

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS PASSO FUNDO

CURSO DE MEDICINA

PIETRA CALEGARI MENDES

**AVALIAÇÃO DE GENÓTIPO DE VIRULÊNCIA DE *Helicobacter pylori* EM
AMOSTRAS DE CAVIDADE ORAL**

PASSO FUNDO, RS

2024

PIETRA CALEGARI MENDES

**AVALIAÇÃO DE GENÓTIPO DE VIRULÊNCIA DE *Helicobacter pylori* EM
AMOSTRAS DE CAVIDADE ORAL**

Trabalho de Curso de Graduação apresentado como
requisito parcial para a obtenção do título de Médica
pela Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus
Passo Fundo – RS.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Olszanski Acrani

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Jossimara Polettini

PASSO FUNDO, RS

2024

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Mendes, Pietra Calegari

AVALIAÇÃO DE GENÓTIPO DE VIRULÊNCIA DE *Helicobacter pylori* EM AMOSTRAS DE CAVIDADE ORAL / Pietra Calegari Mendes. -- 2024.

48 f.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Olszanski Acrani

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Jossimara Polettini

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina, Passo Fundo, RS, 2024.

1. *H. pylori*. 2. Virulência. 3. PCR. I. Acrani,
Gustavo Olszanski, orient. II. Polettini, Jossimara,
co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul.
IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

PIETRA CALEGARI MENDES

**AVALIAÇÃO DE GENÓTIPO DE VIRULÊNCIA DE *Helicobacter pylori* EM
AMOSTRAS DE CAVIDADE ORAL**

Trabalho de Curso de Graduação apresentado como
requisito parcial para a obtenção do título de Médica
pela Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus
Passo Fundo – RS.

Este Trabalho de Curso foi defendido e aprovado pela banca em:

18/06/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gustavo Olszanski Acrani – UFFS
Orientador

Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti
Avaliador

Prof. Dr.^a Lisia Hoppe
Avaliadora

APRESENTAÇÃO

Trata-se de um Trabalho de Curso (TC) de Graduação, intitulado “AVALIAÇÃO DE GENÓTIPO DE VIRULÊNCIA DE *Helicobacter pylori* EM AMOSTRAS DE CAVIDADE ORAL”, elaborado pela acadêmica Pietra Calegari Mendes, como requisito parcial para a obtenção do título de Médica pela Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), campus Passo Fundo – RS, sob a orientação do Prof. Dr. Gustavo Olszanski Acrani e coorientação da Profª. Drª. Jossimara Poletini. Está em conformidade com as normas do Manual de Trabalhos Acadêmicos da UFFS e com o Regulamento de TC do Curso, sendo composto pelo projeto de pesquisa, relatório de atividades e artigo científico, tendo sido desenvolvido ao longo de três semestres do curso de Medicina da UFFS. O primeiro capítulo consiste no projeto de pesquisa, desenvolvido na disciplina de Trabalho de Curso I, no primeiro semestre de 2023. O segundo capítulo consiste no relatório de pesquisa, compreendendo os detalhes ocorridos desde a conclusão do projeto de pesquisa até a finalização da coleta de dados, no segundo semestre de 2023, tendo sido desenvolvido na disciplina de Trabalho de Curso II. O terceiro capítulo, elaborado na disciplina de Trabalho de Curso III, no primeiro semestre de 2024, traz o artigo científico, produzido a partir da aplicação prática do projeto de pesquisa, por meio da coleta e análise estatística dos dados encontrados.

RESUMO

O *Helicobacter pylori* é um patógeno de alta prevalência na população brasileira e mundial. Conhecida por sua colonização do epitélio gástrico, esta bactéria também é encontrada na cavidade oral, apesar de sua presença ainda não ser esclarecida. As manifestações nos pacientes infectados são diversas, variando desde a apresentação assintomática de gastrite crônica, em sua maioria, até quadros sintomáticos de úlcera péptica, câncer gástrico e linfoma de tecido linfóide associado à mucosa gástrica. Esta diferença de apresentação demonstra que a evolução clínica da colonização por *H. pylori* depende de variáveis, como fatores comportamentais do indivíduo infectado e expressão genética, tanto do hospedeiro, quanto da bactéria colonizadora, como os diversos genes de virulência que influenciam na patogenicidade da bactéria. Dentre eles, o *cagA* é o mais prevalente, e estima-se que esteja presente em 60% dos pacientes infectados. Este gene é responsável pela produção da citotoxina CagA, que tem a capacidade de causar alterações estruturais na célula hospedeira e regulação transcricional positiva dos genes implicados na carcinogênese do epitélio gástrico. Sob essa perspectiva, o presente estudo objetiva identificar o gene *cagA* em amostras de esfregaço de mucosa oral positivas para *H. pylori*. Trata-se de um estudo quantitativo, transversal, descritivo e analítico realizado com pacientes em atendimento nos Ambulatórios da UFFS, recrutados no período de fevereiro de 2021 a agosto de 2023. Após aceite e assinatura do TCLE, os indivíduos foram submetidos à coleta de esfregaço de mucosa oral com uso de escova de coleta estéril e responderam a um questionário padronizado para o estudo. As amostras tiveram seu DNA extraído e a detecção da presença de DNA de *H. pylori* foi verificada pela técnica de Nested PCR. A partir das amostras positivas, realizou-se a pesquisa do gene de interesse, utilizando-se a técnica de PCR convencional. Os dados foram duplamente digitados no software EpiData versão 3.1 (distribuição livre) e as análises estatísticas de frequência absolutas, relativa e prevalência foram realizadas no software PSPP (distribuição livre), assim como as relações das variáveis através do teste de Fisher, adotando-se nível de significância de 5%. Com o presente estudo, encontrou-se uma frequência de 13,1% na ocorrência deste gene nas cepas de *H. pylori* presentes na cavidade oral destes pacientes.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*; *cagA*; cavidade oral.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a highly prevalent pathogen in the Brazilian and global population. Known for its colonization of the gastric epithelium, this bacterium is also found in the oral cavity, although its presence is not yet clear. The manifestations in infected patients are diverse, ranging from the asymptomatic presentation of chronic gastritis, in most cases, to symptomatic conditions of peptic ulcer, gastric cancer and lymphoma of lymphoid tissue associated with the gastric mucosa. This difference in presentation demonstrates that the clinical evolution of colonization by *H. pylori* depends on variables, such as behavioral factors of the infected individual and genetic expression, both of the host and of the colonizing bacteria, such as the various virulence genes that influence the pathogenicity of the bacteria. Among those, *cagA* is the most prevalent, and is estimated to be present in 60% of infected patients. This gene is responsible for the production of the cytotoxin CagA, which has the capacity to cause structural changes in the host cell and positive transcriptional regulation of genes involved in carcinogenesis of the gastric epithelium. From this perspective, the present study objectives to identify the *cagA* gene in oral mucosal smear samples. This is a quantitative, cross-sectional, descriptive and analytical study carried out with patients receiving care at the UFFS Outpatient Clinics, recruited from February 2021 to August 2023. After accepting and signing the informed consent form, the individuals underwent data collection and oral mucosa swab using a sterile collection brush and answered a standardized questionnaire for the study. The samples had their DNA extracted and the detection of *H. pylori* DNA presence was verified by using the Nested PCR technique. Some of the positive samples were searched for the gene of interest, using the conventional PCR technique. The data were double digitized in the EpiData software version 3.1 (free distribution) and the statistical analyzes of absolute and relative frequencies and prevalence were carried out in the PSPP software (free distribution), as well as the relationships between variations using Fisher's, adopting the level of 5% significance. With the present study, a frequency of 13.1% in the occurrence of the gene was found in strains of *H. pylori* present in the oral cavity of these patients.

Keywords: *Helicobacter pylori*; *cagA*; oral cavity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 DESENVOLVIMENTO	10
2.1 PROJETO DE PESQUISA	10
2.1.1 Tema	10
2.1.2 Problemas	10
2.1.3. Hipóteses	10
2.1.4. Objetivos	11
2.1.5. Justificativa	11
2.1.6 Referencial teórico	12
2.1.7 Metodologia	17
2.1.7.1 Tipo de estudo	17
2.1.7.2 Local e período de realização do estudo	17
2.1.7.3 População e amostragem	17
2.1.7.4 Variáveis e coleta de dados	18
2.1.7.5 Processamento, controle de qualidade e análise dos dados	20
2.1.7.6 Aspectos éticos	20
2.1.8 Recursos	20
2.1.9 Cronograma	21
REFERÊNCIAS	21
ANEXO A - Questionário do estudo	25
ANEXO B - Parecer de aprovação do CEP	26
2.2 RELATÓRIO DE PESQUISA	30
3. ARTIGO	32
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47

1 INTRODUÇÃO

Helicobacter pylori é um dos patógenos mais comumente encontrados no ser humano. À medida que as condições de vida têm melhorado, a incidência da colonização pela bactéria tem decaído no mundo. No entanto, sua prevalência mundial ainda é estimada em mais de 50% e no Brasil este valor ultrapassa os 70% (HOOI et al., 2017). Apesar do modo de transmissão da bactéria ainda ser pouco estabelecido, estudos sugerem que as principais formas são as vias oral-oral (em países desenvolvidos) e fecal-oral (em países em desenvolvimento) (SIAVOSHI et al., 2005).

Desde a sua descoberta, em 1982, sabe-se que a bactéria é colonizadora do estômago e duodeno, ambiente onde é capaz de desencadear um processo inflamatório na maioria de seus hospedeiros, podendo este ser assintomático ou não. Além da gastrite crônica ativa, o *H. pylori* também está intimamente relacionada com outros processos patológicos, como a úlcera péptica, o carcinoma gástrico e o linfoma de tecido linfóide associado à mucosa gástrica. Esta forte relação com o desenvolvimento de neoplasias fez com que a *H. pylori* fosse classificada pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer como agente carcinogênico do grupo I, sendo hoje considerada o principal fator de risco para o câncer gástrico (COELHO et al., 2021).

O tratamento de primeira linha para o *H. pylori* consiste em uma terapia tripla a partir de um inibidor de bomba de prótons (IBP) e dois antibióticos — claritromicina e amoxicilina. No entanto, devido aos altos níveis de resistência apresentados à claritromicina (>15%), a terapia composta tem sido aplicada, o que consiste nos medicamentos do esquema triplo associados ao metronidazol ou tinidazol (COELHO et al., 2018). Dessa forma, tenta-se reduzir a taxa de falha na erradicação da bactéria, principalmente em países que apresentam estas taxas elevadas, como o Brasil (16,9%) (SANCHES et al., 2016).

Além da colonização gástrica, a *H. pylori* tem sido encontrado também em outros locais, como a cavidade oral humana. Diversos estudos têm registrado a presença da bactéria em amostras de saliva (WANG et al., 2014), placa gengival (SOUTO; COLOMBO, 2008) e lesões orais (IRANI; ESFAHANI; ZEREHPOUSH, 2013). No entanto, os estudos a esse respeito ainda são controversos e o significado clínico da presença da bactéria neste sítio ainda não é bem esclarecido.

Ainda que seja um agente importante de doenças gástricas, nem todos os infectados pela bactéria desenvolvem um quadro clínico. As pesquisas a respeito da patogênese do *H. pylori* indicam que a evolução clínica de sua colonização depende de fatores genéticos e

comportamentais do hospedeiro e também da expressão de genes de virulência da cepa bacteriana (AMIEVA; EL-OMAR, 2008).

Atualmente, são descritos diversos mecanismos de patogenicidade desta bactéria. Dentre eles, a produção da enzima urease, que permite a sobrevivência no meio ácido, a mobilidade concedida pelos flagelos, as adesinas que permitem a aderência da célula bacteriana ao epitélio gástrico e também citotoxinas, relacionadas com o desenvolvimento de úlcera péptica, gastrite e câncer gástrico (PROENÇA-MODENA; ACRANI; BROCCHI, 2009).

Dentre as citotoxinas conhecidas, a CagA, produzida pelo gene *cagA*, é amplamente estudada devido a alta prevalência deste gene — aproximadamente 60% da população ocidental infectada e mais de 90% nos países do oriente (NEJATI *et al.*, 2018) — e também em razão da sua importância na patogenicidade da bactéria. Esta toxina está localizada ao final na região genômica denominada ilha de patogenicidade *cag*, onde aproximadamente 20 genes codificam uma estrutura denominada sistema de secreção tipo IV. Este é responsável por mediar a translocação da CagA para o citoplasma da célula hospedeira, onde a citotoxina é capaz de causar alterações morfológicas, de proliferação e apoptose que aumentam o risco de carcinogênese (AMIEVA; EL-OMAR, 2008).

Apesar do gene *cagA* já ter sido identificado em amostras da cavidade oral humana (MENDOZA-CANTÚ *et al.*, 2017; SEKAR *et al.*, 2022), ainda são poucos os estudos que abordam esta avaliação, que pode contribuir com o entendimento do papel da colonização de *H. pylori* na cavidade oral e sua possível relação com as manifestações clínicas gastrointestinais e reincidência da infecção no ser humano. Ademais, a prevalência deste gene produtor de citotoxina varia segundo a região estudada, o que torna relevante a busca deste em diversas populações. Desta forma, este estudo objetiva avaliar a presença do gene *cagA* em cepas de *Helicobacter pylori* a partir de amostras da cavidade oral de pacientes, assim como a sua relação com variáveis sociodemográficas e de saúde.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 PROJETO DE PESQUISA

2.1.1 Tema

Prevalência do gene de virulência *cagA* de *Helicobacter pylori* em amostras da cavidade oral humana.

2.1.2 Problemas

Qual a prevalência do gene *cagA* em amostras de cavidade oral de pacientes positivas para *Helicobacter pylori*, em atendimento no Ambulatório da Universidade Federal da Fronteira Sul?

Quais as principais características sociodemográficas e de saúde dos pacientes incluídos na amostra?

Quais as características sociodemográficas e de saúde estão relacionadas aos pacientes que apresentam bactérias portadoras do gene *cagA*?

2.1.3. Hipóteses

A prevalência do gene *cagA* nas amostras de *H. pylori* da cavidade oral será de 60%.

As principais características sociodemográficas dos pacientes serão mulheres com mais de 40 anos, escolaridade até o ensino fundamental, residentes de zona urbana, que vivem com mais de 4 pessoas no domicílio, tabagistas e não etilistas. A maioria não terá realizado endoscopia prévia. As manifestações clínicas mais prevalentes serão a dispepsia e a pirose. Em relação aos medicamentos, a maioria terá feito uso recente de AINE (anti-inflamatório não esteroide) mas não terá feito uso prévio de IBP (inibidores da bomba de prótons). Haverá maior prevalência do acesso à água encanada. A intolerância ao café será mais prevalente em relação à intolerância à pimenta ou ao refrigerante.

A presença da bactéria com a mutação genética será mais prevalente no sexo feminino, na faixa etária de 40-50 anos, escolaridade até o ensino fundamental, residentes de zona urbana, que vivem com mais de 4 pessoas no domicílio, tabagistas e não etilistas. Este desfecho também estará relacionado a não realização da endoscopia prévia e à prevalência da

pirose. Em relação aos medicamentos, a presença do gene *cagA* estará relacionada aos pacientes que não fizeram uso de AINE ou IBP previamente. Não haverá relação do genótipo *cagA* com o acesso à água encanada ou com a intolerância ao café, à pimenta ou ao refrigerante.

2.1.4. Objetivos

2.1.4.1. Objetivo geral

Identificar a prevalência do gene de virulência *cagA* de *Helicobacter pylori* em amostras da cavidade oral de pacientes em atendimento no Ambulatório da Universidade Federal da Fronteira Sul.

2.1.4.2. Objetivos específicos

Descrever características sociodemográficas e de saúde dos pacientes da amostra;

Verificar quais características sociodemográficas e de saúde dos pacientes estão relacionadas à presença do gene *cagA* na bactéria.

2.1.5. Justificativa

Estima-se que mais de 70% da população brasileira esteja colonizada por *Helicobacter pylori* no trato gastrointestinal. Esta bactéria é conhecida por ser causadora da gastrite crônica não erosiva, mas sua infecção também pode evoluir para complicações como a úlcera péptica, carcinoma gástrico e linfoma de tecido linfóide associado à mucosa gástrica (MALT).

Apesar de conhecidos os seus efeitos no estômago e no duodeno, o *H. pylori* também é encontrada na cavidade oral humana, mas esta presença ainda não foi totalmente esclarecida.

As diferentes manifestações clínicas dos pacientes portadores de *H. pylori* demonstram a influência de variáveis, como fatores comportamentais do indivíduo infectado e expressão genética, tanto do hospedeiro, quanto da bactéria colonizadora, na evolução da infecção pela bactéria. Nesse sentido, são estudados os genes de virulência que influenciam na patogenicidade da *Helicobacter pylori*. Dentre eles, o *cagA* é o mais prevalente, e é responsável pela produção da citotoxina CagA, que tem a capacidade de causar alterações estruturais, de proliferação e apoptose na célula hospedeira. Todavia, a presença deste gene

varia a depender da região geográfica estudada, além de a presença dos genes de virulência em cepas da cavidade oral humana ainda ser pouco estabelecida. Desta forma, é relevante o estudo da prevalência do gene *cagA* na região de Passo Fundo, a fim de compreender o papel deste sítio como reservatório da bactéria.

2.1.6 Referencial teórico

Helicobacter pylori é uma bactéria gram-negativa espiralada, flagelada e microaerófila, conhecida como um importante patógeno colonizador da mucosa gástrica humana. Neste sítio, esta pode ser encontrada nas regiões do corpo e do fundo estomacal, mas é principalmente no antro que sua colonização ocorre em maior densidade (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003). Há quatro décadas, a bactéria tem sido estudada como a maior causa da gastrite crônica não erosiva, além de ser o agente do câncer gástrico, da úlcera péptica e do linfoma de tecido linfóide associado à mucosa gástrica (COELHO et al., 2021; MITCHELL; KATELARIS, 2016). O *H. pylori* é classificado, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), como um agente carcinogênico de classe 1, o que significa que existem evidências suficientes para afirmar a capacidade deste patógeno de provocar o desenvolvimento de um câncer.

Apesar de já ter sido isolado em diversas amostras, como água (AL-SULAMI et al., 2010; AZIZ et al., 2013), fezes (THOMAS et al., 1992; KABIR, 2001) e saliva (FERGUSON et al., 1993; LI et al., 1994), o modo de transmissão do *H. pylori* ainda é controverso. Os estudos sugerem que a principal forma de transmissão seja intrafamiliar, de forma oral-oral, especialmente em razão da presença da bactéria na cavidade oral humana (BROWN, 2000). No entanto, em países em desenvolvimento, a via fecal-oral também pode ocorrer, devido aos fatores relacionados à higiene e à contaminação da água encontrados nessas regiões (SIAVOSHI et al., 2005).

Em todo o mundo, estima-se que o *H. pylori* esteja presente em mais de 50% da população, mas este valor varia segundo o desenvolvimento socioeconômico de cada país (PARENTE; PARENTE, 2010). Em relação à incidência, em muitas regiões tem-se observado uma regressão devido à melhoria das condições de vida. Apesar disso, no Brasil, a prevalência da bactéria na população ainda é alta, alcançando valores superiores a 70% (HOOI et al., 2017), o que configura um problema de saúde pública. É necessário ressaltar que o determinante principal da infecção por *H. pylori* é o nível socioeconômico durante a infância, já que este reflete as condições de higiene, acesso à água potável e saneamento básico,

número de pessoas que vivem em uma mesma casa e também o nível de educação. Além disso, existe também um efeito de coorte, que retrata o risco maior de adquirir o patógeno em pessoas nascidas há mais tempo e, conseqüentemente, uma prevalência maior de acordo com a idade (COELHO, 2021).

A respeito das manifestações clínicas associadas à bactéria, a maioria dos indivíduos apresentam gastrite crônica assintomática durante a vida. Dentre os sintomáticos, aproximadamente 10% desenvolvem úlcera péptica, 1-3% evoluem para câncer gástrico e 0,1% para linfoma de tecido linfóide associado à mucosa gástrica (WANG, 2014). Esta minoria de indivíduos que apresentam sintomatologia, apesar da grande prevalência desta bactéria, demonstra que a evolução clínica da colonização por *H. pylori* depende de outras variáveis, como fatores genéticos e comportamentais do hospedeiro e expressão de genes de virulência da bactéria colonizadora (AMIEVA e EL-OMAR, 2008).

Para o diagnóstico, o teste respiratório com uréia é considerado como o método não invasivo padrão ouro para *H. pylori* (COELHO *et al.*, 2018). Este consiste na ingestão de uréia marcada com carbono 13 (não radioativo) ou 14 (radioativo) e, caso haja a presença da bactéria no estômago, será liberado CO₂, que é eliminado no ar expirado pelo paciente e captado por um espectrômetro (COELHO *et al.*, 1999; GOMES; LAGO, 2014). Devido à falta do substrato necessário para este exame, no Brasil ele ainda é utilizado em menor escala. Como alternativa, tem-se o teste sorológico ELISA ou por quimioluminescência, realizado através de amostra de sangue ou saliva do paciente, cujo princípio se baseia em encontrar anticorpos anti-*H. pylori* (GOMES; LAGO, 2014).

Apesar da existência de métodos diagnósticos não invasivos considerados padrão ouro, a biópsia através da endoscopia digestiva alta ainda é o exame mais utilizado para a identificação da bactéria (GOMES; LAGO, 2014). A partir da amostra biopsiada, destaca-se a realização da análise histopatológica e/ou do teste rápido da urease para o diagnóstico da presença bacteriana. Em conjunto com estes, também pode ser feita a cultura da amostra, que fornece não somente o resultado da presença da bactéria, mas também serve como meio para o antibiograma que propicia o conhecimento da sensibilidade da bactéria quanto aos antibióticos testados (TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2016). Este teste pode servir para o conhecimento da resistência da bactéria e conseqüentemente a escolha do antibiótico a ser utilizado para a sua erradicação.

Atualmente, a primeira linha de tratamento para a *H. pylori* consiste em uma terapia tripla realizada por 14 dias com o uso de um inibidor de bomba de prótons (IBP) e dois antibióticos — amoxicilina e claritromicina (COELHO *et al.*, 2018). Neste caso, estudos

indicam que os IBPs de segunda geração (rabeprazol e esomeprazol) podem ter taxas de erradicação superiores aos de primeira geração, como omeprazol e pantoprazol (MCNICHOLL *et al.*, 2012). Como alternativa a este tratamento, tem-se a terapia concomitante, que utiliza os mesmos medicamentos do esquema triplo associados ao metronidazol ou ao tinidazol, ou a terapia quádrupla (bismuto, IBP, tetraciclina e metronidazol), sendo esta menos recomendada devido aos seus maiores efeitos colaterais em relação aos outros esquemas terapêuticos (COELHO *et al.*, 2018).

Apesar da claritromicina fazer parte do tratamento de primeira linha, a resistência a este antibiótico é registrada com valores superiores a 15% em diversas regiões do mundo, o que classifica alta resistência microbiana ao medicamento (ALBA; BLANCO; ALARCÓN., 2017). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou as cepas de *H. pylori* resistentes à claritromicina como bactérias de alta prioridade para futuras pesquisas e desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos. No Brasil, estima-se que a porcentagem dessa resistência seja de 16,9% (SANCHES *et al.*, 2016) o que já justifica a recomendação da terapia concomitante ao metronidazol, na tentativa de evitar falhas no tratamento (COELHO *et al.*, 2018).

O *H. pylori* possui diversos mecanismos que o permitem sobreviver no ambiente estomacal, que devido ao pH ácido e a presença de uma mucosa protetora, é um ambiente inóspito para a maioria dos patógenos (ANSARI e YAMAOKA, 2019). A respeito disso, são amplamente estudados os genes de virulência desta bactéria, que conferem a ela não somente a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal, mas também a patogenicidade que ocasiona as manifestações clínicas já conhecidas (BASSO *et al.*, 2010).

Primeiramente, a característica flagelada do *H. pylori* permite sua mobilidade — e consequentemente dificulta seu alcance pelas células imunes e anticorpos do organismo que normalmente eliminam os patógenos invasores do estômago (HATAKEYAMA, 2017) —, assim como a penetração na camada mucosa do estômago, que é a barreira protetora deste órgão. A partir disso, a presença das adesinas mantém a bactéria aderida ao epitélio gástrico, onde ocorre a sua colonização (AMIEVA; EL-OMAR, 2008). Dentro do estômago, o patógeno é capaz de produzir enzimas que conferem resistência ao meio ácido, sendo a principal destas a urease, que catalisa a conversão de uréia em amônia e dióxido de carbono, o que eleva o pH local para que a bactéria sobreviva nele (PROENÇA-MODENA; ACRANI; BROCCHI, 2009).

Apesar da forma espiralada ser característica da bactéria, esta também é encontrada como coco no epitélio gástrico humano (WING-YEE CHAN *et al.*, 1993; SHARNDAMA e

MBA, 2022), principalmente em regiões mais danificadas do epitélio (JANAS *et al.*, 1995). Quando comparado com amostras de pacientes com úlcera péptica benigna, a forma cocóide se mostrou mais prevalente em pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico (WING-YEE CHAN *et al.*, 1993). Este mesmo estudo também demonstrou que nas amostras de biópsia de adenocarcinoma, a presença de *H. pylori* em forma de cocos se concentrava ao redor do tumor, enquanto que nos indivíduos com úlcera péptica, esta morfologia da bactéria era encontrada em disposição aleatória pelo epitélio e longe da lesão. Descrita pela primeira vez na década de 90, a morfologia cocoide de *H. pylori* é uma provável forma de adaptação às condições adversas do ambiente gástrico, como temperatura, pH, antibióticos e a alta tensão de oxigênio (LAAM LI *et al.*, 2014; IERARDI *et al.*, 2020). Ao encontrar-se em um ambiente favorável, a bactéria é capaz de retornar à sua morfologia espiralada e infectar o hospedeiro novamente, o que levanta a hipótese de esta ser mais uma das formas de resistência ao meio da *Helicobacter pylori* que permite a reinfecção do ser humano mesmo após o tratamento (IERARDI *et al.*, 2020).

O *H. pylori* também pode apresentar a produção de citotoxinas relevantes para a sua patogenicidade. Dentre elas, tem-se a chamada citotoxina vacuolizante (VacA), expressada a partir do gene *vacA*, capaz de induzir a vacuolização citoplasmática e a apoptose na célula hospedeira, além de inibir a resposta imune pelos linfócitos T, o que prolonga a infecção bacteriana e os danos ao epitélio gástrico (PROENÇA-MODENA; ACRANI; BROCCHI, 2009). A VacA também é capaz de aumentar a permeabilidade paracelular, provocando a liberação de moléculas pelas células da mucosa gástrica que podem ser usadas como nutrientes pela bactéria (PAPINI *et al.*, 1998) e também tornando a célula mais suscetível à atividade da enzima urease (SHARNDAMA e MBA, 2022).

O gene *vacA* é subdividido em 3 segmentos: intermediário (i1 e i2), médio (m1 e m2) e sequência sinalizadora (s1 e s2), que influenciam diretamente na expressão da citotoxina VacA e sua patogenicidade. É relevante destacar duas famílias do *vacA*: s1/m2, que possui atividade citotóxica intermediária, e s1/m1, que possui alta citotoxicidade (SHARNDAMA e MBA, 2022). Ambas as variações genéticas estão fortemente relacionadas com o desenvolvimento de úlcera péptica, gastrite atrófica e câncer gástrico (PROENÇA-MODENA; ACRANI; BROCCHI, 2009).

Ademais, existe uma região genômica do DNA do *H. pylori* denominada ilha de patogenicidade *cag* (*cagPAI*), composta por 31 genes, sendo aproximadamente 20 deles conhecidos como integrantes do sistema de secreção tipo IV. Este sistema é capaz de translocar a citotoxina CagA para o interior das células do epitélio gástrico, onde esta, se

fosforilada, causará alterações morfológicas na estrutura celular. Ainda que não seja fosforilada pelas tirosinas quinases específicas da célula hospedeira, a CagA ainda provoca efeitos patogênicos capazes de levar a uma regulação transcricional positiva dos genes implicados na carcinogênese deste epitélio (TAKAHASHI-KANEMITSU; KNIGHT; HATAKEYAMA, 2020). Ao final da sequência genética da *cagPAI*, está localizado o gene *cagA*, um dos mais estudados devido a sua alta prevalência na população portadora da *H. pylori*, além de seu importante papel na patogenicidade da bactéria.

O gene *cagA*, codificador da citotoxina CagA, possui uma prevalência estimada de 60% no ocidente e 90% em países asiáticos (KAO; SHEU; WU, 2016). Esta toxina é responsável por induzir vias de sinalização no epitélio que podem ocasionar dissociação das células, alterações no formato celular e efeitos pró-inflamatórios e mitogênicos, que aumentam o risco de carcinogênese (AMIEVA; EL-OMAR, 2008). Indivíduos portadores de cepas carreadoras do gene *cagA* estão relacionados a um pior prognóstico, uma vez que estão associados ao desenvolvimento de gastrite e úlcera péptica em graus mais elevados, atrofia da mucosa gástrica e adenocarcinoma gástrico (NEJATI et al., 2018).

A análise dos genes de virulência supracitados é realizada através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), que consiste na replicação do fragmento do gene de interesse (KOVACHEVA-SLAVOVA *et al.*, 2021; GAREAYAGHI e KOCAZEYBEK, 2022; GAZI *et al.*, 2013). Para este processo, é utilizado um iniciador (primer) que deve acoplar-se à região em que se iniciará a síntese do material genético. A partir disso, são geradas milhões de cópias quantificadas através da fluorescência de compostos adicionados para a análise (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004). Dentre estes, os mais utilizados são TaqMan® e SYBR Green®. O primeiro utiliza uma sonda fluorescente que hibridiza na região a ser amplificada pelo primer, enquanto o segundo liga-se a toda a dupla fita de DNA formada, emitindo fluorescência (SUAREZ *et al.*, 2015).

A técnica de reação em cadeia da polimerase é amplamente utilizada para a identificação de genes de *H. pylori*, seja em amostras provenientes de seres humanos ou do meio ambiente (DIOUF *et al.*, 2009). Desta forma, a PCR tem se mostrado eficiente em avaliar a presença dos genes de virulência da bactéria (TIRAPATTANUN *et al.*, 2016), como o *cagA*. Apesar disso, o estudo da presença destes genes ainda é pouco explorado em amostras de cavidade oral humana, mas se mostra necessário a fim de contribuir com o esclarecimento da presença de *H. pylori* neste sítio.

2.1.7 Metodologia

2.1.7.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo observacional, transversal, quantitativo, descritivo e analítico.

2.1.7.2 Local e período de realização do estudo

O estudo será realizado nos Ambulatórios da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), assim como no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFFS, na cidade de Passo Fundo – Rio Grande do Sul, no período de agosto de 2023 a junho de 2024.

2.1.7.3 População e amostragem

Este estudo é um recorte do projeto de pesquisa institucionalizado na UFFS intitulado “Detecção de colonização por *Helicobacter pylori* em cavidade oral por técnica de reação em cadeia da polimerase”. O referido projeto encontra-se em andamento desde fevereiro de 2021, com contribuição da presente autora atuando como pesquisadora voluntária.

A população do projeto supracitado e deste recorte compreenderá os pacientes em atendimento nos ambulatórios do Hospital de Clínicas e do Hospital São Vicente de Paulo, localizados nas dependências da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo.

A amostra deste estudo é composta pelos pacientes cuja amostra da cavidade oral resultou positiva para a presença de DNA de *Helicobacter pylori*. O tamanho da amostra foi calculado através da fórmula de frequência em uma população pelo *software* de domínio público OpenEpi, versão 3.01. Para o cálculo, utilizou-se uma frequência antecipada de 60%, considerando o tamanho da população de 1.000.000, um limite de confiança de 5% e o efeito de desenho de 1.0. O tamanho da amostra resultante foi de 369. Serão excluídas do estudo aquelas amostras que não estiverem adequadas para análise segundo a técnica a ser empregada.

2.1.7.4 Variáveis e coleta de dados

A etapa da coleta de dados é parte do projeto “Detecção de colonização por *Helicobacter pylori* em cavidade oral por técnica de reação em cadeia da polimerase” e teve

início em fevereiro de 2021, a ser concluída em agosto de 2023. No presente recorte pretende-se utilizar as amostras de material biológico coletadas destes pacientes que encontram-se armazenadas em freezer no laboratório de pesquisa, assim como os dados provenientes dos questionários aplicados. Além disso, novas amostras e entrevistas serão realizadas durante a execução do mesmo.

Durante as coletas os pacientes serão abordados pela equipe de pesquisa, da qual a acadêmica responsável pelo presente estudo faz parte, na sala de espera dos ambulatórios, na data da consulta, para sua possível participação. Aos pacientes será explicada a pesquisa e em caso de aceite em participar, será lido o TCLE (Termo de consentimento livre e esclarecido). Após assinatura do termo, será aplicado o instrumento de coleta de dados em formato de questionário (ANEXO A) e feita a coleta de amostra da cavidade oral por meio de fricção da mucosa oral com escova de coleta estéril.

Como desfecho será avaliada a variável categórica dependente “presença do gene *cagA*”, por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real Time PCR), conforme detalhes a seguir. Como variáveis independentes serão avaliadas as características sociodemográficas (local de residência, escolaridade, idade, sexo, acesso à água encanada e número de pessoas no domicílio) de saúde (tabagismo, endoscopia prévia, uso recente de IBP e uso recente de AINE, dispepsia, pirose, náusea, vômitos, intolerância a café, intolerância a refrigerante e intolerância à pimenta).

Após a coleta, o questionário será identificado, assim como o material da cavidade oral coletado, que será acondicionado em tampão TET (Tris-EDTA-Tween) e transportado ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFFS, onde será realizada a extração do DNA, utilizando-se o método de CTAB/clorofórmio/álcool isoamílico, descrito a seguir:

Primeiramente, é feita a adição de proteinase K à amostra em uma concentração final de 400µg/ul e, posteriormente, incubação a 56°C por 3-12h para a digestão do material, seguido da inativação da proteinase K por aquecimento a 96°C por 7 minutos. Em seguida, são adicionados 100 µl de solução de NaCl 5M e 100µl da solução de CTAB/NaCl pré aquecida a 65°C, com posterior incubação a esta mesma temperatura por 10 minutos. Após a incubação, acrescenta-se 750 µl de clorofórmio - álcool isoamílico 24:1 e realiza-se a centrifugação por 5 minutos 12.000 rpm à temperatura ambiente (TA). Então, transfere-se o sobrenadante para novo tubo e adiciona-se 450 µl de etanol absoluto a - 20°C com posterior incubação por 10 minutos à TA para precipitação do DNA. Após a centrifugação por 15 minutos, 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante é descartado e 450 µl de etanol 70% são adicionados ao pellet de DNA. Posteriormente, é feita uma nova centrifugação por 15

minutos, 12.000 rpm a 4°C, o etanol 70% é removido e as amostras ressuspendidas em 50 µl de tampão TRIS/EDTA (TE) estéril para posterior utilização na detecção do DNA através das técnicas de PCR.

Estas amostras serão avaliadas para a presença de DNA de *Helicobacter pylori*, pelo método convencional de reação em cadeia da polimerase (PCR), pela equipe de pesquisa do projeto original, sob supervisão da Prof^a. Jossimara Poletini e do Prof. Gustavo Olszanski Acrani. Serão utilizados primers específicos (Quadro 1) previamente descritos (RAMÍREZ-LÁZARO, 2011).

As reações de PCR e nested PCR serão realizadas em volume final de 20µL, composto por 10µL de Go Taq Green Master Mix 2X (cód. M 7122- Promega, Madison, Wisconsin, EUA); 0,6µL de cada primer na concentração de 10µM; 4,8 µL de água estéril e 4µL de cada amostra pesquisada. As incubações serão realizadas em termociclador com os parâmetros adequados. Em todas as reações realizadas será utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água estéril, e um controle positivo contendo DNA comercial extraído de *H. pylori*. A eficiência das amplificações será monitorada por eletroforese da reação em gel de agarose 1,5%, preparado em tampão 1X TBE (Tris/Ácido Bórico/EDTA) e corada com Brometo de Etídio. O tamanho dos produtos amplificados será comparado com o padrão de 500 pb e posteriormente fotografados sob transiluminação ultravioleta.

As amostras que resultarem positivas para DNA de *H. pylori* serão utilizadas neste estudo, e secundariamente analisadas utilizando os primers específicos (Tabela 1) previamente descritos (TIRAPATTANUN *et al.*, 2016) para amplificação do gene *cagA*, através da técnica de PCR convencional, a fim de identificar a presença deste.

Para a técnica empregada, as reações serão realizadas em volume final de 25µL, composto por 100ng de DNA, utilizando-se os reagentes do kit Go Taq Green Master Mix 2X (cód. M 7122- Promega, Madison, Wisconsin, EUA); 0,2µM de cada iniciador (primer). A amplificação será realizada em termociclador seguindo os parâmetros descritos por Tirapattanun *et al.* (2016). Os resultados serão analisados utilizando eletroforese e visualização sob transiluminação UV.

Quadro 1: Primers

Gene	Primer forward	Primer reverse	Tamanho
------	----------------	----------------	---------

<i>ureA</i>	5'-CGT GGC AAG CAT GAT CCA T-3'	5'-GGG TAT GCA CGG TTA CGA GTT T-3'	77 pb
<i>cagA</i>	outer 5'-ACG ATT GGA ACG CCA CC-3' inner 5'-ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA GCG A-3'	outer 5'-CGC CAT TTG TAA CGC CTA-3' inner 5'-TTA GAA TAA TCA ACA AAC ATC ACG CCA T-3'	588 pb 297 pb

2.1.7.5 Processamento, controle de qualidade e análise dos dados

Os questionários e resultados das amostras serão duplamente digitados em um banco de dados no software Epidata (distribuição livre). Posteriormente, serão analisados estatisticamente no *software* de distribuição livre PSPP e consistirá na média e desvio padrão das variáveis numéricas e distribuição de frequências, absoluta e relativa, das variáveis categóricas.

A análise da relação entre a variável dependente e as independentes será realizada através do Teste de Qui-quadrado ou exato de Fisher, considerando um nível de significância estatística de 95%. Será analisada a presença do gene *cagA*, assim como os aspectos sociodemográficos e de saúde relacionados a esta.

2.1.7.6 Aspectos éticos

O projeto “Detecção de colonização por *Helicobacter pylori* em cavidade oral por técnica de reação em cadeia da polimerase” foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da UFFS (CEP-UFFS), sob protocolo de aprovação número 4.527.806 (ANEXO B), e também pelas instituições envolvidas, Hospital de Clínicas de Passo Fundo e Hospital São Vicente de Paulo, sob termo de ciência e concordância, atendendo à resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

2.1.8 Recursos

Todos os custos serão de responsabilidade da equipe de pesquisa.

Quadro 2: Orçamento do estudo

Item	Quantidade	Valor unitário	Valor total
Reagentes para PCR e eletroforese	1	R\$3.000,00	R\$3.000,00
Primers	8	R\$200,00	R\$1.600,00
Impressão dos questionários	300	R\$0,50	R\$150,00
Total			R\$4.750,00

2.1.9 Cronograma

Quadro 3: Cronograma do estudo

Atividades a serem desenvolvidas	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	Mês 7	Mês 8	Mês 9	Mês 10	Mês 11	Mês 12
Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Coleta e análise de dados					X	X	X	X	X			
Envio dos relatórios parcial e final para o CEP							X					
Escrita do artigo e divulgação dos resultados									X	X	X	X

REFERÊNCIAS

ALBA, Claudio; BLANCO, Ana; ALARCÓN, Teresa. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, [s. l.], 30 out. 2017.

AL-SULAMI, A.A. *et al.* Isolation and identification of *Helicobacter pylori* from drinking water in Basra governorate, Iraq. **Eastern Mediterranean Health Journal**, [s. l.], 16 mar. 2010.

AMIEVA, Manuel R.; EL-OMAR, Emad M. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. **Elsevier**, [s. l.], 31 dez. 2008.

ANSARI, Shamshul; YAMAOKA, Yoshio. *Helicobacter pylori* Virulence Factors Exploiting Gastric Colonization and its Pathogenicity. **Toxins (Basel)**, [s. l.], 19 nov. 2019.

AZIZ, Ramy K. *et al.* Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. **Journal of Advanced Research**, [s. l.], 21 jul. 2013.

BASSO, Daniela *et al.* Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. **Wiley Online Library**, [s. l.], 5 nov. 2010.

BROWN, Linda Morris. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. **Epidemiologic Reviews**, [s. l.], 1 jan. 2000.

COELHO, Luiz Gonzaga Vaz *et al.* Diretrizes mundiais sobre *Helicobacter Pylori*. **World Gastroenterology Organisation**, [s. l.], 1 maio 2021.

COELHO, Luiz Gonzaga Vaz *et al.* IV Consenso Brasileiro sobre a infecção por *Helicobacter pylori*. **Arquivos de Gastroenterologia**, [s. l.], 1 abr. 2018.

FERGUSON, Donald A. *et al.* Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], 1 out. 1993.

GAREAYAGHI, Nesrin; KOCAZEYBEK, Bekir. Detection of A2143G, A2142C, and A2142G Point Mutations with Real-Time PCR in Stool Specimens from Children Infected with *Helicobacter pylori*. **Diagnostics (Basel)**, [s. l.], 12 set. 2022.

GAZI, Sofia *et al.* Real-Time PCR detection and quantitation of *Helicobacter pylori* clarithromycin-resistant strains in archival material and correlation with Sydney classification. **Annals of Gastroenterology**, [s. l.], 2 jun. 2013.

GOLDMAN, R. C. *et al.* Tight binding of clarithromycin, its 14-(R)-hydroxy metabolite, and erythromycin to *Helicobacter pylori* ribosomes. **Antimicrob Agents Chemother**, [s. l.], 7 jul. 1994.

HATAKEYAMA, Masanori. Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. **Proceedings of the Japan academy, Series B physical and biological sciences**, [s. l.], 11 abr. 2017.

HOOI, James *et al.* Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. **Elsevier Inc.**, [s. l.], 19 abr. 2017.

IRANI, Soussan; ESFAHANI, Alireza Monsef; ZEREHPUSH, Farahnaz Bidari. Detection of *Helicobacter pylori* in Oral Lesions. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, [s. l.], 22 jul. 2013.

KABIR, S. THOMAS, J.E. *et al.* Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. **The Lancet**, [s. l.], 1 dez. 2001.

KAO, Cheng-Yen; SHEU, Bor-Shyang; WU, Jiunn-Jong. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. **Biomedical Journal**, [s. l.], 1 abr. 2016.

KOVACHEVA-SLAVOVA, M. *et al.* Screening for *Helicobacter pylori* infection and Clarithromycin resistance using Real-Time Polymerase Chain Reaction. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [s. l.], 2 maio 2021.

LADEIRA, Marcelo Sady Plácido; SALVADORI, Daisy Maria Fávero; RODRIGUES, Maria Aparecida Marchesan. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], 19 mar. 2003.

LI, C *et al.* High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay. **Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], 1 dez. 1994.

MARQUES, Hanna Santos *et al.* *Helicobacter pylori* infection: Beyond gastric manifestations. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], 28 jul. 2020.

MITCHELL, Hazel; KATELARIS, Peter. Epidemiology, clinical impacts and current clinical management of *Helicobacter pylori* infection. **Medical Journal of Australia**, [s. l.], 6 jun. 2016.

NEJATI, Shima *et al.* Influence of *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], p. 43-48, 1 abr. 2018.

NOVAIS, Caroline Monteiro; PIRES-ALVES, Melissa. PCR em tempo real: Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**, [s. l.], 10 dez. 2004.

PARENTE, José Miguel Luz; PARENTE, Mírian Perpétua Palha Dias. Contexto epidemiológico atual da infecção por *Helicobacter pylori*. **GED gastroenterol. endosc. dig**, [s. l.], 29 jul. 2010.

PROENÇA-MODENA, José Luiz; ACRANI, Gustavo Olszanski; BROCCHI, Marcelo. *Helicobacter pylori*: phenotypes, genotypes and virulence genes. **Future microbiology**, [s. l.], 4 mar. 2009.

RAMÍREZ-LÁZARO, María José *et al.* Real-Time PCR Improves *Helicobacter pylori* Detection in Patients with Peptic Ulcer Bleeding. **PLoS One**, [s. l.], 20 maio 2011.

SANCHES, Bruno Squarcio *et al.* Detection of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in Brazil: A national survey. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], 7 set. 2016.

SIAVOSHI, Farideh *et al.* Detection of *Helicobacter pylori*-Specific Genes in the Oral Yeast. **Helicobacter**, [s. l.], 5 ago. 2005.

SOUTO, Renata; COLOMBO, Ana Paula Vieira. Detection of *Helicobacter pylori* by Polymerase Chain Reaction in the Subgingival Biofilm and Saliva of Non-Dyspeptic Periodontal Patients. **Journal of Periodontology**, [s. l.], 1 jan. 2008.

SUAREZ, Eloah Rabello *et al.* Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, [s. l.], 26 nov. 2015.

TIRAPATTANUN, Aschana *et al.* DETECTION OF *HELICOBACTER PYLORI* AND VIRULENCE-ASSOCIATED GENES IN SALIVA SAMPLES OF ASYMPTOMATIC PERSONS IN NORTHEAST THAILAND. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, [S. l.], p. 22-216, 1 nov. 2016.

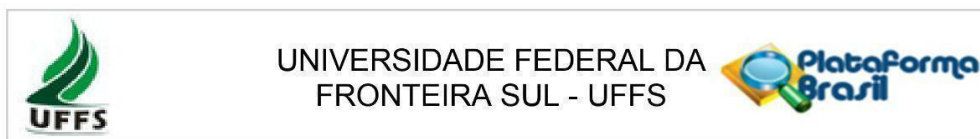
THOMAS, J.E. *et al.* Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. **The Lancet**, [s. l.], 14 nov. 1992.

WANG, XM *et al.* Oral *Helicobacter pylori*, its relationship to successful eradication of gastric H. pylori and saliva culture confirmation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, [s. l.], 1 ago. 2014.

ANEXO A - Questionário do estudo

Número do questionário	nques ____
Nome do entrevistador	entre ____
Data coleta	data ____/____/____
Onde você reside? (1) zona urbana (2) zona rural	resi ____
Qual a sua escolaridade: (1) Analfabeto (2) Fundamental incomp (3) Fundamental comp (4) Ensino médio incompleto (5) Ensino médio completo (6) Superior incomp (7) Superior comp	esc ____
Qual a sua idade?	id ____
Qual o seu sexo? (1) Masculino (2) Feminino	sexo ____
Qual o número de pessoas que residem no seu domicílio? (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4 (5) 5 (6) 6 ou mais	pess ____
Você fuma ou já fumou? (1) Sim (2) Nunca fumou (3) Parou de fumar	tabag ____
Você bebe ou já bebeu? (1) Sim (2) Nunca bebeu (3) Parou de beber	etil ____
Você já fez endoscopia prévia? (1) Sim (2) Não	endo ____
Você tem dificuldade de digestão (dispepsia)? (1) Sim (2) Não	disp ____
Você tem pirose? (1) Sim (2) Não	pirose ____
Você tem náusea? (1) Sim (2) Não	Nau ____
Você tem vômitos frequentes? (1) Sim (2) Não	Vom ____
Você tem intolerância a café? (1) Sim (2) Não (3) Não consome	cafe ____
Você tem intolerância a refrigerante? (1) Sim (2) Não (3) Não consome	refri ____
Você tem intolerância à pimenta? (1) Sim (2) Não (3) Não consome	pime ____
Você fez uso recente de IBP (omeprazol, pantoprazol, etc)? (1) Sim (2) Não	ibp ____
Você fez uso recente de AINE (nimesulida, ibuprefeno, etc)? (1) Sim (2) Não	aine ____

ANEXO B - Parecer de aprovação do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção de colonização por *Helicobacter pylori* em cavidade oral por técnica de reação em cadeia da polimerase

Pesquisador: Daniela Augustin Silveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 40414020.4.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.527.806

Apresentação do Projeto:

Trata de encaminhamento de protocolo de pesquisa em que permaneceram pendências éticas de acordo com o parecer nº 4.447.954

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a prevalência de *Helicobacter pylori* em cavidade oral dos pacientes encaminhados aos ambulatorios da Universidade Federal da Fronteira Sul campus Passo Fundo. **Objetivo Secundário:** Relacionar a presença de *Helicobacter pylori* em cavidade oral com sintomas clínicos. Descrever os principais aspectos epidemiológicos da colonização oral por *Helicobacter pylori*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Quanto aos riscos, há o risco de identificação do paciente. A fim de minimizar esse risco, o nome do paciente não será incluído no questionário, sendo apenas utilizado um número de identificação. Além disso, os dados serão manuseados apenas pela equipe de pesquisa que se compromete a não divulgar as informações e manter o sigilo nos dados de identificação. Caso o risco previsto venha a ocorrer, o participante será excluído do estudo e os locais de coleta de dados serão informados sobre o ocorrido. Os resultados serão divulgados em eventos e/ou publicações científicas mantendo sigilo dos dados pessoais dos pacientes. Na ocasião da coleta de amostra da cavidade oral, existe o desconforto do paciente em realizar o procedimento de coleta

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-899
UF: SC **Município:** CHAPECÓ
Telefone: (49)2049-3745 **E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 4.527.806

com escova estéril, portanto, vai ser tomado o cuidado de estar em ambiente privado, na presença apenas do pesquisador. Entretanto, a coleta da amostra em si é um procedimento não invasivo que não oferece riscos à integridade física do paciente. Caso o risco de desconforto venha a se concretizar será respeitada a decisão do participante em desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. A amostra de cavidade oral será numerada dentro da pesquisa, bem como o questionário aplicado. Não haverá a identificação dos participantes da pesquisa. As amostras coletadas serão usadas exclusivamente para a análise proposta nessa pesquisa e após a análise, as mesmas serão descartadas de acordo com as normas de biossegurança, conforme acordado com o paciente no TCLE. Durante a aplicação do questionário, o paciente pode se sentir constrangido e/ou desconfortável com alguma eventual pergunta. Nesse caso, será respeitada a decisão do paciente em não responder à pergunta em questão, assim como deixar de participar da pesquisa caso desejar, como previsto no TCLE. Benefícios: Devido à natureza do estudo, não estão previstos benefícios diretos ao paciente, pois a presença de *H. pylori* na cavidade oral não é patológica, sendo que o estudo visa verificar a sua presença no sítio oral como possível forma de transmissão da bactéria. Entretanto, caso deseje, o participante poderá receber os resultados da pesquisa por e-mail, que será coletado junto ao TCLE. Além disso, a comunidade poderá ser beneficiada com esses resultados na prática clínica através de possíveis ações de prevenção e tratamento da infecção gástrica por *Helicobacter pylori* e suas patologias associadas. Diversos outros estudos foram conduzidos no sentido de esclarecer a relação da bactéria em cavidade oral com a sua infecção gástrica, mas com resultados inconclusivos até então. Contudo, a equipe fornecerá uma devolutiva a instituição envolvida na forma de relatório, documentando os resultados obtidos na pesquisa. Além disso, a comunidade poderá ser beneficiada com esses resultados na prática clínica através de possíveis ações de prevenção e tratamento da infecção gástrica por *Helicobacter pylori* e suas patologias associadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As pendências foram atendidas

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador(a)

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar

Bairro: Área Rural

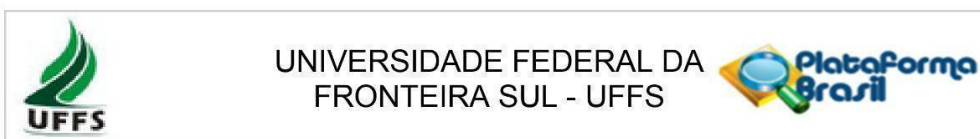
CEP: 89.815-899

UF: SC

Município: CHAPECÓ

Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 4.527.806

A partir desse momento o CEP passa a ser corresponsável, em termos éticos, do seu projeto de pesquisa – vide artigo X.3.9. da Resolução 466 de 12/12/2012.

Fique atento(a) para as suas obrigações junto a este CEP ao longo da realização da sua pesquisa. Tenha em mente a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, a Norma Operacional CNS 001/2013 e o Capítulo III da Resolução CNS 251/1997. A página do CEP/UFFS apresenta alguns pontos no documento “Deveres do Pesquisador”.

Lembre-se que:

1. No prazo máximo de 6 meses, a contar da emissão deste parecer consubstanciado, deverá ser enviado um relatório parcial a este CEP (via NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil) referindo em que fase do projeto a pesquisa se encontra. Veja modelo na página do CEP/UFFS. Um novo relatório parcial deverá ser enviado a cada 6 meses, até que seja enviado o relatório final.
2. Qualquer alteração que ocorra no decorrer da execução do seu projeto e que não tenha sido prevista deve ser imediatamente comunicada ao CEP por meio de EMENDA, na Plataforma Brasil. O não cumprimento desta determinação acarretará na suspensão ética do seu projeto.
3. Ao final da pesquisa deverá ser encaminhado o relatório final por meio de NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil. Deverá ser anexado comprovação de publicização dos resultados. Veja modelo na página do CEP/UFFS.

Em caso de dúvida:

Contate o CEP/UFFS: (49) 2049-3745 (8:00 às 12:00 e 14:00 às 17:00) ou cep.uffs@uffs.edu.br;

Contate a Plataforma Brasil pelo telefone 136, opção 8 e opção 9, solicitando ao atendente suporte Plataforma Brasil das 08h às 20h, de segunda a sexta;

Contate a “central de suporte” da Plataforma Brasil, clicando no ícone no canto superior direito da página eletrônica da Plataforma Brasil. O atendimento é online.

Boa pesquisa!

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1655636.pdf	11/12/2020 12:19:12		Aceito

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar

Bairro: Área Rural

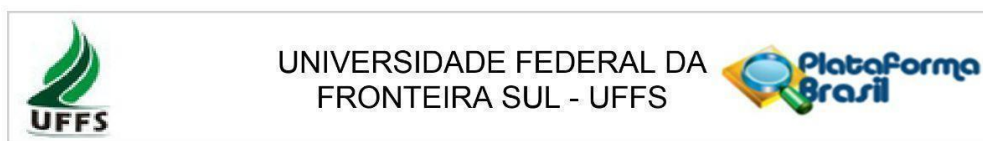
CEP: 89.815-899

UF: SC

Município: CHAPECÓ

Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 4.527.806

Outros	Carta_Pendencias.doc	11/12/2020 12:18:46	PATRICIA MARCOLIN	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_corrigido.docx	11/12/2020 12:17:53	PATRICIA MARCOLIN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_corrigido.docx	11/12/2020 12:17:34	PATRICIA MARCOLIN	Aceito
Outros	ANEXO_B_termo_de_ciencia_e_concordancia_HSVP.pdf	23/11/2020 18:47:44	PATRICIA MARCOLIN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	23/11/2020 17:39:59	PATRICIA MARCOLIN	Aceito
Outros	ANEXO_A_termo_de_ciencia_e_concordancia.pdf	18/11/2020 17:56:45	PATRICIA MARCOLIN	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	18/11/2020 17:43:28	PATRICIA MARCOLIN	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Apendice_B_TCLE.pdf	28/10/2020 16:11:05	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Outros	Apendice_A_QUESTIONARIO.pdf	28/10/2020 16:10:54	Daniela Augustin Silveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CHAPECO, 06 de Fevereiro de 2021

Assinado por:
Fabiane de Andrade Leite
(Coordenador(a))

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-899
UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (49)2049-3745 **E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br

2.2 RELATÓRIO DE PESQUISA

Este estudo, intitulado “Avaliação de genótipo de virulência de *Helicobacter pylori* de amostras da cavidade oral” objetiva analisar a presença do gene *cagA* em amostras de cavidade oral positivas para *H. pylori* identificadas na cavidade oral de pacientes em atendimento nos ambulatórios da UFFS, assim como a sua relação com suas características sociodemográficas e de saúde.

O projeto de pesquisa foi redigido no primeiro semestre do ano de 2023, sob orientação do Prof. Dr. Gustavo Olszanski Acrani e coorientação da Prof^ª. Dr^ª. Jossimara Polettini, durante a disciplina de Trabalho de Curso I. Não foi necessária a submissão individual ao Comitê de Ética, uma vez que esse é um recorte do projeto intitulado “Detecção de colonização por *Helicobacter pylori* em cavidade oral por técnica de reação em cadeia da polimerase”, aprovado em 06 fevereiro de 2021 pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da UFFS (CEP-UFFS), e também pelas instituições envolvidas, o Hospital de Clínicas de Passo Fundo e o Hospital São Vicente de Paulo – vide parecer de aprovação em anexo ao projeto original.

A coleta da pesquisa ocorreu em duas etapas: Primeiramente, foi feita a abordagem dos pacientes nos ambulatórios da UFFS, convidando-os a participar do estudo e, em caso de aceite, realizando a coleta de amostra da cavidade oral. Esta etapa começou anteriormente ao início do presente estudo, em fevereiro de 2021 e transcorreu até agosto de 2023, já que compõe a pesquisa da qual este estudo é parte. Em um segundo momento, as amostras foram transportadas ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFFS, onde as etapas de extração e quantificação do DNA e pesquisa de *H. pylori* através da reação em cadeia da polimerase foram realizadas. O envolvimento da presente autora teve início em junho de 2023, atuando na coleta, nas entrevistas e nos protocolos do laboratório.

Ao final do segundo semestre de 2023, 342 amostras haviam sido coletadas e em todas realizou-se o processo de extração do DNA de *H. pylori*, segundo protocolo previamente estabelecido, conforme descrito neste projeto. Após, quantificou-se a presença do material genético desejado em cada amostra e a pureza da reação de extração. As amostras que apresentaram quantidade de DNA insuficiente ou pureza abaixo do limiar aceitável ($< 1,4$) foram submetidas novamente ao processo de extração para corrigi-las a um valor adequado para dar seguimento à reação de PCR.

Até dezembro de 2023, 228 amostras foram testadas para a presença de DNA de *H. pylori* através da técnica de PCR, utilizando iniciadores específicos, seguido de Nested PCR

com os mesmos iniciadores, das quais 77 resultaram positivas. Em todas as amostras utilizou-se um controle negativo, substituindo o DNA por água estéril, e também um controle positivo, que consiste em DNA extraído de *H. pylori* através de material obtido em biópsia gástrica. Os primers necessários para a avaliação do gene *cagA* foram recebidos no mês de novembro de 2023.

Em março de 2024, após estabelecer o protocolo de laboratório para as reações de PCR, deu-se início a testagem para a presença do gene *cagA* nas amostras positivas para *H. pylori*. Das 77 amostras positivas, 10 foram excluídas por falta de informações no questionário respondido. Desta forma, 67 amostras foram analisadas para a variável dependente do estudo.

Ao fim das análises laboratoriais, em abril de 2024 os dados dos questionários e dos protocolos de laboratório foram duplamente digitados no programa Excel e no Epidata versão 3.1. Após, foram analisados estatisticamente por meio do *software* PSPP, no mesmo mês. As variáveis independentes analisadas foram: local de residência, escolaridade, idade, sexo, acesso à água encanada e número de pessoas no domicílio, tabagismo, endoscopia prévia, uso recente de IBP, dispepsia, pirose, náusea, vômitos, intolerância a café, intolerância a refrigerante e intolerância à pimenta.

Por fim, em maio os resultados foram interpretados e redigidos em forma de artigo, segundo as normas da revista Arquivos de Gastroenterologia (<https://www.scielo.br/journal/ag/about/#instructions>).

3. ARTIGO

PREVALÊNCIA DO GENE DE VIRULÊNCIA *cagA* EM AMOSTRAS DE *Helicobacter pylori* DE CAVIDADE ORAL

Pietra Calegari Mendes¹

Jossimara Polettini²

Gustavo Olszanski Acrani²

¹ Discente da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo, RS, Brasil.

² Docente da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo, RS, Brasil.

RESUMO

Objetivos: Avaliar a presença do gene *cagA* de *Helicobacter pylori* em amostras da cavidade oral, assim como a sua relação com variáveis sociodemográficas e de saúde. **Métodos:** Estudo transversal, realizado em Passo Fundo - RS. Incluíram-se participantes de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que aguardavam atendimento nos Ambulatórios de ensino da UFFS. Os participantes foram submetidos à aplicação do questionário e à coleta de amostra da cavidade oral. Para a pesquisa do *H. pylori* e do gene *cagA* foi empregada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A análise estatística consistiu na distribuição de frequências das variáveis descritivas, na prevalência da positividade do gene *cagA* e na relação obtida entre essas, com intervalo de confiança de 95%. **Resultados:** A amostra, (n=67) é composta majoritariamente por mulheres, residentes em zona urbana e média de idade de 51,4 anos. A média de pessoas que viviam no mesmo domicílio foi de 2,85 e a prevalência de consumo de álcool e tabagismo foi de 49,3% e 43,3%, respectivamente. O sintoma de pirose foi o mais referido (52,2%) dentre os entrevistados, seguido de dispepsia (29,9%). O gene *cagA* foi detectado em 9 das 67 amostras, demonstrando uma prevalência de 13,4% na população estudada. Houve maior distribuição de amostras de *H. pylori* positivas para o gene de virulência *cagA* em indivíduos que relataram apresentar náusea (37,5, $p = 0,009$). **Conclusão:** O estudo demonstrou uma prevalência do gene *cagA* semelhante ao que é encontrado na literatura atual. Esta pesquisa contribui com o esclarecimento da presença da bactéria na cavidade oral humana e com a possibilidade deste método de análise ser utilizado como forma de rastreio em pacientes de risco ou sintomáticos.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*; *cagA*; cavidade oral.

ABSTRACT

Objectives: To assess the presence of the *Helicobacter pylori cagA* gene in oral cavity samples, as well as its relationship with sociodemographic and health variables. **Methods:** Cross-sectional study carried out in Passo Fundo - RS. Participants were of both sexes, over 18 years of age, who were waiting to be seen at the UFFS teaching clinics. Participants were given a questionnaire and had a sample taken from their oral cavity. The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was used to test for *H. pylori* and the *cagA* gene. The statistical

analysis consisted of the distribution of frequencies of the descriptive variables, the prevalence of *cagA* gene positivity and the relationship between them, with a 95% confidence interval. **Results:** The majority of the sample (n=67) were women, living in urban areas and with an average age of 51.4 years. The average number of people living in the same household was 2.85 and the prevalence of alcohol consumption and smoking was 49.3% and 43.3% respectively. The symptom of heartburn was the most common (52.2%) among those interviewed, followed by dyspepsia (29.9%). The *cagA* gene was detected in 9 of the 67 samples, showing a prevalence of 13.4% in the population studied. There was a higher distribution of *H. pylori* samples positive for the *cagA* virulence gene in individuals who reported nausea (37.5, $p = 0.009$). **Conclusion:** The study showed a prevalence of the *cagA* gene similar to that found in the current literature. This research contributes to clarifying the presence of the bacterium in the human oral cavity and the possibility of this method of analysis being used as a form of screening in at-risk or symptomatic patients.

Keywords: *Helicobacter pylori*; *cagA*; oral cavity.

INTRODUÇÃO

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria colonizadora da mucosa gástrica humana, responsável pelo desenvolvimento de doenças como gastrite crônica, úlcera péptica, câncer gástrico e linfoma de tecido linfóide associado à mucosa gástrica. A forte relação com o desenvolvimento de neoplasias fez com que o *H. pylori* fosse classificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer como agente carcinogênico do grupo I, sendo hoje considerado o principal fator de risco para o câncer gástrico¹.

A prevalência desta bactéria varia segundo condições socioeconômicas, mas estima-se que metade da população mundial esteja infectada². Sua rota de transmissão não é totalmente esclarecida, mas acredita-se que as vias fecal-oral e oral-oral sejam as principais formas de contaminação deste microrganismo, que já foi isolado em amostras de água, fezes e saliva³.

Além da mucosa gástrica, o *H. pylori* tem sido encontrada também em outros locais, como a cavidade oral humana. Diversos autores têm registrado a presença da bactéria em amostras de saliva³, placa gengival⁴ e lesões orais⁵. No entanto, os estudos a esse respeito ainda são controversos e a presença da bactéria neste sítio ainda não é bem esclarecida.

Ainda que seja um agente importante de doenças gástricas, nem todos os infectados por *H. pylori* desenvolvem um quadro clínico. Mais de 80% dos indivíduos apresentam gastrite crônica assintomática durante a vida, o que demonstra que fatores genéticos e

comportamentais do hospedeiro e expressão genética de virulência da bactéria, além de sua presença, influenciam na evolução clínica destes pacientes⁶.

Atualmente, são descritos diversos mecanismos de patogenicidade desta bactéria. Dentre eles, a produção da enzima urease, que permite a sobrevivência no meio ácido, a mobilidade concedida pelos flagelos, as adesinas que permitem a aderência da célula bacteriana ao epitélio gástrico e também citotoxinas⁶. Dentre estas, a proteína CagA, produzida pelo gene *cagA*, é amplamente estudada devido à alta prevalência deste fator em amostras clínicas — aproximadamente 60% na população ocidental infectada e mais de 90% nos países do oriente⁷. Esta toxina está localizada ao final na região genômica denominada ilha de patogenicidade *cag*, onde aproximadamente 20 genes codificam uma estrutura denominada sistema de secreção tipo IV. Este é responsável por mediar a translocação da CagA para o citoplasma da célula hospedeira, onde a citotoxina é capaz de causar alterações morfológicas, de proliferação e apoptose que aumentam o risco de carcinogênese⁸.

Apesar do gene *cagA* já ter sido identificado em amostras da cavidade oral humana⁹, ainda são poucos os estudos que abordam esta avaliação e a sua relação com aspectos sociodemográficos, comportamentais e de saúde, o que pode contribuir com o entendimento do papel da colonização de *H. pylori* na cavidade oral e sua possível relação com as manifestações clínicas gastrointestinais e reincidência da infecção no ser humano. Ademais, a prevalência deste gene produtor de citotoxina varia segundo a região estudada¹⁰, o que torna relevante a busca deste em diversas populações. Desta forma, este estudo objetiva avaliar a presença do gene *cagA* em cepas de *H. pylori* a partir de amostras da cavidade oral de pacientes, assim como a sua relação com variáveis sociodemográficas e de saúde.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo transversal, realizado nos Ambulatórios de Ensino e Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), na cidade de Passo Fundo – Rio Grande do Sul. Este estudo é um recorte do projeto de pesquisa institucionalizado na UFFS intitulado “Detecção de colonização por *Helicobacter pylori* em cavidade oral por técnica de reação em cadeia da polimerase”, aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da UFFS (CEP-UFFS), sob protocolo de aprovação número 4.527.806.

A população do estudo compreende pacientes maiores de 18 anos, de ambos os sexos, que se encontravam em espera para serem atendidos para qualquer tipo de consulta nos Ambulatórios de Ensino da UFFS no período de fevereiro de 2021 a agosto de 2023. Os pacientes que aguardavam atendimento foram abordados pela equipe de pesquisa e após convite e aceitação para participar na pesquisa, foram submetidos à entrevista, na qual responderam ao questionário de pesquisa e posteriormente foram submetidos à coleta de amostra da cavidade oral por meio de fricção da mucosa oral com escova de coleta estéril. A escova foi acondicionada em tubo estéril contendo solução tampão TET (Tris-EDTA-Tween) e conservada a temperatura de -20°C até a extração do DNA e detecção molecular de *H. pylori*. A amostra deste estudo é composta por todos os pacientes cuja amostra da cavidade oral resultou positiva para a presença de DNA de *H. pylori*.

Foram avaliadas as variáveis independentes socioeconômicas (local de residência, escolaridade, idade, sexo e número de pessoas no domicílio) e de saúde (tabagismo, endoscopia prévia, uso recente de Inibidores da Bomba de Prótons (IBP), dispepsia, pirose, náusea, vômitos, intolerância a café, intolerância a refrigerante e intolerância à pimenta). A variável categórica dependente (desfecho do presente estudo) foi a “presença do gene *cagA*”, avaliada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), conforme descrito a seguir.

A extração de DNA das amostras da cavidade oral foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFFS segundo o método de CTAB/clorofórmio/álcool isoamílico, descrito a seguir: Primeiramente, foi feita a adição de proteinase K à amostra em uma concentração final de 400µg/ul e, posteriormente, incubação a 56°C por 3-12h para a digestão do material, seguido da inativação da proteinase K por aquecimento a 96°C por 7 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µl de solução de NaCl 5M e 100µl da solução de CTAB/NaCl pré aquecida a 65°C, com posterior incubação a esta mesma temperatura por 10 minutos. Após a incubação, acrescentou-se 750 µl de clorofórmio - álcool isoamílico 24:1 e realizou-se a centrifugação por 5 minutos 12.000 rpm à temperatura ambiente (TA). Em seguida o sobrenadante foi transferido para novo tubo para a adição de 450 µl de etanol absoluto a - 20°C com posterior incubação por 10 minutos à TA para precipitação do DNA. Após a centrifugação por 15 minutos, 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 450 µl de etanol 70% ao “pellet” de DNA. Posteriormente, fez-se uma nova centrifugação por 15 minutos, 12.000 rpm a 4°C, o etanol 70% foi removido e as amostras ressuspensas em 50 µl de tampão TRIS/EDTA (TE) estéril para posterior utilização na detecção do DNA através das técnicas de PCR.

As reações de PCR e nested PCR para detecção molecular de *H. pylori* foram realizadas em volume final de 20µL, sendo 10µL da enzima Go Taq Green Master Mix 2X (cód. M 7122- Promega, Madison, Wisconsin, EUA); 0,6µL de cada primer previamente descrito¹¹ na concentração de 10µM; 4,8 µL de água estéril e 4µL de cada amostra pesquisada. As incubações foram realizadas em termociclador com os parâmetros adequados. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água estéril, e um controle positivo contendo DNA comercial extraído de *H. pylori*. A eficiência das amplificações foi monitorada por eletroforese da reação em gel de agarose 1,5%, preparado em tampão 1X TBE (Tris/Ácido Bórico/EDTA) e corada com Brometo de Etídio. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 500 pb e posteriormente fotografados sob transiluminação ultravioleta.

As amostras que resultaram positivas para DNA de *H. pylori* foram utilizadas neste estudo, e secundariamente analisadas utilizando os primers específicos (Quadro 1) previamente descritos¹² para amplificação do gene *cagA*, através da técnica de PCR convencional, a fim de identificar a presença deste.

Para a técnica empregada, as reações foram realizadas em volume final de 25µL, composto por 100ng de DNA, utilizando-se os reagentes do kit Go Taq Green Master Mix 2X (cód. M 7122- Promega, Madison, Wisconsin, EUA); 0,2µM de cada iniciador (primer). A amplificação foi realizada em termociclador seguindo os parâmetros descritos por Tirapattanun *et al.* (2016)¹². Os resultados foram analisados utilizando eletroforese e visualização sob transiluminação UV.

Quadro 1: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para amplificação do gene *ureA* para detecção de *H. pylori* e gene *cagA* em amostras de cavidade oral.

Gene	Primer forward	Primer reverse	Tamanho do produto
<i>ureA</i>	5'-CGT GGC AAG CAT GAT CCA T-3'	5'-GGG TAT GCA CGG TTA CGA GTT T-3'	77 pb
<i>cagA</i>	outer 5'-ACG ATT GGA ACG CCA CC-3' inner 5'-ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA GCG A-3'	outer 5'-CGC CAT TTG TAA CGC CTA-3' inner 5'-TTA GAA TAA TCA ACA AAC ATC ACG CCA T-3'	588 pb 297 pb

Os questionários com as respostas dos participantes, assim como os resultados moleculares das amostras foram duplamente digitados em um banco de dados no *software* Epidata (distribuição livre) e analisados estatisticamente no *software* de distribuição livre PSPP, sendo calculados a média e desvio padrão das variáveis numéricas e distribuição de frequências, absoluta e relativa, das variáveis categóricas. A análise da relação entre a variável dependente e as independentes foi realizada através do Teste exato de Fisher, considerando um nível de significância estatística de 95%.

RESULTADOS

Ao final do período de coleta dos dados, 219 indivíduos aceitaram participar da pesquisa, resultando em 67 amostras positivas para *H. pylori* (30,6%). Dentre as amostras positivas para *H. Pylori*, houve prevalência do sexo feminino (67,2%), residentes em zona urbana (82,1%) e média de idade de 51,4 anos ($\pm 15,04$). O número de pessoas que viviam no mesmo domicílio variou entre 1 e 6, com uma média de 2,85 pessoas ($\pm 1,03$). O consumo de álcool e o tabagismo tiveram uma prevalência de 49,3% e 43,3%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Características sociodemográficas e comportamentais de indivíduos com amostras positivas para *Helicobacter pylori* na cavidade oral. Passo Fundo, RS, fevereiro de 2021 a agosto de 2023 (n=67).

Variáveis	n	%
Sexo		
Masculino	22	32,8
Feminino	45	67,2
Faixa etária		
18-29	4	6,0
30-39	14	20,9
40-49	11	16,4
50-59	18	26,9
≥60	20	29,9
Escolaridade		
Até ensino fundamental	30	44,8
Ensino médio	33	49,3
Além do ensino médio	4	6,0
Local de residência		
Zona urbana	55	82,1
Zona rural	12	17,9
Número de pessoas no domicílio		
1 pessoa	4	6,0
2 pessoas	24	35,8
3 pessoas	21	31,3
4 ou mais	18	26,9
Tabagismo	29	43,3
Consumo de álcool	33	49,3

Em relação às características de saúde, como demonstrado na Tabela 2, o sintoma de pirose se mostrou presente em mais da metade (52,2%) dos entrevistados, seguido de dispepsia (29,9%). Náusea e vômitos frequentes foram menos prevalentes. A intolerância a café, refrigerante e pimenta teve uma prevalência de 23,0%, 19,6% e 16,4%, respectivamente. O uso recente de IBP foi referido por 29,5%.

Tabela 2. Características de saúde de indivíduos com amostras positivas para *Helicobacter pylori* na cavidade oral. Passo Fundo, RS, fevereiro de 2021 a agosto de 2023 (n=67).

Variáveis	n	%
Endoscopia prévia	27	40,3
Dispepsia	20	29,9
Pirose	35	52,2
Náusea	16	23,9
Vômitos frequentes	2	3,0
Intolerância a café (n = 61)	14	23,0
Intolerância a pimenta (n = 46)	9	19,6
Intolerância a refrigerante (n = 55)	9	16,4
Uso recente de IBP*	18	29,5

*IBP = inibidor da bomba de próton

O gene *cagA* foi detectado em 9 das 67 amostras, demonstrando uma prevalência de 13,4% na população estudada. As amostras consideradas positivas apresentaram fragmentos amplificados por reação de PCR em gel de agarose do tamanho de 297 pb, correspondentes à amplificação do gene, conforme mostrado na Figura 1.

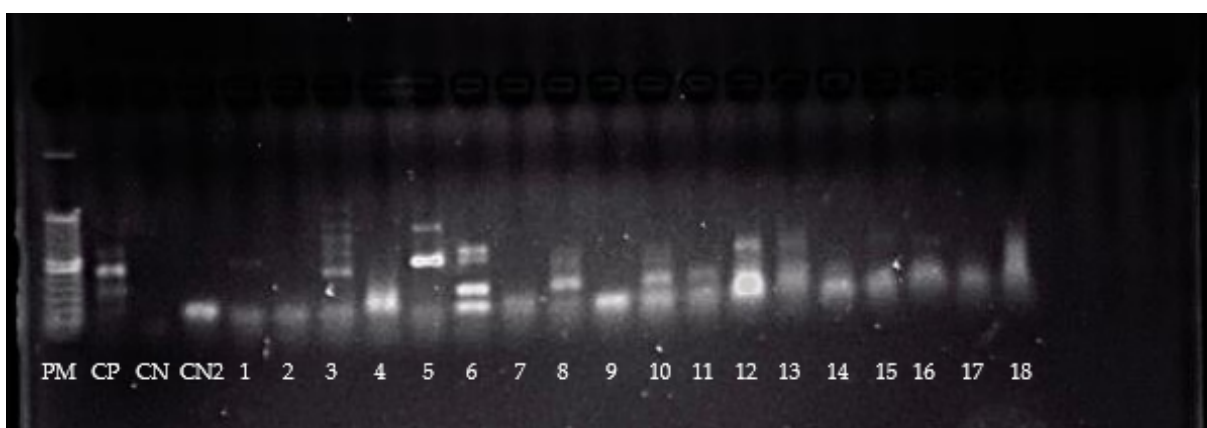


Figura 1. Gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo (5µL), após eletroforese para separação e visualização dos fragmentos amplificados por reação de PCR representativos do gene *cagA* de 18 amostras. (PM: marcador do peso molecular – *Invitrogen 50 pb DNA Ladder*; tamanho esperado do produto amplificado de 297 pb; CP: controle positivo; CN: controle negativo da primeira reação de PCR (inner); CN2: controle negativo da segunda reação de PCR (outer); linhas 1, 3, 5, 6, 12 e 13: amostras positivas).

Dentre as características de saúde avaliadas, observou-se de forma estatisticamente significativa uma maior distribuição de amostras de *H. pylori* positivas para o gene de virulência *cagA* em indivíduos que relataram apresentar náusea (37,5%, $p = 0,009$) – Tabela 4. Nenhuma relação foi observada (valores de $p > 0,05$) entre as demais características de saúde, sociodemográficas ou comportamentais e a presença do gene *cagA* (Tabela 4). Apesar disso, convém observar que todos os indivíduos (100,0%) provenientes de zona rural não apresentaram positividade para o gene estudado.

Tabela 3. Relação entre a positividade para o gene *cagA* e características sociodemográficas, comportamentais e de saúde em indivíduos com amostras positivas para *Helicobacter pylori* na cavidade oral. Passo Fundo, RS, fevereiro de 2021 a agosto de 2023. (n=67).

Variáveis	Positivo para <i>cagA</i>		Negativo para <i>cagA</i>		p*
	n	%	n	%	
Sexo					0,465
Masculino	4	18,2	18	81,8	
Feminino	5	11,1	40	88,9	
Faixa etária					0,824
18-29	1	25,0	3	75,0	
30-39	1	7,1	13	92,9	
40-49	2	18,2	9	81,8	
50-59	3	16,7	15	83,3	
≥60	2	10,0	18	90,0	
Escolaridade					0,775
Até ensino fundamental	4	13,3	26	86,7	
Ensino médio	4	12,1	29	87,9	
Além do ensino médio	1	25,0	3	75,0	
Local de residência					0,196
Zona urbana	9	16,4	46	83,6	
Zona rural	0	0,0	12	100,0	
Número de pessoas no domicílio					0,397
1 pessoa	1	25,0	3	75,0	
2 pessoas	1	4,2	23	95,8	
3 pessoas	4	19,0	17	81,0	
4 ou mais	3	16,7	15	83,3	
Tabagismo					1,000
Sim	4	13,8	25	86,2	
Não	5	13,2	33	86,8	
Consumo de álcool					0,734
Sim	5	15,2	28	84,8	
Não	4	11,8	30	88,2	
Endoscopia prévia					1,001
Sim	4	14,8	23	85,2	
Não	5	12,5	35	87,5	
Dispepsia					0,260

Sim	1	5,0	19	95,0	
Não	8	17,0	39	83,0	
Pirose					1,000
Sim	5	14,3	30	85,7	
Não	4	12,5	28	87,5	
Náusea					0,009
Sim	6	37,5	10	62,5	
Não	3	5,9	48	94,1	
Vômitos frequentes					0,252
Sim	1	50,0	1	50,0	
Não	8	12,3	57	87,7	
Intolerância a café (n=61)					1,040
Sim	2	14,3	12	85,7	
Não	6	12,8	41	87,2	
Intolerância a refrigerante (n=55)					0,585
Sim	0	0,0	9	100,0	
Não	7	15,2	39	84,8	
Intolerância à pimenta (n=46)					0,708
Sim	2	22,2	7	77,8	
Não	6	16,2	31	83,8	
Uso recente de IBP**					0,715
Sim	3	15,8	16	84,2	
Não	6	12,5	42	87,5	

* p = teste exato de Fisher; **IBP = inibidor da bomba de próton

DISCUSSÃO

A virulência da bactéria *Helicobacter pylori* está diretamente ligada a sua capacidade de danificar o epitélio gástrico humano. A citotoxina CagA, produzida pelo gene *cagA*, é amplamente estudada pelo aumento do risco de carcinogênese em função do dano celular causado na região do estômago⁷, além da alta prevalência deste gene na população¹⁰. Em razão disso, a presença de *cagA* na cavidade oral demonstra que esse sítio pode funcionar como um possível reservatório de cepas virulentas de *H. pylori*, com maior probabilidade de infecção dos indivíduos que as apresentam¹¹. Ressalta-se, no entanto, que a presença da bactéria na cavidade oral ainda não é bem esclarecida, e não se sabe se ela é capaz de colonizar este ambiente ou migrar para o estômago.

A amostra deste estudo compreendeu uma maioria de indivíduos do sexo feminino, o que é coerente com a literatura a respeito. Em uma pesquisa de Assumpção *et al.* (2010), realizada no Brasil, foi encontrada uma prevalência de 72,5% de mulheres com *H. pylori* em amostras da cavidade oral, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)¹⁰. Da mesma forma, Medina *et al.* (2010), na Argentina, observaram uma maioria feminina (55,5%¹²), sob a mesma técnica. Em relação à faixa etária, no entanto, não houve concordância com alguns dados da literatura. No presente estudo, a média de idade foi de 51,4 anos, o que se aproxima com o descrito por Medina *et al.* (48,5 anos)¹². Por outro lado, Assumpção *et al.* não analisaram a média de idade, e sim a prevalência de faixa etária categoricamente, encontrando uma maioria de 75,8% entre 40-59 anos e 58,8% entre 20-39 anos. Neste estudo, os pacientes entre 40-59 anos representaram 43,3% da amostra total e aqueles entre 18-39, 26,9%, ambos valores consideravelmente menores aos da pesquisa citada acima.

Neste estudo, a prevalência do gene *cagA* na cavidade oral dos indivíduos que eram positivos para o DNA de *H. pylori* foi de 13,4%, o que é semelhante a valores previamente descritos na literatura. Flores-Treviño *et al.* (2017), na Argentina e Sepúlveda *et al.* (2012), no Chile, encontraram uma prevalência de 21,7%⁹ e 16,7%¹³, respectivamente, ambos através de técnica de PCR, assim como nesta pesquisa. Em outro estudo na Argentina, de Medina *et al.* (2017), a prevalência encontrada foi de 45%¹⁴, no entanto, os participantes da pesquisa eram pacientes com sintomas dispépticos e indicação formal para a realização de endoscopia. Ao comparar com outros continentes, os resultados também são similares. Um estudo de Wang *et al.* (2002) nos Estados Unidos descreveu uma prevalência de 23% do gene *cagA* em amostras de saliva de pacientes positivos para *H. pylori* na cavidade oral¹⁵. Ainda em relação às características sociodemográficas, percebe-se que nenhum dos pacientes residentes em zona rural apresentou positividade para o gene estudado (apesar de $p > 0,05$), o que ainda não foi demonstrado em literatura. Uma possível explicação pode ser a menor concentração populacional nestas zonas, o que torna a contaminação via oral-oral reduzida em relação aos centros urbanos e, conseqüentemente, pode levar a uma menor variedade de cepas distribuídas nestes indivíduos.

Em razão da falta de dados na literatura sobre a presença de fatores de virulência de *H. pylori* na cavidade oral que abordam o uso de cigarro, este aspecto dos pacientes com positividade para *cagA* foram comparados às pesquisas de amostras de biópsia gástrica ou sorologia para o gene em questão. Dessa forma, observou-se que a maioria era não tabagista,

o que vai de encontro ao estudo de Lorenzo *et al.*, realizado através da análise da imunoglobulina G (IgG)¹⁶, porém discorda do achado de Santibáñez *et al.*, feito através da técnica de PCR em amostras de biópsia gástrica e que encontrou uma prevalência de tabagistas com positividade para o gene *cagA*¹⁷. Apesar disso, nenhum dos estudos apresentou uma explicação para tais achados, já que não há um mecanismo conhecido entre o tabagismo e a virulência de *H. pylori* em indivíduos que apresentam a bactéria.

Dentre as características de saúde estudadas, observou-se significância estatística entre o sintoma de náusea e a presença do *cagA*. Até o momento, a literatura a respeito da presença do gene na cavidade oral não conta com a descrição de sintomas. Entretanto, o estudo de Loffeld *et al.*, 2000, realizado através de sorologia para *cagA* em pacientes submetidos à endoscopia digestiva alta, encontrou uma prevalência estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de sintomas dispépticos em pacientes com IgG positivo para o gene, incluindo náusea¹⁸.

Alguns estudos demonstram que pode haver a coexistência da presença do gene de virulência da cepa de *H. pylori* no estômago e na cavidade oral, como demonstrado recentemente por Wongsuwanlert *et al.* (2024). Esses autores demonstraram ainda que mais de 50% das amostras foram positivas para o gene *cagA*, as quais foram encontradas mais em pacientes com câncer gástrico (21,0%) do que sem doença (15,8%) e gastrite (15,8%)¹¹. Nossa amostra não especifica condições gástricas específicas, no entanto, a presença de DNA de *H. pylori* com gene *cagA* na cavidade oral em participantes sintomáticos ou não demonstra que o método de análise neste local pode mostrar-se uma forma de rastreio não invasiva e eficiente, já que a presença do gene *cagA* torna a cepa bacteriana mais propensa a causar danos ao epitélio gástrico, trazendo maiores riscos ao paciente infectado. Além disso, também pode haver a possibilidade de transição da bactéria da boca para o estômago, e pacientes com amostra negativa para *H. pylori* em biópsia gástrica através de endoscopia podem ser infectados tardiamente. Ainda sob essa perspectiva, pacientes que receberam o tratamento de erradicação para *H. pylori* também poderiam ser reinfectados. Entretanto, ressalta-se que não há esclarecimento a respeito deste mecanismo na literatura atual.

CONCLUSÃO

Esta pesquisa demonstrou uma prevalência do gene *cagA* semelhante a outros estudos e encontrou uma associação estatisticamente significativa entre a presença do gene e o sintoma de náusea, que até então só foi descrita através da análise de sorologia. Ademais, a presença do *cagA* na cavidade oral foi relacionada a aspectos comportamentais e

sintomatologia que até então não haviam sido descritos na literatura. Cabe ressaltar, no entanto, que a amostra insuficiente limita as análises possíveis de serem feitas e as correlações com outros estudos. Além disso, o uso de amostras clínicas é uma limitação desta pesquisa, já que permite uma variabilidade na quantidade de DNA presente nas amostras e, consequentemente, pode resultar em falsos-negativos nas análises laboratoriais através da PCR.

REFERÊNCIAS

1. COELHO, Luiz Gonzaga Vaz *et al.* Diretrizes mundiais sobre *Helicobacter Pylori*. **World Gastroenterology Organisation**, [s. l.], 1 maio 2021.
2. SIAVOSHI, Farideh *et al.* Detection of *Helicobacter pylori*-Specific Genes in the Oral Yeast. **Helicobacter**, [s. l.], 5 ago. 2005.
3. WANG, XM *et al.* Oral *Helicobacter pylori*, its relationship to successful eradication of gastric H. pylori and saliva culture confirmation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, [s. l.], 1 ago. 2014.
4. SOUTO, Renata; COLOMBO, Ana Paula Vieira. Detection of *Helicobacter pylori* by Polymerase Chain Reaction in the Subgingival Biofilm and Saliva of Non-Dyspeptic Periodontal Patients. **Journal of Periodontology**, [s. l.], 1 jan. 2008.
5. IRANI, Soussan; ESFAHANI, Alireza Monsef; ZEREHPOUSH, Farahnaz Bidari. Detection of *Helicobacter pylori* in Oral Lesions. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, [s. l.], 22 jul. 2013.
6. AMIEVA, Manuel R.; EL-OMAR, Emad M. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. **Elsevier**, [s. l.], 31 dez. 2008.
7. NEJATI, Shima *et al.* Influence of *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], p. 43-48, 1 abr. 2018.
8. PROENÇA-MODENA, José Luiz; ACRANI, Gustavo Olszanski; BROCCHI, Marcelo. *Helicobacter pylori*: phenotypes, genotypes and virulence genes. **Future microbiology**, [s. l.], 4 mar. 2009.
9. FLORES-TREVIÑO, Carlos Eduardo *et al.* Molecular detection of *Helicobacter pylori* based on the presence of cagA and vacA virulence genes in dental plaque from patients with periodontitis. **Journal of Dental Sciences**, [S. l.], p. 163-170, 14 jun. 2019.
10. HOOI, James K Y *et al.* Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. **Gastroenterology**, [S. l.], p. 21-27, 8 ago. 2017.

11. RAMÍREZ-LÁZARO, María José *et al.* Real-Time PCR Improves *Helicobacter pylori* Detection in Patients with Peptic Ulcer Bleeding. **PLoS One**, [S. l.], 20 maio 2011.
12. TIRAPATTANUN, Aschana *et al.* DETECTION OF HELICOBACTER PYLORI AND VIRULENCE-ASSOCIATED GENES IN SALIVA SAMPLES OF ASYMPTOMATIC PERSONS IN NORTHEAST THAILAND. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, [S. l.], p. 22-216, 1 nov. 2016.
10. ASSUMPÇÃO, Mônica Baraúna *et al.* *Helicobacter pylori* in dental plaque and stomach of patients from Northern Brazil. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], p. 3033–3039, 28 jun. 2010.
11. WONGSUWANLERT, Mutita *et al.* “Prevalence and virulence factors of *Helicobacter pylori* isolated from oral cavity of non-disease, gastritis, and gastric cancer patients.” **Journal of dental sciences**. vol. 19,2 (2024): 1036-1043. doi: 10.1016/j.jds.2023.06.024
12. MEDINA, Myriam-Lucrecia *et al.* Molecular detection of *Helicobacter pylori* in oral samples from patients suffering digestive pathologies. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, [S. l.], p. 38-42, 1 jan. 2010.
13. SEPÚLVEDA, Ester *et al.* Comparison of *Helicobacter pylori* in oral cavity and gastric mucosa according to virulence genotype (*cagA* and *vacA* m1). **Revista chilena de infectología**, [S. l.], p. 278-283, 6 jun. 2012.
14. MEDINA, Myriam Lucrecia *et al.* Correlation between virulence markers of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric biopsies. **Arquivos de Gastroenterologia**, [S. l.], p. 100-201, 7 jul. 2017.
15. WANG, JIE *et al.* Comparison of Cytotoxin Genotypes of *Helicobacter pylori* in Stomach and Saliva. **Digestive Diseases and Sciences**, [S. l.], p. 1850–1856, 8 ago. 2002.
16. LORENZO, Irene *et al.* *Helicobacter pylori* seroprevalence in Spain: influence of adult and childhood sociodemographic factors. **European Journal of Cancer Prevention**, [S. l.], p. 294-303, 26 jul. 2019.
17. SANTIBÁÑEZ, Miguel *et al.* Relationship between tobacco, *cagA* and *vacA* i1 virulence factors and bacterial load in patients infected by *Helicobacter pylori*. **PLoS One**, [S. l.], p. 10-14, 20 mar. 2015.
18. LOFFELD, R. J. L. F. *et al.* Functional dyspepsia is associated with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, [S. l.], p. 351-355, 5 out. 2000.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A execução deste projeto atingiu os objetivos propostos, tendo estabelecido a prevalência do gene estudado e as características da população e encontrado uma relação entre a presença do *cagA* e o sintoma de náusea. Ademais, o perfil sociodemográfico da amostra foi concordante com outros estudos.

A temática desta pesquisa ainda é pouco explorada e necessita de mais literatura a respeito a fim de esclarecer a significância clínica da presença do DNA de *H. pylori* e dos genes de virulência desta bactéria na cavidade oral. Desta forma, pode ser possível compreender o papel da boca como reservatório para as cepas virulentas deste microorganismo, o que pode possibilitar a reinfecção do hospedeiro após tratamento para *H. pylori*. Além disso, caso comprovada a coexistência das cepas virulentas na boca e no estômago, de forma concomitante, a análise de amostra da cavidade oral pode mostrar-se uma forma eficiente e não invasiva de rastreio.

Espera-se, com o presente estudo, contribuir com a literatura atual sobre o tema e inspirar novas descobertas a respeito. Ademais, salienta-se a importância da continuidade do projeto “AVALIAÇÃO DE GENÓTIPO DE VIRULÊNCIA DE *Helicobacter pylori* EM AMOSTRAS DE CAVIDADE ORAL”, do qual esta pesquisa é derivada, a fim de ampliar o tamanho amostral e possibilitar novas análises.