

Soroprevalência de anticorpos contra o antígeno CagA do *Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera gástrica na região Norte do Brasil

Seroprevalence of antibodies against the CagA antigen the *Helicobacter pylori* in patients with gastric ulcer in the North region of Brazil

Luisa Caricio Martins¹, Tereza Cristina de Oliveira Corvelo¹, Henrique Takeshi Oti² e Katarine Antônia dos Santos Barile¹

Resumo O *Helicobacter pylori* é um agente patogênico largamente distribuído no mundo, estando envolvido no desenvolvimento de várias doenças gastrointestinais. Atualmente a infecção pela cepa virulenta (CagA⁺) do *H. pylori* é considerado um dos principais fatores etiológicos para o desenvolvimento de ulcerações gástricas. Baseado nessa informação, investigamos a soroprevalência das cepas virulentas entre os pacientes com úlcera gástrica da nossa região, utilizando testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o *H. pylori* e a proteína CagA. Sendo observado que 82% (45/55) dos pacientes estavam infectados pela cepa virulenta, entre esses 89% (40/45) apresentaram grau de inflamação aumentado na mucosa gástrica, com denso infiltrado de leucócitos no tecido, o que provavelmente favoreceu a formação das ulcerações gástricas.

Palavras-chaves: *Helicobacter pylori*. Úlcera gástrica. Proteína CagA. Análise sorológica.

Abstract *Helicobacter pylori* is a pathogenic agent with a worldwide distribution and is involved in the development of many gastrointestinal diseases. Nowadays infection with the virulent strain CagA⁺ of *H. pylori* is considered one of the main etiological factors in the development of gastric ulcer. Based on this information, we investigated the seroprevalence of virulent strains among patients with gastric ulcer from one region, using serologic tests to detect antibodies against *H. pylori* and CagA protein. Infection by the virulent strain was found in 82% (40/55) of the patients, and among these, 89% (40/45) presented an increased degree of inflammation in the gastric mucosa, with a dense infiltration of leukocytes in the tissue, which probably favored the formation of gastric ulcer. We concluded that the presence of the virulent strain is related to the development of an increased inflammation in the gastric mucosa.

Key-words: *Helicobacter pylori*. Gastric ulcer. CagA protein. Serological analyses.

A úlcera gástrica é geralmente única, predomina na pequena curvatura do antro, próximo a incisura angular, em região adjacente à mucosa secretora de ácido. Está relacionada à deficiência dos fatores defensivos da mucosa, não sendo capazes de proteger o epitélio contra os efeitos corrosivos do ácido e pepsina⁹. Parece que, o maior responsável pela diminuição da resistência da mucosa ao ataque do ácido é a inflamação crônica⁶. Postula-se então, que o *H. pylori* associado à gastrite, seriam os agentes responsáveis pela diminuição da defesa da mucosa^{6,9}. A infecção pelo *H. pylori* leva a um processo inflamatório agudo ou crônico da mucosa gástrica^{3,6,9}. Dessa forma, as úlceras gástricas ocorrem

na presença de gastrite crônica superficial ou atrófica, desenvolvendo-se no limite do processo inflamatório^{3,9}.

O *H. pylori* produz várias proteínas que parecem mediar ou facilitar seus efeitos deletérios sobre a mucosa gástrica. Atualmente, tem sido bastante ressaltada a associação da citotoxina CagA com aumento da inflamação gástrica e conseqüentemente, com quadros clínicos mais graves. As cepas virulentas (CagA⁺) induzem forte processo inflamatório, com denso infiltrado de neutrófilos, que causam graves danos à mucosa gástrica^{10,13}.

A literatura sugere que a soroprevalência para o antígeno CagA do *H. pylori* em adultos com úlcera

1. Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Pará, Belém, PA. 2. Departamento de Endoscopia do Hospital Ofir Loliola, Belém, PA.

Orgão financiador: Capes e FUNTEC.

Endereço para correspondência: Dr^a Luisa Caricio Martins. Trav. Mauriti 3269/402B, Marco, 66095-360 Belém, PA.

Tel: 55 91 211-1568, ramal 28

e-mail: lu-caricio@bol.com.br ou abdala@amazon.com.br

Recebido para publicação em 21/9/2001.

gástrica está aumentada, existindo uma associação entre a presença do *CagA* e o risco aumentado de desenvolver úlcera péptica e câncer gástrico^{6,10}.

Estudos sorológicos têm demonstrado que pacientes com úlcera péptica e tumor gástrico são mais freqüentemente infectados por cepas virulentas^{10,13}, cerca de 60% a 100%, sugerindo que o gene *CagA*

pode ser considerado um marcador genotípico e fenotípico para linhagens virulentas^{5,7,18}.

Com base no descrito acima, esse estudo pretende contribuir para esclarecer a associação entre as cepas Tipo I e o desenvolvimento da úlcera gástrica, mediante a análise da resposta imunológica humoral e da prevalência do gene *CagA* em pacientes com úlcera gástrica.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo compreende um total de 55 pacientes (41 homens, 14 mulheres, faixa etária de 28-80, média aritmética = 53,59 e desvio padrão = 12,63) com úlcera gástrica, segundo laudo endoscópico realizado no Serviço de Endoscopia do Hospital Ofir Loiola, localizado na região metropolitana de Belém, Pará. Foram coletadas amostras pareadas de sangue e biópsia gástrica, sendo selecionados preferencialmente os pacientes que nunca haviam realizado tratamento para erradicação do *H. pylori*. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, processo nº 009/00.

A todos os indivíduos foi empregado um questionário para a obtenção de dados epidemiológicos, e solicitado, através de um termo de consentimento livre e esclarecido, a autorização para obtenção das amostras e realização da pesquisa.

Detecção sorológica de anticorpos da classe IgG anti-*H. pylori* específicos. Amostras de soro foram testadas para anticorpos contra o *H. pylori*, através de um ensaio de Hemaglutinação indireta, de acordo com as instruções de uso recomendadas pelo fabricante (Viva diagnostika, Hürth, Alemanha).

As amostras que obtiveram resultados negativos ou inconclusivos na técnica citada acima, foram testadas para anticorpos sistêmicos da classe IgG *H. pylori* específicos através de um ensaio imunoenzimático (ELISA), usando o *kit Immunocard H. pylori* (Meridian Diagnostics, Inc, USA).

Foram analisadas 55 amostras pareadas de biópsia gástrica e sangue, além das respectivas informações epidemiológicas fornecidas pelos pacientes através do questionário informativo.

Em relação ao sexo, observamos um predomínio do sexo masculino, 74% (41/55), sendo que 47% (26/41) tinham idade acima de cinquenta anos. O sexo feminino representa 26% (14/55) da amostra, onde 13% (7/14) tinham idade acima de cinquenta anos.

Os pacientes eram portadores de úlcera gástrica, baseado no laudo endoscópico, sendo que 76% (42/55) apresentavam ulceração na região antral e 24% (13/55) apresentavam ulceração na região do corpo gástrico. Em relação aos laudos histopatológicos obtivemos que 96% (53/55) dos pacientes apresentavam gastrite crônica e 4% (2/55) com

Detecção de anticorpos IgG Anti-*Cag A*. Foi determinada por um ensaio imunoenzimático (ELISA), baseado nos recombinantes *H. pylori CagA* (Helicobacter p 120 EIA, VIVA Diagnostica, Hürth, Alemanha).

Biópsias gástricas. As biópsias gástricas foram coletadas durante a realização do exame de endoscopia digestiva alta, sendo retiradas das áreas de borda de lesão e perilesão.

Para análise histopatológica das biópsias gástricas foi utilizada a coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Nos parâmetros histopatológicos foi utilizada a classificação de Sidney. A presença de inflamação crônica (infiltrados celulares mononuclear e neutrofílico no tecido) foram graduada numa escala de 0 a 3, representando, ausente (0), leve (1), moderado (2), acentuado (3).

Para a detecção do *H. pylori* foi utilizado a coloração Gram modificado e microscopia óptica convencional, identificando a bactéria mediante suas características morfológicas, forma curva e espiralada, e coloração azul intensa.

Análise estatística. Foram empregados testes estatísticos adequados para detectar ou não diferenças entre os grupos objeto de estudo. O programa de computação utilizado foi o Bioestat 2.0², com o emprego dos testes do qui-quadrado (χ^2), teste exato de Fisher, entre outros. A significância estatística foi aceita ao nível 95%.

RESULTADOS

carcinoma avançado ulcerado, com grau de inflamação variando de leve, 22% (12/55), moderado 47% (26/55), acentuado, 31% (17/55).

Diferenças estatisticamente não significativas foram observadas quando compara-se o padrão alimentar, o hábito de vida e o consumo de medicamentos, principalmente AINES e AAS (Antiinflamatório não esteróides e ácido acetil salicílico), em relação ao grau de inflamação no tecido gástrico dos pacientes.

A observação do padrão dietético mostrou que 80% (44/55) dos pacientes faziam uso excessivo de sal, com ingestão elevada de gordura em sua alimentação diária. Adicionalmente, quando comparamos o grau de inflamação do tecido gástrico ao número de refeições que os pacientes fazem ao dia, observamos uma associação estatisticamente significativa ($G = 9.4098$,

p= 0.0281), onde 60% (33/55) dos pacientes se alimentavam duas ou menos vezes ao dia, destes 36% (20/55) apresentavam grau de inflamação moderado, 24% (10/55) com grau acentuado.

Em relação às condições de habitação, a correlação entre a prevalência da infecção pelo *H. pylori* e a ausência de infra-estrutura adequada de saneamento, também apresentou-se estatisticamente não significante.

O *H. pylori* foi detectado sorologicamente em 93% (51/55) dos pacientes, sendo que 82% (45/55) foram positivos para a cepa virulenta (Tabela 1). Quanto à

Tabela 1- Relação entre a infecção pelo *H. pylori* e a presença da cepa virulenta CagA nos pacientes com úlcera gástrica.

Infecção pelo <i>H. pylori</i>	Cepa virulenta CagA		Total
	positivo	negativo	
Positivo	45	6	51
Negativo	0	4	4
Total	45	10	55

Fisher, p= 0,0006

associação da infecção pelo microorganismo e o grau de inflamação do tecido gástrico, verificou-se uma correlação estatisticamente significativa entre a presença da infecção pela cepa virulenta do *H. pylori* e o grau de inflamação moderado à acentuado (Tabela 2). Também

Tabela 2 - Distribuição dos diferentes níveis de inflamação encontrados no tecido gástrico dos pacientes associado ao diagnóstico sorológico para detecção da infecção pelo *H. pylori* e da cepa CagA.

Sorologia <i>H. pylori</i>	Grau de inflamação		Total
	leve	moderado à acentuado	
Hp ⁺ CagA ⁺	5	40	45
Hp ⁺ CagA ⁻	4	2	6
Hp ⁻ CagA ⁻	3	1	4
Total	12	43	55

G= 14.1739 p= 0.0023

observamos uma associação estatisticamente significativa entre a presença da cepa virulenta e o relato de recidivas das ulcerações gástricas (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição do resultado sorológico para detecção da infecção por *H. pylori* e da cepa CagA associado aos relatos dos pacientes de ocorrências anteriores de ulcerações gástricas.

Recidivas	Sorologia <i>Helicobacter pylori</i>			Total
	Hp ⁺ CagA ⁺	Hp ⁺ CagA ⁻	Hp ⁻ CagA ⁻	
Ausente	10	4	3	17
Presente	35	2	1	38
Total	45	6	4	55

G= 8.2104 p= 0.0264

Quando comparamos os resultados obtidos na pesquisa do *H. pylori* pelo método sorológico e histológico, observamos, pelo método sorológico, uma prevalência de 93% (51/55) dos pacientes infectados pelo *H. pylori*, diferindo significativamente dos 76% (38/55) observado pelo método histológico (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação entre os resultados obtidos no diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* através dos métodos sorológico e histológico.

Infecção por <i>H. pylori</i>	Método de diagnóstico		Total
	sorológico	(Gram modificado)	
Positivo	51	38	89
Negativo	4	12	16
Total	55	50	105

X²= 5,674 p=0,0349

DISCUSSÃO

Desde que o *H. pylori* foi cultivado em 1983, tem havido grande interesse em seu estudo, objetivando descobrir sua verdadeira função no desenvolvimento das doenças gastrointestinais, bem como na descoberta dos melhores meios de diagnóstico⁸.

O diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* foi obtido mediante a utilização de métodos sorológicos e histológico (Gram modificado), nos pacientes portadores de úlcera gástrica. De acordo com os resultados deste estudo, a taxa de infecção pelo *H. pylori* obtida pelo método sorológico foi de 93%, diferindo significativamente do valor de 76% detectado no exame histopatológico pela coloração de Gram modificado (Tabela 4). Este valor de positividade observado pelo método histopatológico está dentro dos valores esperados para a população de Belém^{1,15}.

Mendonça *et al*¹¹ obtiveram resultados similares na comparação entre esses dois métodos, onde a sensibilidade do método sorológico se mostrou superior a do teste histológico pela coloração do Gram modificado. Alguns estudos têm demonstrado que o padrão de colonização do *H. pylori* na mucosa gástrica dar-se de forma irregular, onde várias vezes pode ocorrer a retirada de biópsias gástricas de regiões não colonizadas, resultando em falsos negativos pelo método histológico^{11,12,17}. O mesmo pode ocorrer em pacientes com metaplasia intestinal, onde é incomum a presença da bactéria, pois as características deste tipo de epitélio não favorece o crescimento da mesma^{16,17}.

Neste estudo, 70% dos pacientes apresentavam baixo nível sócio econômico e saneamento básico inadequado, o que representa um fator crucial na exposição ao *H. pylori*. Outros trabalhos constataram uma alta prevalência da infecção pelo *H. pylori* entre os indivíduos que vivem em condições inadequadas de higiene e saneamento^{7,8}.

Em relação aos sexos, não temos conhecimento de nenhum trabalho que mostre uma associação entre os sexos e a infecção pelo *H. pylori*. Entretanto alguns estudos^{6,12} têm demonstrado a taxa mais elevada de homens entre os portadores de úlcera péptica. Esse fato pode ser explicado pela participação de outros fatores ambientais como o estilo de vida, onde normalmente o sexo masculino se encontra mais exposto ao estresse e ao consumo de álcool e fumo.

De acordo com os resultados obtidos, observamos que 80% dos pacientes faziam uso freqüente de álcool, fumo, medicamentos e possuíam uma dieta rica em sal e gorduras. Rähä *et al*¹⁵ descreveram uma alta freqüência de pacientes com úlcera péptica que faziam uso diário de álcool, fumo, além de um padrão alimentar rico em sal e gordura e pobre em fibras e antioxidantes.

No presente estudo, observamos que 82% dos pacientes com úlcera gástrica eram sororreativos para a cepa tipo I (Tabela 1). Lin *et al*¹⁰ utilizando testes moleculares, obtiveram resultados similares, onde 82,5% dos subtipos da *H. pylori* isolados de pacientes com úlcera péptica da população de Taiwan expressavam o gene *CagA*. Outros estudos sorológicos vêm descrevendo uma alta prevalência da cepa virulenta entre os pacientes com úlcera péptica e câncer gástrico^{10,13}.

Histologicamente, 79% (43/55) da amostra apresentou grau de inflamação de moderado à acentuado, caracterizado pela presença de denso infiltrado celular mononuclear e neutrofílico na mucosa gástrica, neste grupo 93% (40/43) dos pacientes estavam infectados pela cepa virulenta (Tabela 2).

Censini *et al*⁴ descreveram que as cepas virulentas (*CagA*⁺) estimulam a produção de substâncias quimiotáticas, como IL-8 e IL-6, que atraem e ativam neutrófilos e outras células inflamatórias. Essa resposta inflamatória aumentada e intermitente, causa agressão à mucosa gástrica, o que favoreceria ao aparecimento das úlceras gástricas.

Outra associação observada no presente estudo, foi a relação entre a presença da cepa virulenta e as recidivas das úlceras gástricas (Tabela 3), onde 64% dos pacientes com úlcera gástrica e portadores da cepa virulenta relataram ocorrências anteriores de úlcera gástrica. Esses pacientes foram somente submetidos ao tratamento das úlceras gástricas, não realizaram tratamento de erradicação do *H. pylori*. Esse fato pode explicar as recidivas das úlceras gástricas, pois estes indivíduos tinham uma infecção persistente pela cepa virulenta. Alguns trabalhos têm demonstrado uma diminuição das recidivas ulcerosas quando o paciente realiza tratamento de erradicação do *H. pylori*¹². Reforçando a necessidade de uma melhor avaliação sobre o emprego de um tratamento de erradicação deste microorganismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguiar DCF. Correlação da expressividade dos antígenos ABH e Lewis com a gastrite crônica e alterações pré-neoplásicas da mucosa gástrica. Tese de Mestrado. Belém, Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goldi, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2001.
2. Ayres M, Ayres MJ, Ayres DL, Santos AS. Bioestat 2.0 - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá Ministério de Ciências e Tecnologia- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2000.
3. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *Journal of Infectious Diseases* 161: 626-633, 1990.
4. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree EJ, Ghiara P, Bodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. *CagA*, a pathogenicity isolate of *Helicobacter pylori*, encodes type I- specific and disease-associated virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Science* 93:14648-14653, 1996.
5. Censini S, Stein M, Covacci A. Cellular responses induced after contact with *Helicobacter pylori*. *Current opinion in Microbiology* 4: 41-48, 2001.
6. Chehter L. Úlcera Péptica Gastroduodenal. Sinopse de Gastroenterologia- Universidade Federal de São Paulo 1:14-18, 1999.
7. Covacci A, Telford LJ, Giudice DG, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284: 1328-1333, 1999.
8. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews* 10: 720-741, 1997.
9. Friedman LS, Peterson WL. Úlcera Péptica e distúrbios relacionados. In: Harrison TR. *Medicina Interna*. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, p.1699-1721, 1998.
10. Lin CW, Wu SC, Lee SC, Cheng KS. Genetic analysis and clinical evaluation of vacuolating cytotoxin gene A and cytotoxin-associated gene A in Taiwanese *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer patients. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 32: 51-57, 2000.
11. Mendonça CA, Mendes VVC, Amorim VL. *H. pylori*: Estudo comparativo entre os métodos diagnósticos histopatológico, Gram e IgG. *Gastroenterologia Endoscópica Digestiva* 16: 124-127, 1997.
12. National Institutes of Health Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *The Journal of the American Medical Association* 272: 65-69, 1994.
13. Queiroz MMD, Mendes NE, Carvalho STA, Rocha AG, Oliveira RMA; Soares FT, Santos A, Cabral ADMM, Noqueira FMMA. Factors associated with *Helicobacter pylori* infection by a *CagA*-positive strain in children. *The Journal of Infectious Diseases*, 181: 626-630, 2000.
14. Rähä I, Kempainen H, Kaprio J, Kosken VUO, Sourander L. Lifestyle, stress, and genes in peptic ulcer disease. *Archives International Medical* 158: 698-704, 1998.
15. Sagica FES. Perfil imunohistoquímico da mucosa gástrica no desenvolvimento do câncer gástrico. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goldi, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Belém, 2000.
16. Shimoyama T, Crabtree JE. Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. *An International Journal of Gastroenterology and Hepatology- Gut*, 43: S2-S5, 1998.
17. Warren JR. Gastric pathology associated with *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics* 29: 705-715, 2000.
18. Williams PM, Pounder MA. *Helicobacter pylori*: From the benign to the malignant. *The American Journal of Gastroenterology* 94 (supl II): 115-165, 1999.