que são o principal mecanismo de resistência antimicrobiana (MÉGRAUD et al, 2015), além da genotipagem de linhagens e identificação de cepas virulentas, pela amplificação dos genes codificantes de produtos como as citotoxinas CagA e VacA (ASSUMPCÃO et al, 2010). Apresenta altíssima sensibilidade e especificidade, podendo ser feita, também, do suco gástrico, da placa dentária, da saliva, e até mesmo das fezes. (LEHOURS et al., 2003; MENONI et al., 2013; WONGPHUTORN et al.,2018).

### 1.1.5.2 Testes não-invasivos

#### a) Teste respiratório com Uréia marcada por carbono

É o teste não-invasivo padrão-ouro para a detecção da infecção por *H. pylori* pois possui uma excelente precisão, baixo custo e de fácil execução. Apesar disso, devido a restrições das autoridades nacionais para adquirir o substrato, o teste não foi incorporado na prática diária de diagnóstico no Brasil (COELHO et al, 2018). Baseia-se na atividade ureásica da bactéria e consiste na ingestão de uma solução de ureia marcada com carbono13 (C13) ou carbono14 (C14), sendo o primeiro o mais utilizado. Caso o indivíduo esteja infectado, a ureia é hidrolisada em CO<sub>2</sub> pela enzima urease e é excretada por via respiratória, podendo, assim, ser medida pela expiração (LOGAN; WALKER, 2001). Apresenta sensibilidade e especificidade superiores a 95% (LING, 2013).

#### b) Pesquisa de Antígenos fecais

O teste de antígeno fecal (TAF) consiste na identificação de antígeno *H. pylori* nas fezes pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) com uso de anticorpos monoclonais e policlonais (NORA, 2015). Apesar de ser menos aceito em alguns países, possui sensibilidade e especificidade maiores que 92% e foi validado para o diagnóstico inicial da infecção e terapia de erradicação em adultos (DEGUCHI et al, 2009; CALVET et al, 2010; COELHO et al, 2018). O TAF pode ser utilizado para pesquisar infecção em curso e para estabelecer a cura após a terapia (GISBERT; PAJARES, 2006).

#### c) Teste sorológico

Útil principalmente para rastreamento de infecção por *H. pylori* em estudos epidemiológicos, o teste sorológico consiste na detecção de anticorpos IgG específicos para *H. pylori* produzidos mediante resposta imunológica local à infecção (HO; MARSHALL, 2000). Segundo o IV Consenso Brasileiro (2018), acerca da infecção pelo *Helicobacter pylori*, os testes sorológicos localmente validados são os métodos de escolha para estudos

de rastreio de base populacional. O teste sorológico mais utilizado é o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) devido a sua maior precisão (BURUCOA et al, 2013). Apresenta vantagens como simplicidade em sua execução, baixo custo e o mínimo desconforto ao paciente, entretanto, métodos sorológicos que pesquisam anticorpos têm valor limitado para diagnóstico de infecção aguda e confirmação da erradicação visto que os títulos de anticorpos *H. pylori* específicos diminuem lentamente, permanecendo elevados por um tempo após a erradicação bacteriana. Portanto, esse teste não deve ser utilizado para monitorar a infecção bacteriana pois a identificação destes anticorpos não implica em infecção ativa (DUNN et al, 1997; BRADEN et al, 2000; BROWN, 2000).

Numa revisão sistemática atual sobre os métodos diagnósticos para detecção da infecção, Vargas et al (2019) relatam que, dentre os métodos não invasivos revisados, o teste respiratório com ureia marcada com isótopo estável ( $^{13}\text{C}$ -UBT) é o que apresenta maior acurácia, especificidade, sensibilidade quando comparado aos outros testes não invasivos. Além disso, o teste pode ser realizado em pacientes a partir dos 6 meses de vida e é considerado o teste de eleição para crianças, sendo também indicado para realizar o controle de cura após a realização do tratamento para erradicação do *H. Pylori*. Por outro lado, entre os métodos invasivos, o teste molecular (reação em cadeia da polimerase – PCR) é o que apresenta maior taxa de sucesso na detecção da infecção por *H. pylori* quando comparado com os outros testes invasivos. (VARGAS et al, 2019)

## 2. JUSTIFICATIVA

É estimado que 50% da população mundial apresenta a mucosa gástrica colonizada por *H. pylori*, classificada como carcinógeno de classe I pela Organização Mundial de Saúde, em 1994. A infecção pode permanecer ativa por décadas e outras afecções além das gastrites, úlceras e carcinomas gástricos estão associados a ela, como linfoma de tecido linfoide associado à mucosa gástrica, dispepsia não-ulcerativa, doenças coronarianas e cardiovasculares (PATEL et al., 1995; OZDOGRU et al., 2008).

Levantamentos epidemiológicos em países como a Colômbia, Peru e Brasil, mostram que existe uma correlação entre alta prevalência da infecção pela *H. pylori*, principalmente das cepas ditas de maior virulência, e a elevada prevalência de doenças gástricas (BARBOSA et al., 2009; ZILBERSTEIN et al., 2013).

No estado do Maranhão, poucos são os artigos publicados que abrangem o contexto da importância dessa espécie bacteriana no desenvolvimento de doenças gástricas (ARAÚJO; CARVALHO; SERRA, 2016) e estes trabalhos em humanos limitam-se apenas ao uso de métodos diagnósticos clássicos (BEZERRA, 1998). Foram registrados no estado, no período de 15 anos (2000-2014), 2087 mortes por câncer de estômago; na capital São Luís é o segundo mais incidente entre homens e o quinto entre mulheres. A incidência estimada de novos casos no biênio 2018/2019 foi de 130 novos casos, o que corresponde a um risco estimado de 16,67 novos casos a cada 100 mil homens e 7,95 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2018). Contudo, até o presente momento, nenhum estudo foi realizado buscando detectar a presença do gene de virulência *cagA* em linhagens de *Helicobacter pylori* circulantes na cidade de São Luís. Visto isso e a importância da bactéria na gênese de doenças gástricas, o presente trabalho visa realizar o diagnóstico molecular da bactéria *Helicobacter pylorie* detectar o gene de virulência *cagA* em pacientes atendidos em São Luís.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Geral**

- Realizar o diagnóstico molecular da infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* em pacientes atendidos em serviços especializados de endoscopia digestiva da capital São Luís, MA.

#### **Específicos**

- Identificar a infecção bacteriana através da amplificação do gene constitutivo *glmM*;
- Avaliar a ocorrência de cepas virulentas *cagA*-positivas na população alvo.

## REFERÊNCIAS

ALHUSSAINI, M. S. Prevalence of *Helicobacter pylori* among patients with different gastrointestinal disorders in Saudi Arabia. **Medical Journal of Indonesia**, v. 25, n. 4, p. 214-20, 2016.

AZEVEDO, M. et al. Infection by *Helicobacter pylori* expressing the BabA adhesin is influenced by the secretor phenotype. **J Pathol**. 2008;215:308-16

BAHÚ, M. G. S. Infecção por *Helicobacter pylori* em crianças com dor abdominal crônica e sua associação com a gastrite endoscópica nodular. 2010. 219 f. **Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2010.

BARBOSA, J. A.; SCHINONNI, M. I. *Helicobacter pylori*: Associação com o câncer gástrico e novas descobertas sobre os fatores de virulência. **Rev. de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 3, p. 254-262, 2011.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

COELHO, L.G.V. et al. IVth Brazilian consensus conference on *Helicobacter pylori* infection. **Arq Gastroenterol**. 2018;55(2):97.

COELHO, E. et al. Molecular Mechanisms for Adhesion and Colonization of Human Gastric Mucosa by *Helicobacter pylori* and its Clinical Implications. **Acta medica portuguesa**, v. 29, n. 7-8, p. 476-483, 2016.

COELHO, L. G. V. et al. IVth Brazilian Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 55, n. 2, p. 97-121, 2018.

DEN HOLLANDER, W. J. et al. *Helicobacter pylori* colonization and obesity—a Mendelian randomization study. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2017.

EUSEBI, L. H.; ZAGARI, R. M.; BAZZOLI, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 19, p. 1-5, 2014.

FERNANDES, Y. C. F.; BONATTO, G. da R.; BONATTO, M. W. Recurrence rate of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer five years or more after successful eradication. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 53, n. 3, p. 152-155, 2016.

FOX, J. G.; WANG, T. C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. **J Clin Invest**. 2007;117:60-9.

FRANCESCHI, F.; ROCCARINA, D.; GASBARRINI, A. Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori*: Other *Helicobacters*. **Helicobacter**. 2008; 13(Suppl.1):47-57.

FRANCESCHI, F.; COVINO, M.; B., Claire Roubaud. Helicobacter pylori and extragastric diseases. **Helicobacter**, v. 24, 2019.

GOODWIN, C. STEWART et al. Transfer of Campylobacter pylori and Campylobacter mustelae to Helicobacter gen. nov. as Helicobacter pylori comb. nov. and Helicobacter mustelae comb. nov., respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 397-405, 1989.

GRAHAM, D. Y. Benefits from elimination of Helicobacter pylori infection include major reduction in the incidence of peptic ulcer disease, gastric cancer, and primary gastric lymphoma. **Preventive Medicine**. v. 23, p. 712-716, 1994.

GRAHAM, D. Y.; MIFTAHUSSURUR, M. Helicobacter pylori urease for diagnosis of Helicobacter pylori infection: A mini review. **Journal of advanced research**, v. 13, p. 51-57, 2018.

GUIMARÃES, J.; CORVELO, T. C.; BARILE, K. A. Helicobacter pylori: fatores relacionados à sua patogênese. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, p. 33-38, 2008.

BARBOSA, H. P. M. et al. Interleukin-1 and TNF- $\alpha$  polymorphisms and Helicobacter pylori in a Brazilian Amazon population. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 15, n. 12, p. 1465, 2009.

HOOI, J. K. Y. et al. Global prevalence of Helicobacter pylori infection: systematic review and meta-analysis. **Gastroenterology**, v. 153, n. 2, p. 420-429, 2017.

KOTILEA, K.; BONTEMS, P.; TOUATI, E.. Epidemiology, Diagnosis and Risk Factors of Helicobacter pylori Infection. 2019.

KUSTERS, J. G.; VAN VLIET, A. H.; KUIPERS, E. J. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. **Clinical Microbiology Reviews**. 2006;19(3):449-490

LADEIRA, M. S. P.; SALVADORI, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do Helicobacter pylori. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 335-342, 2003.

LIMA, P. V.; RABENHORST, S. H. B; Genes Associados à Virulência de Helicobater Pylori. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.55, n. 4, p. 389-396. 2009.

LING, D. Carbon-13 urea breath test for H. pylori infection in patients with uninvestigated ulcer-like dyspepsia: an evidence-based analysis. **Ontario Health Technology Assessment Series**; Vol. 13: No. 19, pp. 1-30, October 2013

MARSHALL, B. J.; GOODWIN, C. S. Revised nomenclature of Campylobacter pyloridis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 68-68, 1987.

WARREN, J. R.; MARSHALL, B.. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **The lancet**, v. 321, n. 8336, p. 1273-1275, 1983.

MENEZES, G. L. et al. Aplicações da Biologia Molecular no Diagnóstico de Helicobacter Pylori: Revisão da Literatura. **SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO**, v. 1, n. 1, p. 132-140, 2015.

MICU, G. et al. Helicobacter pylori: Pathological Mechanism Involved in Gastric Colonization. **Romanian Journal of Internal Medicine**, Romania, v. 47, n. 4, p. 341-346, 2009.

MONTECUCCO, C. et al. Helicobacter pylori Vacuolating Cytotoxin: Cell Intoxication and Anion-Specific Channel Activity. **Pore-Forming Toxins**, vol. 257, p. 113-129, 2001.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia medica**. 6. ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier, 2009.

NEVOA, J. C. et al. Molecular technique for detection and identification of Helicobacter pylori in clinical specimens: a comparison with the classical diagnostic method. Goiânia: Universidade Federal do Goiás; 2017.

OLIVEIRA, M. A. A. Sítios de fosforilação de tirosina da proteína cagA e genótipos cagE do H. pylori em pacientes com gastrite e úlcera péptica. **Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas**, Fortaleza, 2014.

PAJARES, J. M.; GISBERT, J. P. Helicobacter pylori: its discovery and relevance for medicine. **Revista Espanola de Enfermedades Digestivas**, v. 98, n. 10, p. 770, 2006.

PEEK, R. M. et al. Helicobacter pylori strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. **Cancer Research**, v. 59, p. 6124-6131, 1999.

POSSELT, G.; BACKERT, S.; WESSLER, S. The functional interplay of helicobacter pylori factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. **Cell Commun Signal**. 2013.

RESHETNYAK, V. I.; RESHETNYAK, T. M.. Significance of dormant forms of Helicobacter pylori in ulcerogenesis. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 27, p. 4867, 2017.

RIBEIRO, H. G.; DE FREITAS COELHO, M. C.; COELHO, L. G. V. Avaliação do risco de câncer gástrico em pacientes com gastrite crônica por Helicobacter pylori. **Rev Med Minas Gerais**, v. 29, n. Supl 4, p. 11-15, 2019.

RODRIGUES, R. L. et al. Contribuição ao estudo comparativo do diagnóstico laboratorial clássico e molecular de helicobacter pylori: Uma abordagem investigativa. **Saúde & Ciência em Ação - Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**. 2016;1(1):1-1

RODRIGUES, J. A. et al. GENES DE VIRULÊNCIA EM Helicobacter pylori: COMPONENTES ESTRUTURAIS E MÉTODOS DE DETECÇÃO. **SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO**, v. 3, n. 2, p. 10-22, 2017.

STEENSMA, D. P.; KYLE, Robert A.; SHAMPO, Marc A. J. Robin Warren: Helicobacter pylori and peptic ulcer. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2016. p. e129-e130.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. Helicobacter pylori infection. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 15, p. 1175-1186, 2002.

SUZUKI, R.; SHIOTA, S.; YAMAOKA, Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of Helicobacter pylori. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 203-213, 2012.

TEIXEIRA, T. F, SOUZA, I. K. F, ROCHA, R. D. R. Helicobacter pylori: infecção, diagnóstico laboratorial e tratamento. **Percorso Acadêmico**. 2016;6(12):1-11.

VARGAS, L. J. et al. Métodos diagnósticos para detecção da infecção pelo h. pylori: revisão sistemática. **Pará Research Medical Journal**, v. 3, n. 2, p. 0-0, 2019.

VENERITO, M. et al. Gastric cancer: epidemiology, prevention, and therapy. **Helicobacter**, v. 23, p. e12518, 2018.

WARREN, J. R.; MARSHALL, B. J. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v. 161, n. 8390, p. 1311-1315, 1984.

WEEKS, D. L.; SACHS, G. Sites of pH regulation of the urea channel of Helicobacter pylori. **Mol Microbiol**, v. 40, n. 6, p. 1249-1289, 2001.

WIJETUNGE, S. et al. Prevalence of Helicobacter pylori in benign gastric ulcers in a cohort of Sri Lankan patients. **Ceylon Med J**, v. 60, p. 152-154, 2015.

WONGPHUTORN, P. et al. Detection and genotyping of Helicobacter pylori in saliva versus stool samples from asymptomatic individuals in Northeastern Thailand reveals intra-host tissue-specific H. pylori subtypes. **BMC microbiology**, v. 18, n. 1, p. 10, 2018.

**Artigo – Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**  
**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA BACTÉRIA *HELICOBACTER PYLORI* NA**  
**POPULAÇÃO DE SÃO LUÍS-MA**

Amanda Monteiro Silva, Selma Santos Maluf, Flávia Raquel Fernandes do Nascimento,  
Hivana Patrícia Melo Barbosa Dall’Agnol

**RESUMO**

*Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram-negativa com morfologia bacilar espiralada com múltiplos flagelos que coloniza a mucosa estomacal causando complicações gástricas que podem evoluir para gastrites, úlceras, dispepsias e carcinomas. A infecção por *H. pylori* é uma das mais prevalentes entre os seres humanos, afetando cerca de metade da população mundial. Desde a sua descrição inicial, vários métodos para diagnóstico da infecção por essa bactéria têm sido desenvolvidos e aprimorados. A reação da polimerase em cadeia (PCR) é um método que permite detectar *H. pylori* e descobrir informações genéticas desta, tais como fatores de virulência e de resistência. Apresenta altíssima sensibilidade e especificidade, podendo ser feita diretamente de biópsias gástricas sem a necessidade de cultivo bacteriano. O gene *glmM* é bastante utilizado na detecção do DNA da bactéria. As amostras de biópsias gástricas utilizadas neste estudo são provenientes de 67 pacientes positivos para *H. pylori* em análise histológica de mucosa gástrica e TRU. O DNA da bactéria *Helicobacter pylori* foi detectado em biópsias por amplificação do gene *glmM* de 44 pacientes. Dentre essas amostras, 19 foram positivas para o gene *cagA*. Cepas *cagA*-positivas tendem a ser mais virulentas, portanto estão altamente associadas às formas mais graves da infecção, principalmente na carcinogênese gástrica. Esse estudo é o primeiro a realizar o diagnóstico molecular da bactéria e a relatar a ocorrência do gene *cagA* na cidade de São Luís-MA.

**Palavras-chave:** *H. pylori*, PCR, *cagA*

## INTRODUÇÃO

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria gram-negativa com morfologia espiralada, variando em tamanho de 3 a 5µm de comprimento e cerca de 0,5µm de diâmetro, altamente móvel, microaerófila, produtora de urease, catalase e oxidase. Esse microrganismo coloniza a mucosa estomacal, especificamente as microvilosidades, infectando as células epiteliais que secretam muco, preferindo a região antral. Está associada a várias doenças gastrointestinais, como gastrite crônica, úlcera péptica, linfoma do tecido linfoide associado à mucosa e câncer gástrico (MADIGAN et al, 2016; NEVOA et al, 2017; PINTO, 2007).

É um patógeno bem adaptado e persiste no hospedeiro mesmo com ação do sistema imunológico, devido à presença de regiões hipervariáveis em genes codificantes de estruturas que permitem a bactéria evadir-se das respostas imunológicas, principalmente através da alteração de seus antígenos de superfície (RODRIGUES et al, 2017).

A alta capacidade de adaptação e resistência ao meio ácido do estômago são devidas, principalmente, à produção de urease, proteína de alto peso molecular (500 a 600 kDa), que converte a ureia presente em condições fisiológicas no suco gástrico em amônia e CO<sub>2</sub> (BAHÚ, 2010; MICU et al., 2009). A amônia, que atua como receptor de íons H<sup>+</sup>, neutraliza o pH do suco gástrico ao redor da bactéria conferindo ao patógeno proteção contra os efeitos deletérios da acidez gástrica (WEEKS; SACHS, 2001; VOLAND et al., 2003).

Sua distribuição é universal e, atualmente, há três meios de transmissão comprovados: (1) fecal-oral, cujo principal meio para contaminação é a água contaminada, normalmente em países em desenvolvimento; (2) oral-oral, tornando-se possível pelo fato da bactéria ter sido encontrada no suco gástrico em regurgitações; e (3) iatrogênica, através da qual a contaminação ocorre pelo uso de equipamentos esterilizados de forma incorreta ou não esterilizados em exames (MENEZES et al, 2015). Más condições sanitárias, de vida e econômicas são considerados os fatores de risco para a infecção por *H. pylori* (COELHO et al, 2018; VARGAS et al, 2019).

Para o diagnóstico da infecção em humanos pela bactéria *H. pylori*, testes endoscópicos (invasivos) e não-endoscópicos (não-invasivos) foram desenvolvidos e estão disponíveis, tanto para fins diagnósticos como para pesquisa científica. Na realização de testes endoscópicos, é feita a coleta de biópsia gástrica para técnicas de histopatologia, teste da urease, cultura e PCR. Dentre os testes não endoscópicos, destacam-se as provas sorológicas, realizadas normalmente através de kits de ELISA, o teste respiratório com

carbono marcado e a detecção de antígeno bacteriano nas fezes, ideal para o diagnóstico na infância (BRADEN et al., 2000). Cada teste possui vantagens e limitações, com relação à custos, reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade.

Análises moleculares através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido frequentemente utilizadas para detecção bacteriana a partir da amplificação direta nas amostras de biópsia gástrica, bem como posteriormente ao cultivo e isolamento da bactéria presente nestas amostras. Adicionalmente, a PCR permitiu a genotipagem de linhagens e identificação de cepas virulentas, pela amplificação dos genes codificantes de produtos como as citotoxinas CagA e VacA (ASSUMPÇÃO et al., 2010).

A proteína CagA, codificada pelo gene *cagA* (*cytotoxin associated gene*), o primeiro gene identificado em *H. pylori* e fortemente associado ao risco para o desenvolvimento de úlcera e câncer gástrico, é um dos vários genes que compõem a ilha de patogenicidade cag (cagPAI). A ilha de patogenicidade cagPAI é um componente do genoma de *H. pylori* (podendo estar presente, ausente ou incompleta) encontrada em 60% a 70% das estirpes. Contém 31 genes, dentre os quais, além do *cagA*, estão o *cagE*, *cagT* e *cagL*, que são homólogos aos de outras bactérias que codificam componentes do sistema de secreção do tipo IV (T4SS), cuja função é transferir proteínas e complexos núcleo-proteicos através das membranas. O sistema de secreção do tipo IV forma uma estrutura tipo pilus, semelhante a uma seringa, utilizada no transporte da proteína CagA e outros fatores de virulência de *H. pylori* para a célula gástrica epitelial, permitindo que a bactéria module vias de metabolismo celular da célula hospedeira, incluindo a expressão de proto-oncogenes (PEEK et al, 1999; HATAKEYAMA, 2009; BACKERT; CLYNE, 2011; OLIVEIRA, 2014).

As cepas cagA-positivas tendem a ser mais virulentas e, portanto, altamente associadas às formas mais graves da infecção, principalmente na carcinogênese gástrica. Essa proteína, ao ser injetada na célula hospedeira, induz alterações na fosforilação de tirosinas, nas vias de sinalização e de transdução da célula hospedeira, resultando em rearranjos do citoesqueleto e alterações morfológicas que levam à variação do comprimento da proteína e qualquer variação em seu comprimento pode levar a diferentes respostas do hospedeiro, incluindo diferentes graus de resposta inflamatória (KIKUCHI et al., 1999).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Casuística e questões éticas**

As amostras utilizadas neste estudo fazem parte do projeto intitulado “Avaliação da polarização dos macrófagos em pacientes infectados por *Helicobacter pylori* e a relação com a suscetibilidade do hospedeiro” (PPGCS. 2018-atual), aprovado pelo comitê de ética da referida instituição, com parecer de nº 177.577.

Foram incluídos neste estudo 67 pacientes maiores de idade atendidos no serviço de endoscopia do Hospital Universitário HUUFMA Unidade Presidente Dutra, localizado na capital São Luís – MA, os quais foram informados sobre a pesquisa de maneira acessível e convidados a participar voluntariamente da mesma. Conforme rege a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre aspectos éticos envolvendo a pesquisa com seres humanos, os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, autorizando, assim, a coleta do material biológico e de informações pessoais.

### **Coleta e armazenamento das amostras**

As amostras de biópsias de mucosa gástrica foram coletadas de pacientes encaminhados para o Serviço de Endoscopia do HU-UFMA, provenientes dos ambulatórios de Clínica Geral e de Endocrinologia do mesmo hospital, com sintomas dispépticos, durante o exame de endoscopia digestiva alta, no período de janeiro a dezembro de 2013. Foram coletados fragmentos da região antral utilizando uma pinça gástrica, os quais foram armazenados em microtubos devidamente estéreis e independentes contendo meio RPMI-1640 e depois congelados em freezer -20°C para posterior extração de DNA bacteriano realizada neste estudo. Biópsias gástricas foram também tomadas para o exame histopatológico com pesquisa de *Helicobacter pylori* e para o teste rápido de urease.

## **Extração do DNA bacteriano em tecido de biópsia gástrica**

Para a extração do DNA, as amostras foram descongeladas, retiradas dos tubos, transferidas para microtubos limpos de 1,5µl e maceradas com o auxílio de pistilos estéreis. O tecido macerado foi ressuspensionado com 500µl de tampão TLN (Tris 10 mM; NaCl 400mM; EDTA 2 mM), depois adicionou-se 40µl de SDS 10% (Duodecil Sulfato de Sódio) aos tubos, os quais foram levados ao banho-maria à 37°C por 30 minutos. Após isso, o material foi resfriado em temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos e, em seguida, adicionou-se 40µL de proteinase K na concentração de 20mg/mL. As amostras foram incubadas a 55°C em banho-maria *overnight*, até não mais ser visualizada a presença de tecido íntegro.

No dia seguinte, após aproximadamente 18 horas, adicionou-se às amostras 20µL de RNase, as quais foram homogeneizadas e levadas novamente ao banho-maria, à 37°C por 30min. Em seguida, em capela de exaustor de gases, foram adicionados 500µl de solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizados em agitador tipo vortex. Os tubos foram centrifugados a 12.000 RPM à 4°C por 15min em centrífuga Eppendorf™ Centrifuge 5804 R (Fisher Scientific); o sobrenadante foi transferido para novos tubos devidamente identificados. Após isso, foram adicionados ao sobrenadante 500µL de solução clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), o qual foi centrifugado nas mesmas condições anteriores e posteriormente transferido para tubos novos nos quais adicionou-se 200µl de acetato de sódio (3M, pH 4,8) e isopropanol gelado para completar o volume do tubo. As amostras foram armazenadas a -20°C por 12 horas.

Posteriormente, as amostras foram retiradas do freezer e centrifugadas a uma velocidade de 12.000 RPM à 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado invertendo os tubos totalmente e rapidamente, depois adicionou-se aos tubos 500µL de etanol 70% gelado e, com o auxílio da ponteira, o pellet foi ressuspensionado. Os tubos foram centrifugados novamente nos parâmetros anteriormente descritos. Em seguida, o etanol 70% foi descartado e as amostras foram guardadas à temperatura ambiente para secagem, protegidas, para que não houvesse contaminação. Após totalmente secas, acrescentou-se 40µL de tampão TE (Tris HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM) ao pellet. As amostras foram deixadas eluindo por cerca de 1h em temperatura ambiente e depois armazenadas em freezer -20°C.

No dia seguinte foi feita a quantificação e análise da integridade das amostras de DNA utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). A absorvância foi mensurada em 230 nm, 260 nm e 280 nm, como A260/A280 e A260/230.

### Diagnóstico Molecular

Foram amplificadas por PCR convencional, realizada em termociclador Applied Biosystems Veriti 96-Well, regiões do DNA utilizadas para identificação da espécie bacteriana. Dois pares de primers previamente descritos na literatura foram utilizados (glmM F – glmM R e CagA/ConF – CagA/ConR), cujas sequências, genes alvos e tamanho dos fragmentos amplificados estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição dos primers utilizados para diagnóstico de *H. pylori*

Primer	Gene alvo	Sequência 5'-3'	Amplicom	Referência
glmM F	<i>glmM (ureC)</i> , gene constitutivo essencial para o crescimento e síntese de parede celular da bacteria <i>H. pylori</i> .	GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG	294pb	Hays et al, 2019.
glmM R		GCTTGCTTTCTAACACTAACGCGC		Tomazini et al, 2003.
CagA/ConF	<i>cagA</i> , gene marcador de cepas virulentas.	GTGCCTGCTAGTTTGTACGCG	402pb	ROTA et al, 2001.
CagA/ConR		TTGGAAACCACCTTTTGTATTAGC		

Para a amplificação do DNA bacteriano foi utilizado a solução PCR SuperMix da invitrogen™, contendo todos os componentes necessários para sua realização: TaqDNA polimerase (22 U/mL), Tris-HCl pH 8.4 (22mM), KCl (55mM), MgCl<sub>2</sub> (1.65 mM), dNTP's (220uL cada) e estabilizadores.

Para cada reação foram utilizados 22,5µL do SuperMix, 1,0µl (0,4µM) de cada primer e o volume das amostras de DNA variavam de acordo com a concentração de cada uma delas, podendo variar de 2µL a 4µL. As condições da PCR para ambos pares de primers

foram: desnaturação a 94°C durante 3 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 52°C por 30s e extensão a 72°C por 90s, e uma extensão final a 72°C durante 10min.

Após a amplificação de cada genótipo, os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1x (Tris 0,089M, ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M) e corados com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), depois submetidos a eletroforese horizontal, cuja corrida teve como parâmetros: voltagem 90, corrente 270, durante 40 minutos, e em seguida visualizados em transiluminador com luz LED, com imagem capturada digitalmente.

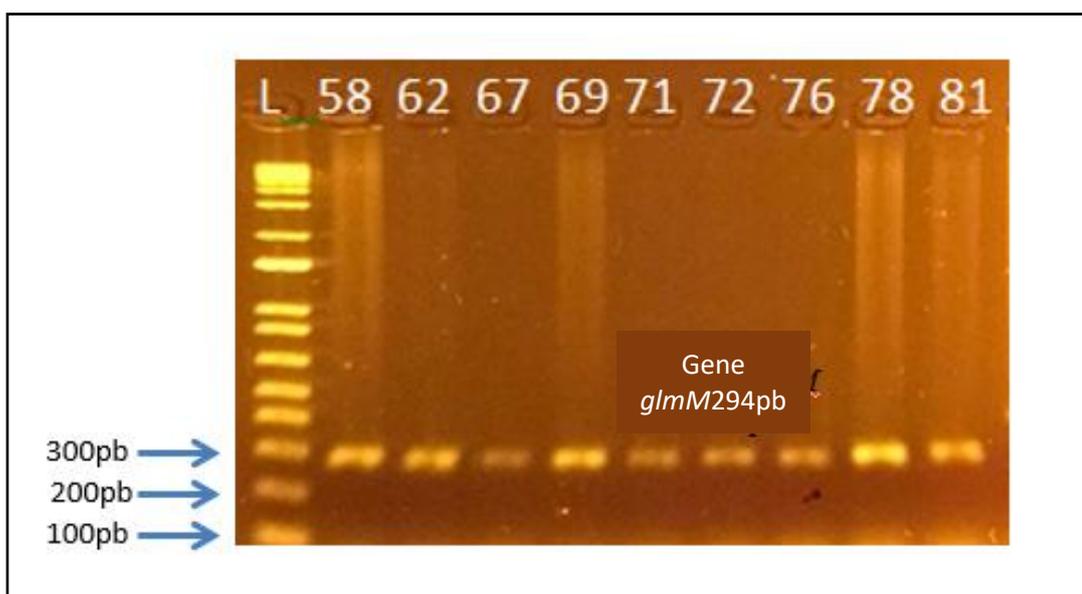
## RESULTADOS

As amostras de biopsias gástricas utilizadas neste estudo são provenientes de 67pacientes com faixa etária de 18 a 79 anos,46(68,65%) do sexo feminino e 21 (31,35%) do sexo masculino (Tabela 2). Todos estes pacientes receberam diagnóstico positivo para *Helicobacter pylori* (HP) em análise histopatológica de mucosa gástrica e/ou teste rápido de urease (TRU), sendo que 61 (91,05%)tinham resultados concordantes entre os testes, enquanto que5(7,46%) possuíam resultados discordantes entre os mesmos.

**Tabela 2:** Características dos pacientes diagnosticados com *H. pylori*.

Variáveis	n	%
<b>Gênero (n = 67)</b>		
Masculino	21	31,35%
Feminino	46	68,65%
<b>Idade (n = 67)</b>		
>30	56	83,58%
<30	11	16,42%

Foi possível extrair DNA de todas as amostras incluídas neste estudo (n=67), a concentração média de DNA foi de cerca de 87,5ng/μL. O DNA da bactéria *Helicobacter pylori* foi detectado em 43 (64,18%) pacientes por amplificação do gene constitutivo *glmM*, como ilustra a figura 4. A comparação dos testes clássicos e PCR pode ser observada na tabela 3.



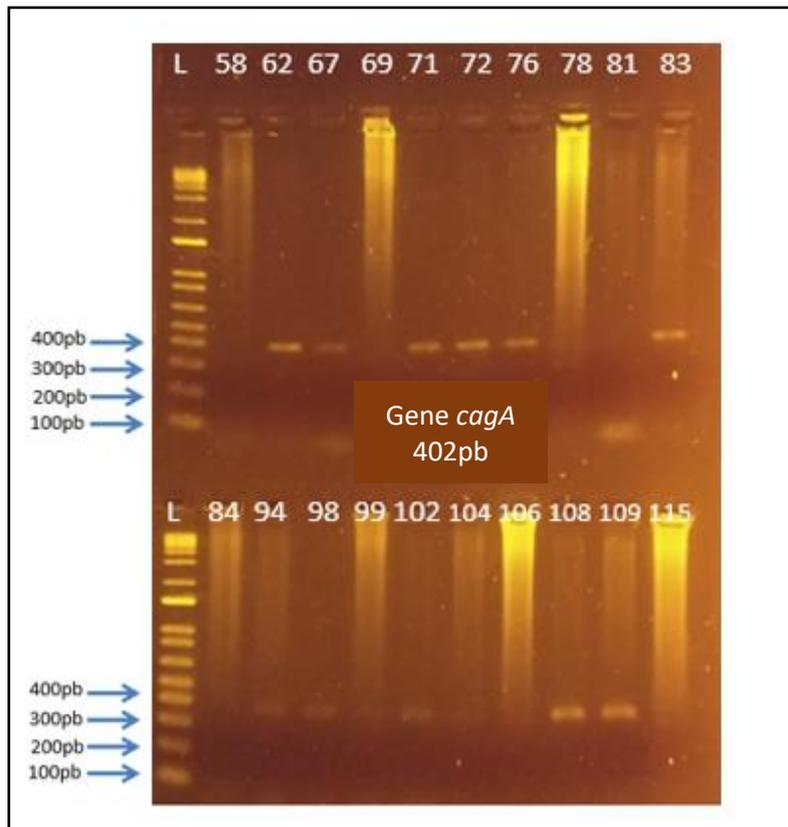
**Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Amplificação do gene *glmM* confirmando a infecção pela *Helicobacter pylori* em 9 pacientes dos 43 pacientes positivos molecularmente. Faixa L: ladder 100pb.

**Tabela 3:** Resultados dos diagnósticos clássicos e molecular da bactéria *Helicobacter pylori* pelo gene *glmM*, São Luís, Maranhão.

Resultado	Diagnóstico Clássico		PCR
	TRU	Histopatológico*	<i>glmM</i>
Positivo	64	64	43
Negativo	3	2	24

\*Para 1 paciente não foi possível ter acesso ao resultado histopatológico para pesquisa de *H. pylori*.

Dos pacientes que tiveram diagnóstico molecular positivo para *H. pylori* através da amplificação do gene *glmM* (N=44), um total de 34 puderam ser testados para o gene de virulência *cagA*. Destes, 19 (55,89%) foram confirmados como portadores do gene de virulência (Figura 5).



**Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando 13 dos 19 pacientes *cagA* positivos. Faixa L: ladder 100pb.

Não foi possível amplificar o gene *glmM* em nenhum dos pacientes discordantes nos testes clássicos, apesar de ter sido recuperado DNA dos mesmos. Por outro lado, o paciente que não foi possível acessar o resultado histopatológico, teve seu diagnóstico positivo confirmado pela amplificação do gene *glmM*, e ainda a confirmação da presença da cepa virulenta *cagA* positiva (Tabela 4).

**Tabela 4:** Resultados dos diagnósticos clássicos e molecular da bactéria *Helicobacter pylori* para os pacientes com resultados discordantes e/ou ausentes.

Pacientes	Diagnóstico Clássico		PCR	
	TRU	Histopatológico	<i>glmM</i>	<i>cagA</i>
PAC1	+	-	-	NT
PAC21	+	-	-	NT
PAC38	+	ND	+	+
PAC36	-	+	-	NT
PAC40	-	+	-	NT
PAC118	-	+	-	NT

ND= resultado não disponível; NT= não testado neste estudo

Informações acerca do diagnóstico histopatológico de metaplasia intestinal foram acessadas para 26 pacientes deste estudo, a partir do laudo histopatológico da biópsia gástrica dos mesmos. A relação da infecção pela *H. pylori*, pesquisa dos dois marcadores moleculares de infecção e de virulência, *glmM* e *cagA*, respectivamente, com a presença ou ausência de metaplasia estão detalhadas na tabela 5.

**Tabela 5:** Achados histopatológicos quanto a presença ou ausência de metaplasia intestinal em pacientes HP-positivos para os métodos clássicos testados para os genes *glmM* e *cagA*.

Laudo histopatológico	Marcadores moleculares		Total (N)
	<i>glmM</i> +	<i>glmM</i> -	
<b>Metaplasia</b>			
Presente	7	3	10
Ausente	11	5	16
<b>Metaplasia</b>			
Presente	2	4	6
Ausente	1	3	4

## DISCUSSÃO

A bactéria *H. pylori* infecta aproximadamente metade da população mundial e está associada a várias doenças gastrointestinais, como gastrite crônica, úlcera péptica, linfoma associado à mucosa e câncer gástrico (COVER; BLASER, 1996). Esta infecção é uma das mais comuns e prevalentes em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento (RESHETNYAK, V.; RESHETNYAK, T., 2017).

Foi possível extrair DNA de todas amostras utilizadas no presente estudo para realização do diagnóstico molecular, mesmo com o tempo prolongado de armazenamento. O uso de materiais retrospectivos em pesquisas, que é de grande relevância para evitar a necessidade de repetir o procedimento invasivo para coletar outra amostra, é apenas uma das vantagens do método utilizado neste estudo (MENONI et al 2013).

Além disso, a extração e posterior amplificação do DNA bacteriano foi realizado diretamente de biópsias gástricas sem a necessidade de cultura prévia do microrganismo, fornecendo, assim, rapidez, menor custo e menor dificuldade técnica. O cultivo da bactéria é raramente utilizado na prática médica diária em razão da complexidade e das exigências para o crescimento; a necessidade de cuidados especiais no transporte das amostras, o crescimento lento de *H. pylori* e a necessidade de meios de cultura apropriados, na maioria das vezes indisponíveis (MEGRAUD, 2007).

O objetivo deste estudo foi realizar o diagnóstico molecular da bactéria *Helicobacter pylori* em biópsias gástricas, além da detecção do gene *cagA* que codifica um importante fator de virulência da bactéria. O diagnóstico molecular dos pacientes analisados neste estudo, feito a partir da amplificação do gene *glmM*, detectou o mesmo em mais de 60% (64,18%) dos pacientes. Este gene constitutivo codifica uma fosfoglicosamina mutase, essencial para o crescimento e síntese da parede celular bacteriana (DE REUSE; LABIGNE; MENGIN-LECREULX, 1997) e é amplamente utilizado em estudos desse modelo (ESPINOZA, 2011; CONTRERAS et al, 2015; EGHBALI et al, 2016; KAZEMI et al, 2016; HAYS et al, 2019; BAZIN et al, 2018).

Quanto à técnica utilizada para o diagnóstico molecular, a acurácia, sensibilidade e especificidade da PCR convencional está diretamente relacionada ao conjunto de primers utilizados para a amplificação do DNA alvo, ao número de cópias do DNA a ser amplificado, ao método de extração de DNA escolhido, ao tipo de material a ser analisado e ao protocolo utilizado (BASTIEN; PROCOP; REISCHL, 2008). O número de biópsias realizadas, a

densidade de bactérias presentes em cada biópsia e a presença de *H. pylori* no material endoscópico são também relevantes (LIMA; RABENHORST, 2009). A ocorrência de alterações histológicas na mucosa gástrica, a exemplo da metaplasia, podem ser responsáveis pela insuficiente presença de bactéria na amostra (CESAR et al 2005).

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta inúmeras vantagens, além da descrita anteriormente, como uma possibilidade de genotipagem de amostras para identificar diferentes cepas da espécie; a detecção em amostras que contêm pequena quantidade de DNA; além de permitir a amplificação de genes de resistência a antibióticos sem a necessidade de realizar um teste convencional de suscetibilidade a antibióticos (MENONI et al 2013).

Outro objetivo do estudo que foi explorado está relacionado à análise da ocorrência do gene *cagA* por PCR, pela primeira vez sendo relatada na cidade de São Luis. Mais de 50% (55,89%) dos pacientes testados nesse estudo foram confirmados como portadores de cepas que possuem o gene de virulência. A prevalência de *cagA* é bastante variada entre as regiões brasileiras. Uma elevada prevalência de cepas *cagA*-positivas também foi verificada em outros estados do norte e nordeste, como Amapá (ALVES, 2017), Ceará (PARENTE, 2016) e Pernambuco (BRITO et al, 2003) que apresentaram prevalência acima 70% nas populações estudadas, enquanto no Pará (VINAGRE et al, 2015) a prevalência foi de 85,6%. Rasmussen et al (2012) observou uma prevalência de 72% de cepas *cagA*-positivas na cidade de São Paulo – SP, enquanto que no interior do estado, Marília – SP, o percentual foi baixo, 47,8% (PEREIRA et al, 2014). Por outro lado, a região Sul do país é a que possui menor prevalência do gene *cagA*. Oliveira et al (2014) relataram uma prevalência de 29,6% em Porto Alegre, RS.

Nosso estudo detectou pacientes *cagA*-positivos com laudo histológico positivo para metaplasia, esta alteração é considerada uma condição pré-neoplásica importante na cascata da carcinogênese gástrica (CORREA, 2011), porém não foi possível verificar a significância estatística para esse achado. Resultados semelhantes foram relatados para a população indiana, onde não foi visto associação entre metaplasia intestinal, infecção pela bactéria *H.pylori* e a positividade para o gene *cagA*(VADIVEL et al, 2018).No Brasil, Meine et al (2011) relataram uma maior frequência de metaplasia entre pacientes *H. pylori* e *cagA* positivos na população de Porto Alegre, RS.

Observamos a amplificação dos dois marcadores moleculares aqui testados (*glmM* e *cagA*) para 1 paciente (Pac48) negativo em ambos métodos diagnóstico clássicos, estes testes

são os recomendados no mais recente consenso brasileiro para diagnóstico (COELHO et al, 2018). Adicionalmente, foi amplificado o marcador 23S rRNA em alguns pacientes, o que reforça o diagnóstico molecular pelo *glmM*. Além disso, a amplificação do gene 23S rRNA gera uma possibilidade de novos estudos na população maranhense, visto que mutações pontuais nesse gene estão relacionadas à resistência bacteriana, como relatado em Megraud (2004), sendo responsáveis por mais de 90% dos casos de resistência (resultados não mostrados).

## **CONCLUSÃO**

Foi possível fazer uso de materiais retrospectivos de pesquisas anteriores para a execução do presente trabalho, o que evitou a necessidade de repetir o procedimento invasivo para coletar outras amostras gástricas. A PCR convencional como método para o diagnóstico de *H. pylori* apresentou, neste trabalho, algumas limitações. No entanto, após padronização, demonstrou-se como um método altamente sensível e útil na detecção de gene de virulência *cagA* na população estudada, relatado pela primeira vez na cidade de São Luís.

## **AGREDECIMENTOS**

Agradecemos à Prof. Dra. Flávia Nascimento e à médica Selma Maluf por terem cedido as amostras utilizadas neste estudo; ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM) da UFMA pelo suporte necessário para a realização do estudo; aos professores parceiros, em especial ao Prof. Dr. Luís Fernando e Prof. Dr. Denise Coutinho.

## REFERÊNCIAS

ALVES, N. C. F. et al. Prevalência e associação da infecção gástrica por *Helicobacter pylori* e do vírus Epstein-Barr em casos de gastrite na população do Amapá. 2017. 61f. **Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular**, Belém, 2017.

ASSUMPCÃO, M. B. et al., *Helicobacter pylori* in dental plaque and stomach of patients from Northern Brazil. **World J. Gastroenterol.** vol. 16, n. 24, p. 3033–3039, 2010

BACKERT, S.; CLYNE, M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 16, p. 19-25, 2011.

BAHÚ, M. G. S. Infecção por *Helicobacter pylori* em crianças com dor abdominal crônica e sua associação com a gastrite endoscópica nodular. 2010. 219 f. **Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2010.

BASTIEN, P.; PROCOP, G. W.; REISCHL, U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. **J. Clin. Microbiol., Washington**, v. 46, p. 1897–1900, June, 2008.

BAZIN, T. 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.

BRADEN, B. et al. New immunoassay in stool provides an accurate noninvasive diagnostic method for *Helicobacter pylori* screening in children. **Pediatrics**, v. 106, n. 1, p. 115-117, 2000.

BRITO, C. A. A. et al. Prevalence of *cagA* and *vacA* genes in isolates from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 817-821, 2003.

CÉSAR, A. C.G. et al. Comparison of histological and molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* in benign lesions and gastric adenocarcinoma. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 12-16, 2005.

COELHO, L. G. V. et al. IVth Brazilian Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 55, n. 2, p. 97-121, 2018.

CONTRERAS, M. et al. *Helicobacter pylori* Infection in rural and urban dyspeptic patients from Venezuela. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 4, p. 730-732, 2015.

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

CORREA, P.; Piazuolo, M. B. *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Adenocarcinoma. **US Gastroenterol Hepatol Rev.** 2011 Jun; 7(1):59-64

DE REUSE, H.; LABIGNE, A.; MENGIN-LECREULX, D.. The *Helicobacter pylori* ureC gene codes for a phosphoglucosamine mutase. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 11, p. 3488-3493, 1997.

EGHBALI, Z. et al. Detection of 23SrRNA mutations strongly related to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients in the north of Iran. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 9, n. 2, 2016.

ESPINOZA, M. G. C. et al. Detection of the glmM gene in *Helicobacter pylori* isolates with a novel primer by PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1650-1652, 2011.

HATAKEYAMA, M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. **Journal of gastroenterology**, v. 44, n. 4, p. 239-248, 2009.

HAYS, C. et al. Molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsies: Evaluation of the Amplidiag® H. pylori+ ClariR assay. **Helicobacter**, v. 24, n. 2, p. e12560, 2019.

KAZEMI, E. et al. Association between *Helicobacter pylori* hopQI genotypes and human gastric cancer risk. **Cellular and Molecular Biology**, v. 62, n. 1, p. 6-9, 2016.

KIKUCHI, S. et al. Association between infections with CagA-positive or-negative strains of *Helicobacter pylori* and risk for gastric cancer in young adults. **The American journal of gastroenterology**, v. 94, n. 12, p. 3455-3459, 1999.

LIMA, P. V.; RABENHORST, S. H. B; Genes Associados à Virulência de *Helicobacter pylori*. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.55, n. 4, p. 389-396. 2009.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

MEGRAUD F. H. *pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. **Gut**. 53: 1374-84, 2004.

MEGRAUD, F. LEHOURS, P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. **Clin Microbiol Rev**, 20: 280-322, 2007.

MEINE, G. C., et al. Relationship between cagA-positive *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer: a case control study in Porto Alegre, RS, Brazil. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 48, n. 1, p. 41-45, 2011.

MENEZES, G. L., et al. Aplicações da Biologia Molecular no Diagnóstico de *Helicobacter pylori*: Revisão da Literatura. **Saúde & Ciência em Ação**, v. 1, n. 1, p. 132-140, 2015.

MENONI, S. M. F., et al. PCR-based detection and genotyping of *Helicobacter pylori* in endoscopic biopsy samples from Brazilian patients. **Gastroenterology research and practice**, v. 201, 2013.

MICU, G., et al. *Helicobacter pylori*: pathological mechanism involved in gastric colonization. **Romanian Journal of Internal Medicine, Romania**, v. 47, n. 4, p. 341-346, 2009.

NEVOA, J. C., et al. Molecular technique for detection and identification of *Helicobacter pylori* in clinical specimens: a comparison with the classical diagnostic method. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, n. 1, p. 13-19, 2017.

OLIVEIRA, J. G. et al. Prevalence of infection with cagA-positive *Helicobacter pylori* strains among children and adolescents in southern Brazil. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 51, n. 3, p. 180-185, 2014.

PARENTE, H. M. A. Prevalencia do *Helicobacter pylori* e das cepas cagA em portadores de doença inflamatória intestinal atendidos no hospital universitário Walter Cantídio em Fortaleza-CE /Hilça Maria de Azevedo Parente. – 2016. 80f.

PEEK, J. R.; Richard, M. et al. Role of *Helicobacter pylori* cagA+ strains and specific host immune responses on the development of premalignant and malignant lesions in the gastric cardia. **International journal of cancer**, v. 82, n. 4, p. 520-524, 1999.

PEREIRA, W. N. et al. Association among *H. pylori* virulence markers dupA, cagA and vacA in Brazilian patients. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1, 2014.

PINTO, A. C. R. *Helicobacter pylori*: uma revisão. **São Paulo: Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas**, 2007.

RASMUSSEN, L. T. et al. 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. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 2, p. 180-187, 2012.

RESHETNYAK, V. I.; RESHETNYAK, T. M. Significance of dormant forms of *Helicobacter pylori* in ulcerogenesis. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 27, p. 4867, 2017.

RODRIGUES, J. A., et al. genes de virulência em *Helicobacter pylori*: componentes estruturais e métodos de detecção. **SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO**, v. 3, n. 2, p. 10-22, 2017.

ROTA, C. A. et al. Consensus and Variable Region PCR Analysis of *Helicobacter pylori* 3' Region of cagA Gene in Isolates from Individuals with or without Peptic Ulcer. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 2, p. 606-612, 2001.

TOMASINI, M. L. et al. Heterogeneity of cag genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 3, p. 976-980, 2003.

VADIVEL, A., et al. Clinical relevance of cagA and vacA and association with mucosal findings in *Helicobacter pylori*-infected individuals from Chennai, South India. **Indian journal of medical microbiology**, v. 36, n. 4, p. 582, 2018.

VARGAS, L. J., et al. Métodos diagnósticos para detecção da infecção pelo *H. pylori*: revisão sistemática. **Pará Research Medical Journal**, v. 3, n. 2, p. 0-0, 2019.

VINAGRE, I. D. F., et al. *Helicobacter pylori* infection in patients with different gastrointestinal diseases from northern Brazil. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 52, n. 4, p. 266-271, 2015.

VOLAND, P. et al. Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 2003.

WEEKS, D. L.; SACHS, G.. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. **Molecular microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1249-1259, 2001.