



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS**

LIDIANE FERRAZ SANDES

**ANÁLISE DA METILAÇÃO DO DNA EM AMOSTRAS
GÁSTRICAS E ASSOCIAÇÃO COM INFECÇÃO POR
*Helicobacter pylori***

Vitória da Conquista, BA
2025

LIDIANE FERRAZ SANDES

**ANÁLISE DA METILAÇÃO DO DNA EM AMOSTRAS
GÁSTRICAS E ASSOCIAÇÃO COM INFECÇÃO POR
*Helicobacter pylori***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cintia Rodrigues Marques Universidade Federal da Bahia – UFBA

Co-orientador: Prof^o. Dr^o. Thiago Magalhães da Silva Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB

Vitória da Conquista, BA
2025

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – SIBI/UFBA

S216

Sandes, Lidiane Ferraz.

Análise da metilação do DNA em amostras gástricas e associação com infecção por *Helicobacter pylori* / Lidiane Ferraz Sandes. -- Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2025.

73 f.: il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cintia Rodrigues Marques

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Magalhães da Silva

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biociências) - Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2025.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Gastropatias. 3. Metilação I. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Marques, Cintia Rodrigues. III. Silva, Thiago Magalhães da IV. Título.

CDU: 616.33(043.3)

LIDIANE FERRAZ SANDES

“Análise da metilação do DNA em amostras gástricas e associação com infecção por *Helicobacter pylori*”

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 11/07/2025

Cintia R. Marques

Profª. Dr.ª Cintia Rodrigues Marques (Orientadora)
(Universidade Federal da Bahia)

Leandro Freitas

Prof. Dr. Leandro Martins de Freitas (Examinador)
(Universidade Federal da Bahia)

Patrícia S. Lima

Prof.ª Dr.ª Patrícia Santos Pereira Lima (Examinadora)
(Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia)

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, por me dar forças nos momentos mais dificeis e por conduzir cada passo desta caminhada. Sem Ele, nada sou.

Aos meus filhos, os presentes mais valiosos que já ganhei na vida. Que este esforço sirva de inspiração para que também corram atrás dos seus sonhos. Nunca desistam no meio do caminho.

Aos meus pais, por serem meu alicerce, por acreditarem em mim, pelas orações e por todo o suporte que deram desde o início.

Ao meu esposo, por relevar as luzes acesas madrugada adentro, por compreender as ausências aos finais de semana e nas comemorações, por sonhar junto comigo, pela paciência e incentivo durante todo o percurso.

À minha irmã e sua família, por entenderem, torcerem e respeitarem os momentos de ausência.

À Maíra, que, mesmo sem saber, me inspirou a iniciar este processo e mostrou, com seu exemplo, que eu também seria capaz de chegar ao final dele. E à Isamar, que, além do exemplo de força e dedicação, foi suporte durante toda a trajetória, seja com palavras, gestos ou cuidado comigo e com meus filhos.

Aos tios Jamil e Barbosa (in memoriam), por acreditarem que este sonho se tornaria realidade, sempre incentivando e abençoando quando possível.

Às amigas Paulinha, Renata, Carol e Jamile, pelas palavras de apoio e pelo ombro amigo sempre que precisei.

À grande amiga que a universidade me deu: Iasmin. Sem ela, com certeza, este trabalho não teria sido realizado.

Às minhas cunhadas Isa e Isalva, e às suas famílias, pelas palavras de incentivo diárias, pelas orações, pelo carinho, torcida, apoio e cuidado ao longo dessa jornada. E, em especial, aos meus sogros (Painho e Mainha), que não mediram esforços para tornar possível a concretização deste trabalho, proporcionando tudo o que precisei dos dias mais tranquilos aos mais dificeis. Sozinha, eu não teria conseguido, jamais!

Aos meus amigos e familiares, que torceram e incentivaram desde o início.

— “Porque dEle, e por meio dEle, e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente. Amém!” – Rm 11:36

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me conceder força, sabedoria e direção ao longo desta jornada, especialmente nos momentos mais desafiadores.

À minha orientadora, Cintia, pelas contribuições fundamentais ao longo do desenvolvimento deste trabalho e por todo o apoio acadêmico e pessoal, sempre com paciência, generosidade e compreensão. Ao meu coorientador, Thiago, pelo suporte técnico e científico, pelas sugestões valiosas, pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos e, igualmente, pela paciência e sensibilidade ao longo dessa caminhada.

À UFBA - IMS, e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências (PPGBio), pela oportunidade de formação, estrutura e suporte institucional.

À CAPES e à FAPESB, pelo apoio financeiro que tornou possível a realização desta pesquisa.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da FOP/UNICAMP, na pessoa da Prof.^a Dr^a. Ana Paula de Souza, por aceitar a parceria com generosidade, por disponibilizar seu tempo e expertise para me ensinar a parte técnica da metilação envolvida neste estudo, e por fornecer o suporte de sua equipe. Sua colaboração foi essencial para a concretização deste trabalho.

À querida Iasmin, pela amizade, companheirismo, incentivo e ajuda constante — sem você, o projeto não teria iniciado e o caminho percorrido teria sido muito mais difícil. Às colegas Amanda, Isabele e Deise, pela valiosa colaboração nas coletas, nas análises de dados e em tantos outros momentos importantes deste processo.

A todos os amigos e familiares que torceram por mim, apoiaram e acreditaram desde o início, meu profundo agradecimento. Cada palavra de incentivo fez diferença.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo meu sincero muito obrigada!

**"Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês", diz o Senhor,
"planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês
esperança e um futuro."**

— Jeremias 29:11

SANDES, Lidiane Ferraz. Análise da metilação do DNA em amostras gástricas e associação com infecção por *Helicobacter pylori*. xx f. il. 2025. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2025.

RESUMO

A infecção por *Helicobacter pylori* é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de alterações inflamatórias e neoplásicas no estômago, contribuindo para a patogênese de doenças gástricas, em especial no contexto epigenético. Este estudo experimental teve como objetivo examinar o perfil de metilação dos genes *IL6*, *SOCS1*, *MGMT* e *MLH1* em amostras de mucosa gástrica, considerando a presença da infecção por *H. pylori* e a detecção do gene de virulência *cagA*. As amostras foram submetidas à extração de DNA, seguido de conversão com bissulfito de sódio e análise da metilação por meio da técnica MS-HRM. A metilação do gene *IL6* foi categorizada em 0-25% e 25-50%, incluindo estratificação por sexo, idade e status da cepa. Para essas análises foram aplicados o teste *t*-Student para comparar os níveis médios de metilação entre os grupos *H. pylori* positivo e negativo, e os testes qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando apropriado, considerando o valor de $p < 0,05$ para as associações com variáveis categóricas. Os resultados indicaram que indivíduos infectados apresentaram o dobro de chance de exibir metilação moderada no gene *IL6* em comparação aos não infectados ($OR = 2,00$; IC95%: 0,56-7,62; $p = 0,284$), e que pacientes com cepas *cagA*-positivas tiveram risco aumentado em relação aos *cagA*-negativos ($OR = 1,56$; IC95%: 0,41- 5,85; $p = 0,508$), embora sem significância estatística. Em homens, a associação foi significativa ($p = 0,035$), com 100% dos infectados apresentando metilação moderada, em contraste com 40% dos não infectados; entre mulheres, não houve diferença relevante ($p = 0,765$). A metilação dos genes *SOCS1* e *MLH1* não foi detectada em nenhuma amostra, independente do status infeccioso, enquanto *MGMT* apresentou metilação em apenas três indivíduos (6,82%), todos com níveis baixos, o que inviabilizou análise estatística. Embora as associações com o gene *cagA* não tenham alcançado significância estatística, foi observado que todos os homens com cepas *cagA*-positivas apresentaram perfil de metilação moderada. Esses achados sugerem que a infecção por *H. pylori* pode modular a metilação do gene *IL6*, especialmente em homens, e reforçam o papel da epigenética na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na inflamação e progressão das doenças gástricas, especialmente em populações de alta prevalência.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*; Metilação; *IL6*; MS-HRM.

ABSTRACT

Helicobacter pylori infection is a significant risk factor for the development of inflammatory and neoplastic changes in the stomach, contributing to the pathogenesis of gastric diseases, particularly through epigenetic mechanisms. This experimental study aimed to examine the DNA methylation profile of the *IL6*, *SOCS1*, *MGMT*, and *MLH1* genes in gastric mucosal samples, considering the presence of *H. pylori* infection and the detection of the virulence gene *cagA*. Samples underwent DNA extraction, followed by sodium bisulfite conversion and analysis using the MS-HRM technique. *IL6* methylation was categorized into 0-25% and 25-50%, with stratification by sex, age, and bacterial strain status. Statistical analyses included the Student's *t*-test to compare mean methylation levels between *H. pylori*-positive and -negative groups, and chi-square or Fisher's exact test, as appropriate, considering $p < 0.05$ as the significance threshold for associations between categorical variables. The results indicated that infected individual were twice as likely to exhibit moderate methylation of the *IL6* gene compared to non-infected individuals ($OR = 2.00$; 95% CI: 0.56–7.62; $p = 0.284$), and those infected with *cagA*-positive strains had a higher risk compared to those with *cagA*-negative strains ($OR = 1.56$; 95% CI: 0.41–5.85; $p = 0.508$), although these differences were not statistically significant. Among men, a significant association was observed ($p = 0.035$), with 100% of infected individuals showing moderate methylation versus 40% in the non-infected group; no significant difference was found among women ($p = 0.765$). Methylation of the *SOCS1* and *MLH1* genes was not detected in any of the samples, regardless of infection status, while *MGMT* methylation was observed in only three individuals (6.82%), all at low levels, preventing statistical analysis. Although no statistically significant association was observed with *cagA* status, all men infected with *cagA*-positive strains exhibited moderate methylation. These findings suggest that *H. pylori* infection may modulate *IL6* gene methylation, particularly in males, and underscore the role of epigenetic mechanisms in the molecular pathways underlying gastric inflammation and disease progression, especially in high-prevalence populations.

Keywords: *Helicobacter pylori*; DNA methylation; *IL6*; MS-HRM.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	<i>Helicobacter pylori</i> -----	3
Figura 2	Taxa de incidência padronizada por idade (ASIR) de câncer atribuível à infecção por <i>Helicobacter pylori</i> em 2018-----	7
Figura 3	Sistema de secreção do tipo IV da <i>Helicobacter pylori</i> -----	8
Figura 4	Fenótipos e variações da proteína CagA em <i>Helicobacter pylori</i> -----	9
Figura 5	Representação esquemática da colonização da mucosa gástrica por <i>Helicobacter pylori</i> e seus principais mecanismos patogênicos-----	11
Figura 6	Representação esquemática das respostas Th associadas à colonização por <i>Helicobacter pylori</i> -----	12
Figura 7	Representação esquemática da ativação da via JAK/STAT induzida pela infecção por <i>Helicobacter pylori</i> -----	14
Figura 8	Efeitos da infecção por <i>Helicobacter pylori</i> sobre a regulação epigenética em células epiteliais gástricas-----	16
Figura 9	Alterações moleculares em epigenótipos-----	20
Figura 10	Curvas de fusão dos controles de metilação obtidas por MS-HRM -----	44
Figura 11	Curvas de fusão representativas de amostras positivas para metilação.-----	45
Figura 12	Curvas de fusão representativas de amostras negativas para metilação -----	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Primers específicos usados para genotipagem de <i>H. pylori</i> por PCR em tempo real (qPCR) -----	24
Tabela 2	Componentes da reação com bissulfito-----	24
Tabela 3	Condições do termociclador para conversão com bissulfito-----	25
Tabela 4	Sequência dos primers específicos utilizados no MS-HRM-----	26
Tabela 5	Protocolo de ciclagem para análise HRM no LightCycler 480 (Roche)-----	26
Tabela 6	Preparo dos controles iniciais-----	26
Tabela 7	Preparo dos controles finais-----	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1 <i>Helicobacter pylori</i>.....	2
2.1.1. Aspectos gerais da bactéria.....	2
2.1.2. Epidemiologia da Infecção por <i>H. pylori</i>	4
2.1.4. Fatores de Virulência (<i>cagA</i>).....	9
2.2. Resposta Imune e Inflamação Gástrica na Infecção por <i>H. pylori</i>.....	11
2.3. Metilação do DNA e Regulação Epigenética.....	16
2.4. O Papel da Metilação na Resposta Inflamatória e Reparação do DNA	18
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos Específicos.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS DETALHADOS.....	22
4.1. Casuística (Caracterização da População e Desenho do Estudo).....	22
4.1.1. Critérios de positividade para <i>Helicobacter pylori</i>	23
4.2. Teste da Urease Pré-Formada	23
4.3. Cultura Microbiológica	23
4.4. Coleta da Amostra Biológica para Investigação Genética.....	23
4.5. Extração do Material Genético.....	23
4.5.1 Quantificação de DNA.....	24
4.6. Análise Genética.....	24
4.7. Análise a Metilação.....	24
4.7.1. Tratamento e purificação do DNA com bissulfito	25
4.7.2. MS-HRM (Methylation-Sensitive High Resolution Melting).....	26
4.8. Análise Estatística.....	29
REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO 1.....	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
ANEXOS.....	57

1. INTRODUÇÃO

A infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) representa um dos principais desafios de saúde pública global, sendo considerada uma das infecções bacterianas crônicas mais comuns em humanos. Sua prevalência é elevada em países em desenvolvimento, como regiões da África, América Latina e Caribe, estando associada a fatores socioeconômicos e ambientais (AYA UKA et al., 2023). No Brasil, estudos apontam variação regional nas taxas de infecção, onde as taxas mais altas se apresentam em populações expostas a condições precárias de saneamento e menor escolaridade na infância (COSTA et al., 2021).

A descoberta do *H. pylori* ocorreu em 1983, quando Berry Marshall e Robin Warren observaram, pela primeira vez, em amostras de biópsia gástrica de pacientes com gastrite crônica ativa, a presença de bacilos curvos, propondo que uma bactéria poderia estar envolvida na origem de doenças gástricas inflamatórias e ulcerativas (WARREN; MARSHALL, 1983). Essa hipótese transformou o entendimento da fisiopatologia gastrointestinal, levando ao reconhecimento da bactéria como agente carcinógeno do Grupo 1 pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) em 1994 (IARC WORKING GROUP, 1994).

H. pylori é uma bactéria gram-negativa, espiralada, microaerófila, com múltiplos flagelos polares que favorecem sua adaptação ao ambiente ácido do estômago. A infecção geralmente ocorre na infância, e sua transmissão ocorre por vias oral-oral e fecal-oral, favorecida por condições de higiene inadequadas, falta de acesso à água potável e superlotação domiciliar (HUNT et al., 2011). Uma vez estabelecida, a colonização persiste ao longo da vida na ausência de tratamento, e o *H. pylori* assume posição dominante no microbioma gástrico, chegando a representar 70% a 95% das bactérias detectadas no estômago humano (COVER; BLASER, 2009). A infecção por *H. pylori*, em conjunto com fatores genéticos e ambientais, está fortemente associada ao desenvolvimento de gastrite crônica, úlceras pépticas, linfoma do tecido linfoide associado à mucosa (MALT) e adenocarcinoma gástrico (COELHO et al., 2018).

Sua patogenicidade envolve diferentes mecanismos, como produção de urease, motilidade através dos flagelos e proteínas de adesão, além de fatores de virulência específicos, como VacA e CagA. O principal fator de virulência, o gene associado à citotoxina A (*cagA*), presente em cepas associadas a maior potencial patogênico, codifica uma oncoproteína capaz de alterar vias de sinalização intracelular no hospedeiro, como SHP-2, MAPK, PI3K/AKT e Wnt/β-catenina, além de induzir estresse oxidativo, proliferação celular

e modulação da resposta imune (OLIVEIRA et al., 2024; POLK; PEEK, 2010). A resposta inflamatória promovida pela infecção é mediada por citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e IL-17, cuja liberação altera o ambiente da mucosa gástrica e favorece alterações celulares pré-malignas (COELHO et al., 2018; COVER; BLASER, 2009).

Além da inflamação crônica, a infecção por *H. pylori* também induz alterações epigenéticas, especialmente a metilação do DNA, que pode silenciar genes reguladores do ciclo celular, da resposta imune, da reparação do DNA e genes supressores tumorais. Esse mecanismo ocorre ainda na fase inicial, sendo observada em lesões não neoplásicas e podendo persistir mesmo após a erradicação bacteriana, configurando um evento relevante na carcinogênese gástrica (CAPPARELLI; IANNELLI, 2022; OLIVEIRA et al., 2024). Nesse contexto, a análise da metilação dos genes *IL6*, *SOCS1*, *MGMT* e *MLH1* em amostras gástricas pode fornecer conhecimento sobre os mecanismos moleculares da patogênese induzida por *H. pylori*, contribuindo para a identificação de marcadores epigenéticos de risco e para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico precoce e prevenção de patologias que podem evoluir para o carcinoma gástrico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Helicobacter pylori*

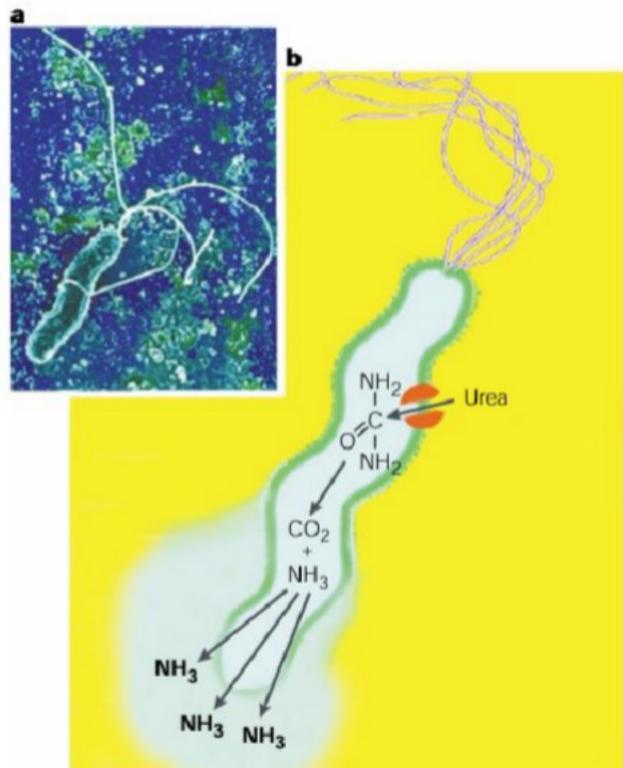
2.1.1. Aspectos gerais da bactéria

Os mecanismos de adaptação do *H. pylori* ao ambiente gástrico envolvem características estruturais e bioquímicas que garantem sua colonização e persistência. A morfologia helicoidal, combinada à presença de um a seis flagelos polares com aproximadamente 3 μm de comprimento, facilita a penetração através da camada de muco até alcançar a superfície das células epiteliais gástricas (BARBOSA; SCHINONNI, 2011; WASKITO; SALAMA; YAMAOKA, 2018). Esse movimento é essencial para a sobrevivência bacteriana ao ambiente ácido do estômago (COSTA et al., 2021).

Outro fator determinante é a produção da enzima urease, que catalisa a hidrólise da uréia em amônia e CO₂, induzindo a alcalinização local e contribuindo para a neutralização da acidez estomacal (BAJ et al., 2021; BARBOSA; SCHINONNI, 2011) (Figura1). Além da urease, a bactéria secreta outras toxinas associadas à sua patogenicidade, capazes de causar danos ao DNA, alterações epigenéticas como a hipermetilação de promotores gênicos, além de favorecerem a colonização e nutrição bacteriana (BAJ et al., 2021). Os danos celulares

decorrentes dessas alterações estão associadas a gastrite atrófica crônica, acloridria, metaplasia intestinal, úlcera péptica, linfoma MALT e câncer gástrico (KHUDAIBERGANOVA et al., 2025; TOH; WILSON, 2020).

Figura 1 - *Helicobacter pylori*



a. Micrografia eletrônica. b. representação esquemática da morfologia da bactéria, destacando os flagelos polares, a urease, o canal da ureia ativado por H⁺ e a produção de amônia, que neutraliza o ambiente ácido (amarelo) ao redor da bactéria, criando um ambiente mais neutro (azul claro) em sua proximidade. Fonte: Adaptado de Montecucco; Rappuoli (2001).

Apesar de ter sido isolada pela primeira vez em tecido gástrico em 1983 por Warren e Marshall (IARC WORKING GROUP, 1994), evidências arqueológicas indicam que *H. pylori* infecta humanos há mais de 5.300 anos, acompanhando a evolução da espécie humana (COSTA et al., 2021). A infecção promove o recrutamento de células inflamatórias, processo facilitado pela alcalinização mediada pela urease e pela motilidade bacteriana (TOH; WILSON, 2020). A capacidade de adesão bacteriana à mucosa gástrica varia conforme a cepa e a interação com os receptores específicos do hospedeiro, o que influencia diretamente na ocorrência e gravidade da doença (KHUDAIBERGANOVA et al., 2025). A virulência da

bactéria está fortemente associada a fatores genéticos específicos, como a proteína citotóxica CagA, codificada pelo gene *cagA*, além de estar relacionada a elementos moduladores da resposta do hospedeiro, como os níveis de antioxidantes, especialmente a vitamina C (AMIEVA; PEEK, 2016; TOH; WILSON, 2020). O mecanismo de dano envolve a indução de citocinas pró-inflamatórias, como IL-8, IL-1 β e TNF- α (KHUDAIBERGANOVA et al., 2025).

Após a colonização, *H. pylori* pode se associar às células epiteliais e penetrar nas glândulas gástricas, afetando diretamente células precursoras. A capacidade da bactéria e de sua oncoproteína CagA de interferirem na programação celular, por meio da ativação desregulada de vias como SHP-2, Ras-MAPK e PI3K/Akt, além da desorganização da arquitetura epitelial, demonstra a complexa interação entre *H. pylori* e as células progenitoras na mucosa gástrica (AMIEVA; PEEK, 2016). Diante de seu potencial patogênico, o diagnóstico preciso da infecção é fundamental para o sucesso terapêutico e a erradicação do patógeno (COSTA et al., 2021). A transmissão entre humanos ocorre principalmente por via fecal-oral ou oral-oral, sendo evidenciada pela presença da bactéria na saliva, vômitos, refluxo gástrico e fezes (KHUDAIBERGANOVA et al., 2025).

2.1.2. Epidemiologia da Infecção por *H. pylori*

Sabe-se que a infecção por *H. pylori* é amplamente disseminada, afetando mais de 50% da população mundial, embora sua prevalência varie significativamente entre diferentes países e regiões (PARK et al., 2018). Estima-se que no mundo, aproximadamente 4,4 bilhões de pessoas sejam acometidas pela infecção do *H. pylori*, tendo maior incidência na América Latina, Caribe e África (COSTA et al., 2021). Alguns fatores influenciam essa distribuição, incluindo condições socioeconômicos, ambientais, culturais e genéticos. Dentre esses destaca-se a idade, etnia e saneamento básico, que pode ser atribuído às formas de transmissão da bactéria, especialmente a via fecal-oral e oral-oral (MACHADO et al., 2022). A cavidade bucal também tem sido considerada um reservatório importante para reinfecção (COSTA et al., 2021).

De acordo com o IV Consenso Brasileiro sobre *H. pylori*, a infecção pode acometer indivíduos de todas as faixas etárias, sendo mais prevalente em populações com baixo nível de escolaridade e acesso limitado ao saneamento básico (COELHO et al., 2018). Um estudo realizado em Minas Gerais, por OLIVEIRA (2019), demonstrou por georreferenciamento que cerca de 70% dos casos positivos para infecção do *H. pylori* estavam situados próximos a cursos d'água, sugerindo a água como meio de transmissão. Nessa população, 59% dos

indivíduos utilizavam fossas rudimentares como esgoto doméstico e 61% consumiam água proveniente de poços rasos, condições altamente propensas à contaminação. Com isso, a prevalência observada entre os indivíduos sintomáticos que apresentaram resultado positivo para infecção foi de 68,65%.

Em contrapartida, um estudo realizado na região Sul do Brasil, em 2022, apresentou prevalência de apenas 26%, valor semelhante ao observado em países desenvolvidos e que contrasta com a média nacional de aproximadamente 60%. Em países em desenvolvimento, crianças com até 10 anos de idade, apresentam prevalência de 70%, demonstrando uma rápida taxa de aquisição na infância e o aumento cumulativo com a idade. No Brasil, as taxas em crianças residentes em áreas de baixo status socioeconômico variam entre 70% e 90%. Por exemplo, no estado do Piauí, a prevalência de *H. pylori* em crianças com elevado padrão socioeconômico foi de 16,4%, contrastando com as crianças residentes em favelas e condições precárias de vida que apresentaram a taxa de 55,0% (MACHADO et al., 2022). Ainda nesse estudo, observou-se prevalência de até 96,7% entre adultos assintomáticos na região Amazônica, confirmando a ampla disseminação da infecção.

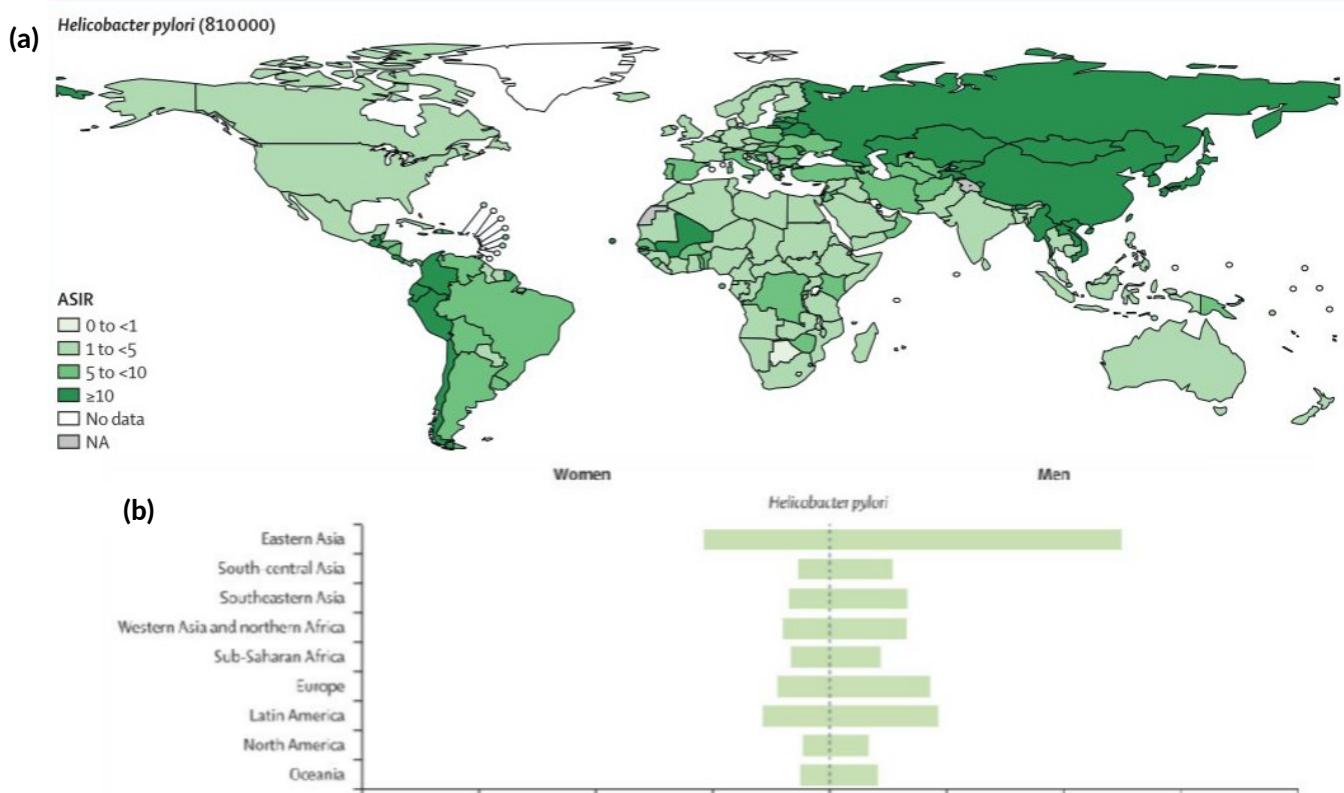
A infecção por *H. pylori* também tem sido associada a lesões precursoras do câncer gástrico. No estudo de MACHADO et al. (2022), foi observado que entre os indivíduos infectados, 34% apresentavam gastrite crônica, 1% gastrite atrófica, 0,44% metaplasia intestinal e 0,19% adenocarcinoma. De fato, estima-se que 79% dos novos casos de câncer gástrico no mundo estejam associados à infecção por *H. pylori* (PARK et al., 2018). A Organização Mundial da Saúde considera *H. pylori* um agente cancerígeno do tipo 1, sendo o principal fator etiológico do câncer gástrico. Estudos indicam que a infecção pode aumentar o risco de desenvolvimento da doença entre 2,2 e 2,1 vezes (MAEKITA et al., 2006). Ainda segundo o mesmo estudo, mesmo entre indivíduos não infectados, níveis elevados de metilação do DNA na mucosa gástrica foram observados em casos de câncer, o que demonstra a importância das alterações epigenéticas como marcador de risco.

A gravidade da infecção por *H. pylori* está associada ao aumento do risco de câncer gástrico e pode refletir, de forma acumulativa, os impactos de fatores relacionados à história de vida do indivíduo, como o tabagismo. Esses fatores deixam marcas permanentes no epigenoma e contribuem para formação de um campo epigenético favorável à carcinogênese (USHIJIMA; HATTORI, 2012). Adicionalmente, dados do GLOBOCAN estimam que, em 2018, cerca de 810 mil novos casos de câncer gástrico em todo o mundo foram atribuídos à infecção por *H. pylori*, sendo a carga mais elevada registrada no Leste Asiático, seguida pela América Latina e o leste da Europa (DE MARTEL et al., 2020), como demonstrado na figura

2. No Brasil, o INCA (Instituto Nacional do Câncer), estima, para cada ano do triênio 2023-2025, aproximadamente 21.480 novos casos de câncer de estômago, com risco estimado de 9,94/100.000 casos, sendo a maior incidência sobre os homens (12,63/100 mil) do que em mulheres (7,36/100 mil). Em 2020, foram registrados 13.850 óbitos pela doença com taxas de 8,47/100.000 homens e 4,69/100.000 mulheres. No cenário global, foi o quinto câncer mais incidente, com maior prevalência na Ásia Oriental, Europa Central, América do Sul e Polinésia (INCA, 2022).

Por fim, (XI et al., 2023) destacam que a infecção por *H. pylori* está entre os principais fatores de risco modificáveis para o câncer gástrico em escala global, ao lado da dieta rica em sal e do tabagismo. Sua ampla prevalência, potencial carcinogênico e persistência molecular mesmo após erradicação justificam sua inclusão em programas de rastreamento e prevenção, especialmente em regiões com alta incidência da doença.

Figura 2 - Taxa de incidência padronizada por idade (ASIR) de câncer atribuível à infecção por *Helicobacter pylori* em 2018

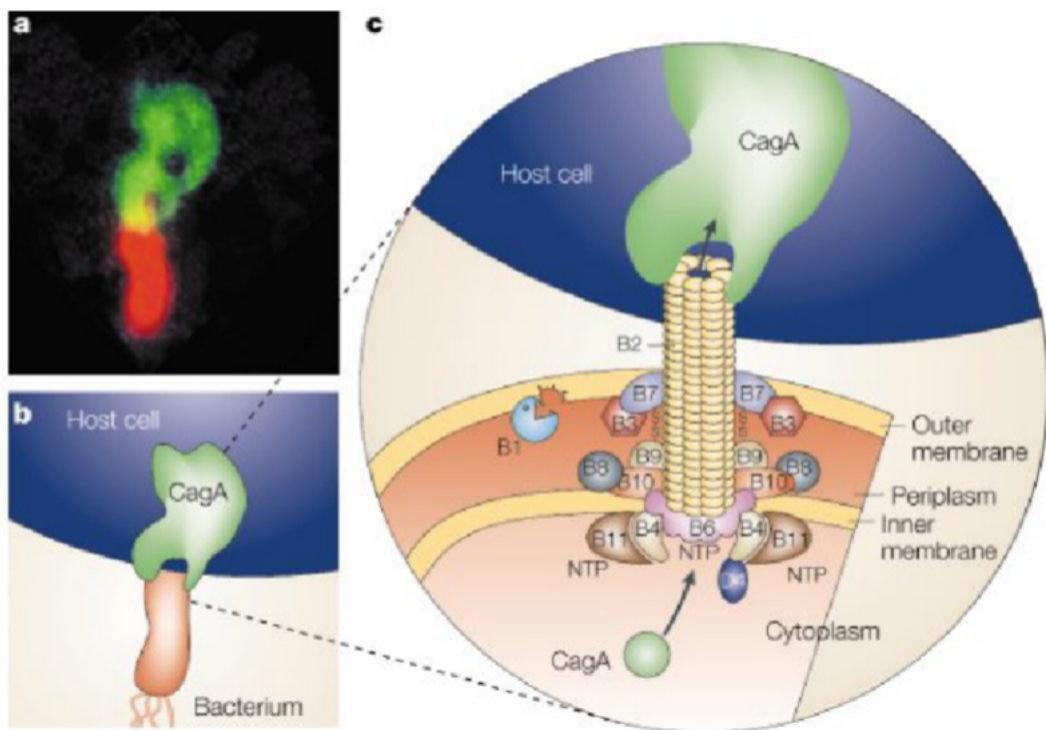


(a) Por país (por 100.000 pessoas-ano); (b) Segundo sexo e regiões geográficas. Fonte: Adaptado de DE MARTEL et al. (2020)

2.1.3. Mecanismos de colonização e persistência

A adesão da bactéria *H. pylori* às células epiteliais do hospedeiro ocorre por diversas adesinas como BabA, SabA, AlpA/B e OipA, que reconhecem estruturas glicídicas presentes nas mucinas e glicolipídeos da superfície celular. Essa interação íntima é essencial para a fixação estável da bactéria na mucosa gástrica (BAJ et al., 2021; BARBOSA; SCHINONNI, 2011; KUSTERS; VAN VLIET; KUIPERS, 2006). Além das adesinas clássicas, outras proteínas de membrana externa contribuem para a formação de biofilme e participam da modulação da resposta imune, favorecendo a inflamação crônica e a evasão do sistema de defesa do hospedeiro (BARBOSA; SCHINONNI, 2011). A ligação eficiente da bactéria ao epitélio gástrico também permite o funcionamento do complexo de secreção tip IV (T4SS) (Figura 3), uma estrutura multiproteica que atua de maneira semelhante a um pilus e é codificada pela ilha de patogenicidade cag PAI (cytotoxin-associated gene pathogenicity island). Esse sistema é responsável pela translocação da oncoproteína CagA para o interior das células epiteliais. Um vez inserida, a CagA atua como proteína hub, interagindo com diversas proteínas sinalizadoras do hospedeiro, como SHP2 e PAR1/MARK, desencadeando alterações na polaridade celular e favorecendo processos associados à transformação neoplásica (HATAKEYAMA, 2017).

Figura 3 - Sistema de secreção do tipo IV da Helicobacter pylori



A imagem (a) mostra *H. pylori* (vermelho) injetando a proteína CagA (verde) para o interior da célula hospedeira. As representações esquemáticas (b e c) ilustram o processo de injeção mediado por uma estrutura semelhante a um pilus, que atravessa a membrana bacteriana e interage com a membrana da célula hospedeira.

Fonte: Adaptado de Montecucco e Rappuoli (2001).

Outro fator importante para a colonização eficiente é a motilidade conferida pelos flagelos unipolares do *H. pylori*, que juntamente com a quimiotaxia, permitem que a bactéria penetre através da camada de muco gástrico e alcance as células epiteliais. Esse deslocamento direciona a bactéria ao nicho epitelial, favorecendo a adesão e a injeção de CagA via T4SS, contribuindo para a persistência da infecção (BAJ et al., 2021; BARBOSA; SCHINONNI, 2011).

Além dos fatores *cagA* e *vacA*, o *H. pylori* secreta enzimas como urease, que estimula a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos, inibe a opsonização e estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-8, TNF α , promovendo um ambiente inflamatório que favorece o desenvolvimento da gastrite crônica (BARBOSA; SCHINONNI, 2011). Outras enzimas como proteases e lipases contribuem para a degradação da barreira epitelial, permitindo maior aderência da bactéria ao tecido infectado e evasão do sistema imune.

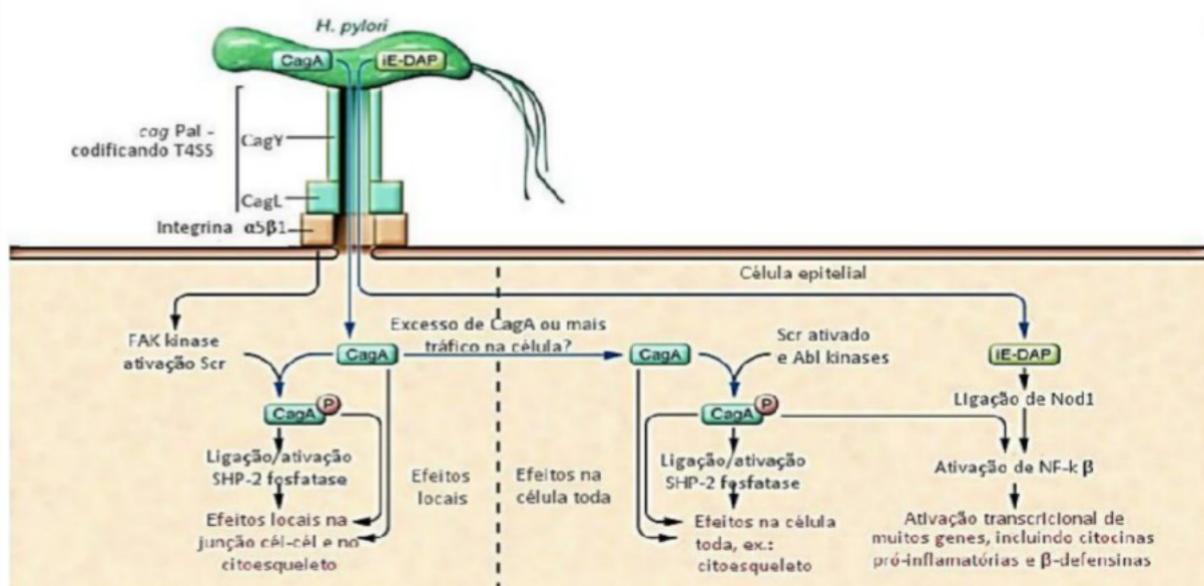
A diversidade genotípica entre as cepas de *H. pylori*, bem como diferenças nos perfis de biotipagem, explicam a variabilidade observada na resposta inflamatória e na persistência da infecção entre diferentes indivíduos (LIMA; RABENHORST, 2009). Além disso, o *H. pylori* regula mecanismos celulares do hospedeiro, como inflamação, apoptose e reparo

tecidual, por meio de toxinas como VacA e pela modulação da expressão gênica (TOH; WILSON, 2020). Fatores exógenos, incluindo a interação com antioxidantes e fitonutrientes, que exercem efeitos protetores sobre a mucosa gástrica, também influenciam positivamente a persistência da infecção e o estado inflamatório associado (TOH; WILSON, 2020).

2.1.4. Fatores de Virulência (*cagA*)

Entre os principais fatores de virulência do *H. pylori*, destaca-se o gene *cagA*, considerado um dos elementos mais relevantes na patogênese da infecção. Está presente em aproximadamente 60 a 70% das cepas ocidentais (BAJ et al., 2021; BARBOSA; SCHINONNI, 2011), estando inserido em um agrupamento genético conhecido como cag PAI. Essa ilha de patogenicidade codifica um sistema de secreção do tipo IV (T4SS), responsável pela translocação da proteína CagA para o interior das células epiteliais gástricas do hospedeiro. Componentes do T4SS, incluindo CagL, CagI e CagY, interagem diretamente com receptores de integrina $\alpha 5\beta 1$ para facilitar esse processo (BACKERT; TEGTMAYER, 2017) (Figura 4).

Figura 4 - Fenótipos e variações da proteína CagA em *Helicobacter pylori*



A figura representa os efeitos locais e sistêmicos da proteína efetora CagA, translocada pelo sistema de secreção do tipo IV (T4SS), presente no cag PAI de *H. pylori*. A proteína da ponta do T4SS, CagL, interage com a integrina $\alpha 5\beta 1$ na membrana da célula hospedeira, ativando a quinase de adesão focal (FAK) e, subsequentemente, a quinase Src. Estas quinases promovem a fosforilação da CagA em resíduos de tirosina específicos. A CagA fosforilada ativa a fosfatase SHP-2, contendo domínio homólogo SH2, desencadeando sinais intracelulares locais. Além disso, a CagA fosforilada também pode ativar NF- κ B diretamente e exercer

efeitos amplos na célula hospedeira. Fonte: Adaptado de Atherton (2009), conforme modificado por Barbosa (2012).

Ao ser introduzida, a CagA é fosforilada em motivos EPIYA (glutamato-prolina-isoleucina-tirosina-alanina) por cinases da célula hospedeira, como Src e Abl. A proteína fosforilada passa então a interagir com moléculas sinalizadoras, como a fosfatase SHP2 e a quinase PAR1/MARK, interferindo em diversas vias de sinalização intracelular (BACKERT; TEGTMAYER, 2017; HATAKEYAMA, 2017). Consequentemente, ocorrem alterações morfológicas e funcionais importantes, incluindo perda de junções celulares, alteração da polaridade celular, aumento da motilidade e rearranjos citoesqueléticos, levando ao rompimento da integridade epitelial (BARBOSA; SCHINONNI, 2011; HATAKEYAMA, 2017). Esses efeitos contribuem ainda para desencadeamento de inflamação crônica, proliferação celular descontrolada e potencial transformação maligna (BAJ et al., 2021). O CagA então, irá promover a transição epitelial-mesenquimal (EMT), processo que favorece características invasivas e potencial migratório às células epiteliais gástricas (LI et al., 2018). Cepas de *H. pylori* *cagA*-positivas desencadeam acúmulo nuclear de YAP e aumento da expressão de marcadores EMT. A deleção de *cagA* anula esses efeitos, confirmando sua centralidade nesse processo (LI et al., 2018).

A atividade biológica do gene *cagA* é modulada pela presença de diferentes combinações dos motivos EPIYA. Cepas ocidentais geralmente apresentam os motivos EPIYA-A, -B, -C, sendo que variações na quantidade e na organização desses domínios influenciam a afinidade da proteína CagA por alvos intracelulares como SHP-2 e PAR1b e, consequentemente, sua capacidade oncogênica (HATAKEYAMA, 2017; LIMA; RABENHORST, 2009). Além das alterações estruturais nas células hospedeiras, a CagA também atua na modulação da resposta inflamatória. A proteína induz a expressão de IL-8 por meio da ativação do fator de transcrição NF-kB, intensificando a inflamação da mucosa gástrica e agravando a lesão epitelial (BAJ et al., 2021).

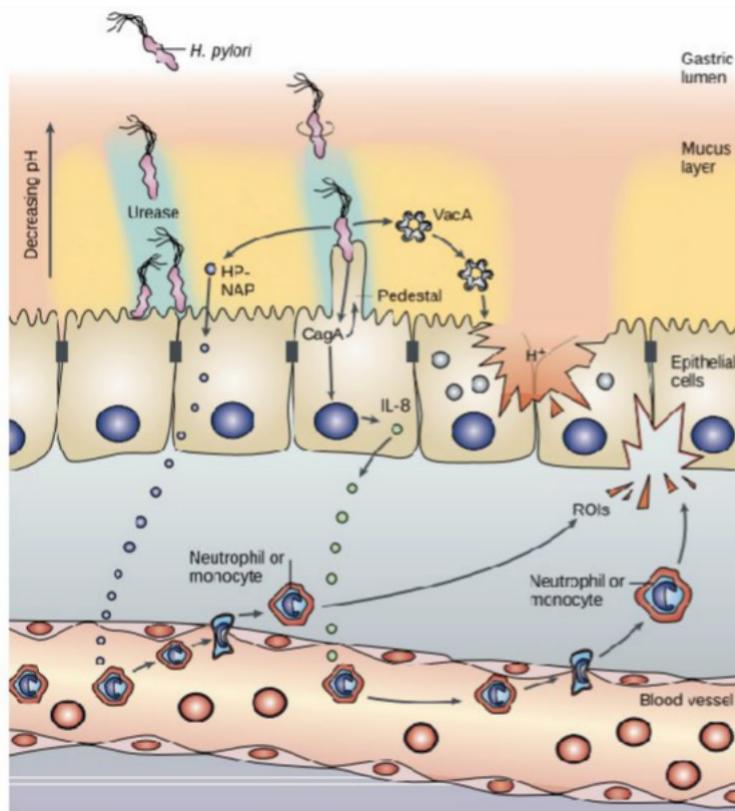
Embora a via clássica de translocação de CagA ocorra por meio da interação entre T4SS e a integrina β 1, estudos demonstraram que a proteína pode ser internalizada por mecanismos alternativos. Entre eles, destacam-se a interação com fosfatidilserina na membrana celular e a endocitose mediada por vesículas de membrana externa (OMVs), possibilitando a infecção de células não diretamente em contato com a bactéria (BACKERT; TEGTMAYER, 2017).

2.2. Resposta Imune e Inflamação Gástrica na Infecção por *H. pylori*

A descoberta do *H. pylori* apresentou o agente etiológico do evento incial da cascata inflamatória gástrica. A patogênese da inflamação induzida por esse microrganismo está diretamente relacionada à ativação da resposta imune inata, desencadeada pela produção de citocinas pró-inflamatórias no epitélio gástrico e duodenal, seguida pelo recrutamento de neutrófilos e células mononucleares (KHUDAIBERGANOVA et al., 2025) (Figura 5). Atualmente, o *H. pylori* é amplamente reconhecido como a principal causa de gastrite crônica ativa e desempenha papel central na patogênese de doenças gastrointestinais como úlcera péptica, gastrites atróficas e carcinoma gástrico (LOBO GATTI et al., 2005).

A interação inicial da bactéria com o epitélio gástrico ocorre por meio de seus fatores de virulência, como CagA, VacA, lipopolissacarídeos e flagelinas, que ativam receptores do tipo Toll (TLRs), presentes nas células epiteliais, desencadeando uma resposta inflamatória local (Barbosa, 2012; KHUDAIBERGANOVA et al., 2025). A ativação desses receptores promove a transcrição de citocinas inflamatórias, como interleucina IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , essenciais para o recrutamento de células inflamatórias à mucosa gástrica (BARBOSA, 2012; GATTI et al., 2007).

Figura 5 - Representação esquemática da colonização da mucosa gástrica por Helicobacter pylori e seus principais mecanismos patogênicos



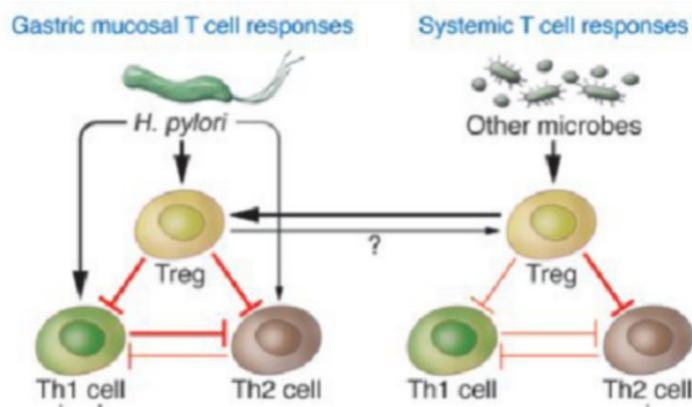
Após alcançar a mucosa gástrica, o *H. pylori* se fixa às células epiteliais por meio de adesinas e secreta a toxina VacA, que altera as junções celulares e promove a formação de grandes vacúolos citoplasmáticos. A bactéria também injeta a proteína CagA no interior das células hospedeiras por meio do sistema T4SS, induzindo alterações no citoesqueleto, formação de pedestais e liberação de linfocinaas pró-inflamatórias. Esses eventos desencadeiam o recrutamento de neutrófilos e monócitos, amplificando a resposta inflamatória e contribuindo para a lesão da mucosa. Fonte: Adaptado de Montecucco e Rappuoli (2001).

Os neutrófilos são os primeiros a serem recrutados, mas sua ação contra o *H. pylori* é ineficaz devido à ação de enzimas bacterianas como catalase e superóxido dismutase, que neutralizam as espécies reativas de oxigênio (FERREIRA et al., 2022). A liberação persistente de radicais livres por neutrófilos e monócitos, em paralelo à diminuição dos níveis de antioxidantes, leva a lesões oxidativas no DNA, disfunção na transdução de sinais das células epiteliais gástricas e contribui para a carcinogênese gástrica (FERREIRA et al., 2022).

A interleucina 6 (IL-6) destaca-se nesse cenário como uma citocina multifuncional, produzida por células imunes e epiteliais. Atua como mediadora da inflamação, reguladora de funções endócrinas e metabólicas, e desempenha papel-chave na ligação entre a imunidade inata e adaptativa (GATTI et al., 2007; LOBO GATTI et al., 2005). Durante a infecção por *H. pylori*, a IL-6 estimula a ativação de células T, promove a produção de IFN- γ , a secreção de imunoglobulinas por células B, e ativa polimorfonucleares, exacerbando o processo inflamatório (SANTOS et al., 2021).

Além da resposta Th1 clássica, a infecção por *H. pylori* desequilibra a homeostase entre células T reguladoras (Treg) e células T auxiliares 17 (Th17), resultando no aumento de interleucina 17 (IL-17) e fator de crescimento transformador-β (TGF-β) no meio gástrico. A IL-17, por sua vez, estimula ainda mais a produção de IL-6 pelas células Th1 e Th2 (JAN et al., 2021). Esse microambiente inflamatório crônico é sustentado por uma combinação de citocinas inflamatórias, como IL-6 e TGF-β, e anti-inflamatórias, como IL-10, secretadas por uma variedade de células, incluindo Th1, Th2, Th17, macrófagos, monócitos, mastócitos e neutrófilos (JAN et al., 2021). A IL-10, produzida principalmente por células Treg, atua como importante reguladora da inflamação, contribuindo para a persistência do *H. pylori* na mucosa gástrica (KHUDAIBERGANOVA et al., 2025) (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática das respostas Th associadas à colonização por *Helicobacter pylori*



A infecção está relacionada à ativação predominante das respostas Th1 e Treg, enquanto a resposta Th2 tende a ser suprimida nesse contexto. Células Treg modulam a inflamação gástrica ao conter a ativação exacerbada de células Th1, favorecendo a persistência da bactéria com menor dano tecidual. A redução dos níveis de Treg está associada ao aumento do risco de úlcera péptica. Fonte: Adaptado de Atherton (2009).

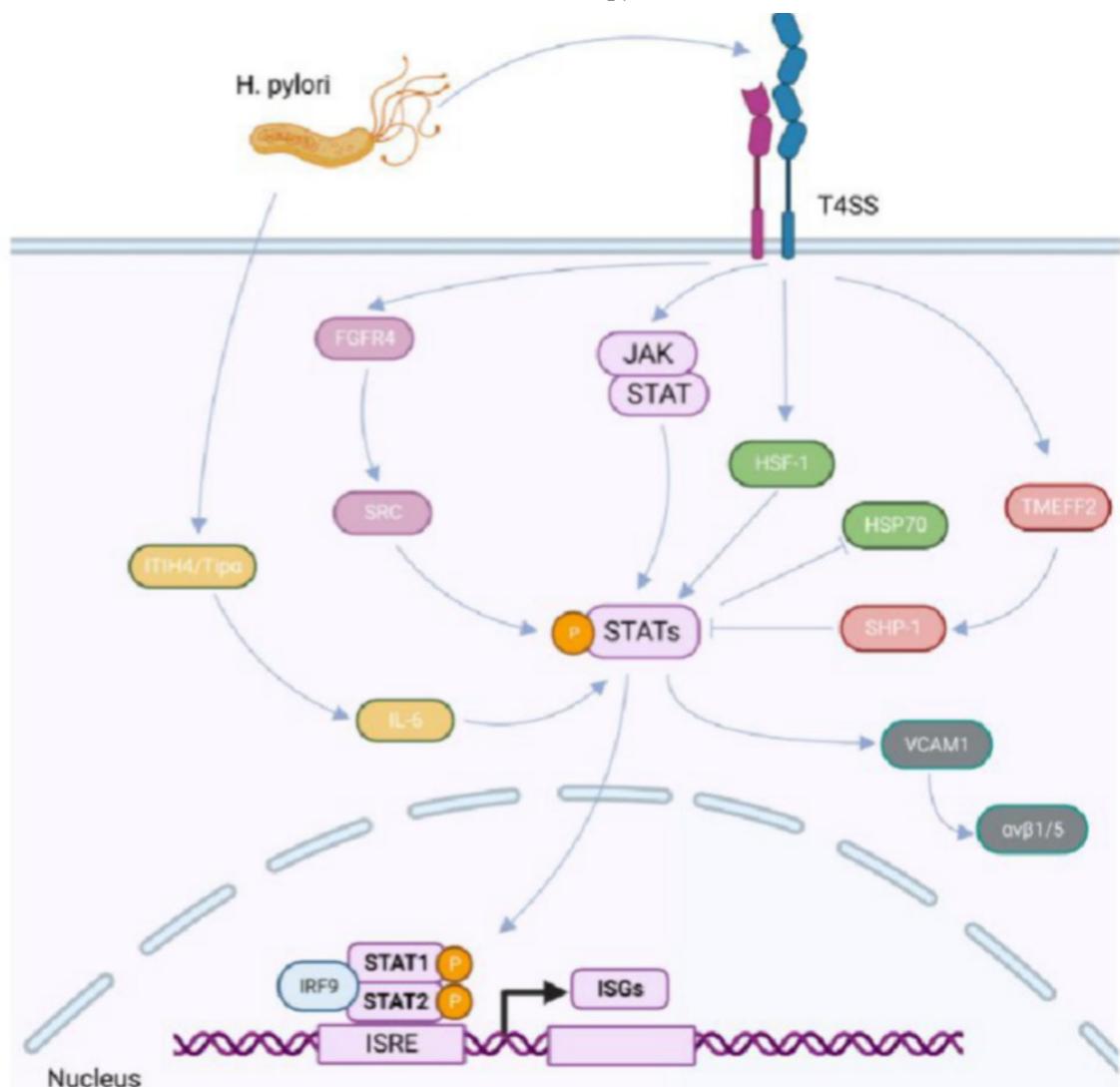
Embora haja uma intensa ativação imunológica induzida pelo *H. pylori*, a infecção geralmente persiste de forma crônica, refletindo a ineficácia da imunidade adaptativa em erradicar a bactéria. Isso ocorre, em parte, devido à capacidade do *H. pylori* de inibir a apresentação de抗原s por células dendríticas, prejudicando a ativação efetiva das células T (KHUDAIBERGANOVA et al., 2025). A resposta humoral também está presente, especialmente com produção de IgG, mas anticorpos induzidos podem reconhecer抗原s próprios da mucosa gástrica, favorecendo processos autoimunes (FERREIRA et al., 2022).

Em tecidos gástricos infectados, os níveis de IL-6 encontram-se significativamente

elevados e correlacionam-se com o grau da inflamação, sendo observados níveis séricos ainda maiores em pacientes com câncer gástrico em comparação àqueles com lesões benignas (GATTI et al., 2007; PERO et al., 2019). O complexo IL-6/IL-6R ativa importantes vias de sinalização como JAK/STAT3, PI3K, MAPK e AMPK, implicadas tanto em processos inflamatórios quanto na carcinogênese gástrica (SANTOS et al., 2021). A ativação aberrante do STAT3 promove a expressão de genes ligados à apoptose, proliferação celular e progressão tumoral (JAN et al., 2021; SANTOS et al., 2021).

Um regulador crucial dessa cascata é o gene *SOCS1*, que atua como modulador negativo da via JAK/STAT ao inibir a ativação excessiva do fator de transcrição STAT3. Contudo, a infecção por *H. pylori* pode induzir a hipermetilação da região promotora de *SOCS1*, reduzindo sua expressão e contribuindo para a ativação sustentada da via JAK/STAT (JAN et al., 2021; TO et al., 2004). A restauração da expressão de *SOCS1* por agentes desmetilantes suprime a fosforilação de STAT3, enquanto o bloqueio da IL-6 também reduz parcialmente sua ativação, evidenciando o papel central desse eixo na progressão do câncer gástrico (TO et al., 2004) (Figura 7).

Figura 7 - Representação esquemática da ativação da via JAK/STAT induzida pela infecção por *Helicobacter pylori*



Representação esquemática da ativação da via JAK/STAT induzida pela infecção por *Helicobacter pylori*. A interação da bactéria com células epiteliais gástricas por meio do sistema de secreção tipo IV (T4SS) leva à produção de IL-6 e à fosforilação de STATs, ativando a transcrição de genes associados à inflamação, proliferação e invasão celular. Diversas proteínas moduladoras, como SHP-1, HSP70, TMEFF2 e VCAM1, são reguladas nesse processo, contribuindo para a carcinogênese gástrica. Fonte: Adaptado de Xi et al. (2023).

Além das citocinas pró-inflamatórias e dos reguladores da resposta adaptativa, elementos da imunidade inata também são modulados durante a infecção por *H. pylori*. Dentre esses, destacam-se os peptídeos antimicrobianos, especialmente as β-defensinas humanas (HBDs), que desempenham uma função protetora na mucosa gástrica. A HBD2, por exemplo, apresenta expressão aumentada em tecidos infectados por *H. pylori* e está associada tanto à resposta inflamatória quanto à modulação epigenética, podendo contribuir para a tumorigênese gástrica (PERO et al., 2019). Curiosamente, sua expressão pode ser induzida

diretamente pela presença da bactéria ou mediada por citocinas inflamatórias presentes no microambiente gástrico (PERO et al., 2019).

A inflamação persistente e a infiltração crônica de polimorfonucleares criam um ambiente propício à mutagênese, com liberação contínua de espécies reativas de oxigênio, dano ao DNA e alterações epigenéticas que favorecem a progressão para atrofia gástrica, metaplasia intestinal e, eventualmente, carcinoma gástrico (FERREIRA et al., 2022; LOBO GATTI et al., 2005; SANTOS et al., 2021).

2.3. Metilação do Dna e Regulação Epigenética

A metilação do DNA é uma modificação epigenética amplamente estudada, caracterizada pela adição de um grupo metil à citosina de dinucleotídeos CpG. Essa modificação ocorre em regiões do genoma com alta densidade de CpGs, conhecidas como ilhas CpG, frequentemente localizadas em promotores gênicos (JONES; TAKAI, 2001). A metilação é catalisada por enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), sendo a DNMT1 responsável por manter os padrões de metilação durante a replicação celular, enquanto DNMT3A e DNMT3B estabelecem novas marcas em regiões previamente não metiladas (COSTA, 2016; DO AMARAL et al., 2019).

Essa modificação exerce papel crucial na regulação da expressão gênica, promovendo o silenciamento transcricional quando ocorre em regiões promotoras. A distribuição dos sítios CpG não é aleatória, concentrando-se em regiões regulatórias, como o primeiro exon dos genes (WOJDACZ; DOBROVIC; HANSEN, 2008). Alterações nesse padrão, como a hipermetilação aberrante, são comuns em genes supressores tumorais, incluindo *MHL1*, *MGMT*, *CDKN2A*, *SOCS1* e *RUNX3* (OSHIMO et al., 2004; OUE et al., 2001; SHEN et al., 2018).

A infecção por *H. pylori* é considerada determinante na origem dessas alterações, induzindo uma resposta inflamatória crônica com liberação de citocinas como IL-1 β e mediadores como o óxido nítrico (NO), que aumentam a expressão de DNMTs e favorecem a hipermetilação de genes reguladores (HUANG et al., 2012; MUHAMMAD; ELADL; KHODER, 2019; NIWA et al., 2010). Macrófagos infectados, ao interagir com células epiteliais gástricas, elevam a produção de NO, o que contribui para a hipermetilação de genes como *RUNX3* (HUANG et al., 2012). Genes como *CDKN2A*, *MHL1* e *MGMT* também apresentam maior metilação em tecidos infectados, com reversão parcial após a erradicação da bactéria, sendo *MGMT* particularmente mais metilado em pacientes infectados por cepas CagA+ (MUHAMMAD; ELADL; KHODER, 2019).

Estudos mostram que a inflamação provocada por *H. pylori* pode aumentar a metilação em regiões da mucosa gástrica normalmente pouco metiladas. Esse efeito é mais intenso em áreas já marcadas pela modificação de histona H3K27me3 e pode atingir genes altamente ativos, indo além da simples aceleração da metilação associada ao envelhecimento (YAMASHITA et al., 2019). A mucosa gástrica infectada pode manter esse perfil mesmo após a erradicação, sustentando o conceito de “campo epigenético de cancerização”, um ambiente propício à transformação maligna (NAKAJIMA et al., 2009; TAHARA et al., 2019; USHIJIMA; HATTORI, 2012). Nesse cenário, o encurtamento dos telômeros, característico do envelhecimento, combinado ao aumento da expressão de DNMT1, contribui para a indução da metilação e para a manutenção de alterações persistentes (TAHARA et al., 2019).

Essas mudanças favorecem a instalação de lesões irreversíveis, como atrofia gástrica e metaplasia intestinal, que aumentam a predisposição ao câncer gástrico. A metilação de genes condutores, como *CDKN2A*, *MLHI* e *RUNX3*, que estão diretamente envolvidos na regulação celular e cuja inativação favorece a transformação maligna, e de genes passageiros, com alterações secundárias sem efeito funcional direto, é mais frequente em indivíduos com câncer, mesmo em mucosas aparentemente não neoplásicas. Isso sugere que marcas epigenéticas podem preceder alterações histológicas (USUI et al., 2021). Como consequência, a metilação pode persistir por toda a vida, funcionando como um “registro molecular” de infecções prévias por *H. pylori* (NAKAJIMA et al., 2009).

A expressão de *IL6* também pode ser modulada por mecanismos epigenéticos, especialmente por alterações no padrão de metilação de sua região promotora. A hipometilação dessa região está relacionada ao aumento da expressão da citocina, sobretudo em áreas com sítios de ligação para fatores de transcrição, mais sensíveis à perda de metilação (ZUO et al., 2016). Esse aumento contribui para a manutenção da inflamação crônica induzida por *H. pylori*, criando um microambiente favorável à progressão tumoral. Além disso, cepas positivas para o gene *cagA* induzem maiores níveis de metilação em comparação com cepas negativas, intensificando o silenciamento de genes supressores tumorais e favorecendo a transformação maligna (VAHIDI et al., 2022).

A metilação do gene *SOCS1*, regulador negativo da via JAK/STAT, foi observada em casos de câncer gástrico, associando-se à menor expressão da proteína, presença de metástases linfonodais e estágios avançados da doença (OSHIMO et al., 2004). Sua inativação promove hipersensibilidade a citocinas, como IL-6, contribuindo para a progressão tumoral. O gene *MGMT*, essencial para a reparação de lesões induzidas por agentes alquilantes, também é silenciado por hipermetilação, levando ao acúmulo de mutações (G>A) e maior risco de

metástases (YU et al., 2016; ZHANG et al., 2017). Esse silenciamento ocorre por eventos epigenéticos, e não por mutações estruturais (OUE et al., 2001). Já a metilação de MLH1 está associada à deficiência no reparo de erros de pareamento (MMR), observada em tecidos tumorais e relacionada ao risco de câncer gástrico (SHEN et al., 2018). Essas alterações podem surgir precocemente na carcinogênese gástrica, inclusive em tecidos histologicamente normais infectados por *H. pylori* (MAEKITA et al., 2006), estando presentes em células-tronco e células diferenciadas do epitélio gástrico (NIWA et al., 2010).

Dada a importância dessas alterações, diversas técnicas têm sido empregadas para a análise de metilação do DNA. Entre elas, métodos baseados em PCR, como o High Resolution Melting (HRM), destacam-se por sua sensibilidade e aplicabilidade em amostras clínicas. Essa abordagem permite identificar diferentes padrões de metilação por meio da análise de perfis de melting após conversão com bissulfito (WOJDACZ; DOBROVIC, 2007). A técnica foi aplicada com sucesso por LEITE (2017) em fibroblastos humanos para os genes *SOCS1*, *P16* e *TIMP2*, e por COSTA (2016), que demonstrou a influência da inflamação e do envelhecimento na metilação aberrante em tecidos gástricos.

Além dos genes clássicos, estudos recentes mostram que *H. pylori* pode alterar a metilação de miRNAs supressores tumorais, como miR-200a/b, cuja metilação diminui após a erradicação, aumentando sua expressão (CHOI et al., 2020). Outro achado importante é a detecção de marcadores epigenéticos em leucócitos periféricos, como a metilação do GNAS, indicando que alterações epigenéticas associadas à infecção podem ser monitoradas de forma não invasiva e potencialmente utilizadas como marcador do risco de transformação maligna em tecidos gástricos (ZHANG et al., 2021).

Por fim, agentes desmetilantes, como a 5-aza-CdR, tem sido estudados como estratégia para reativar genes silenciados, como *MGMT* e *SOCS1*, e modular vias críticas como a do c-Myc (DO AMARAL et al., 2019), apontando para potenciais intervenções terapêuticas baseadas em epigenética.

2.4. O Papel da Metilação na Resposta Inflamatória e Reparação do DNA

A infecção por *H. pylori* provoca uma resposta crônica que vai além da inflamação imediata, envolvendo alterações genéticas e epigenéticas em genes centrais para a regulação de citocinas e reparo do DNA. Entre esses, o gene *IL6* se destaca por apresentar polimorfismos em sua região promotora, como o alelo -174G, que influenciam seu nível de transcrição e estão associados à maior produção de IL-6 em inflamações crônicas e câncer gástrico (BARBOSA, 2012; GATTI et al., 2007). LOBO GATTI et al. (2005) demonstraram

que variantes em IL1 β , IL1RN, IL6 e IL8 influenciam a gravidade da inflamação gástrica causada pelo *H. pylori*, reforçando o papel do hospedeiro na resposta à infecção.

Além dos polimorfismos, a regulação epigenética de *IL6* exerce impacto significativo na inflamação crônica. Estudos de ZUO et al. (2016) mostraram que a hipometilação de ilhas CpG na região promotora do gene *IL6* está associada ao aumento de sua expressão e com maior risco para doenças inflamatórias crônicas, sugerindo que a desmetilação possa constituir um mecanismo epigenético comum em patologias mediadas por citocinas. Esses sítios de hipometilação frequentemente coicidem com locais de ligação de fatores de transcrição, potencializando a resposta inflamatória.

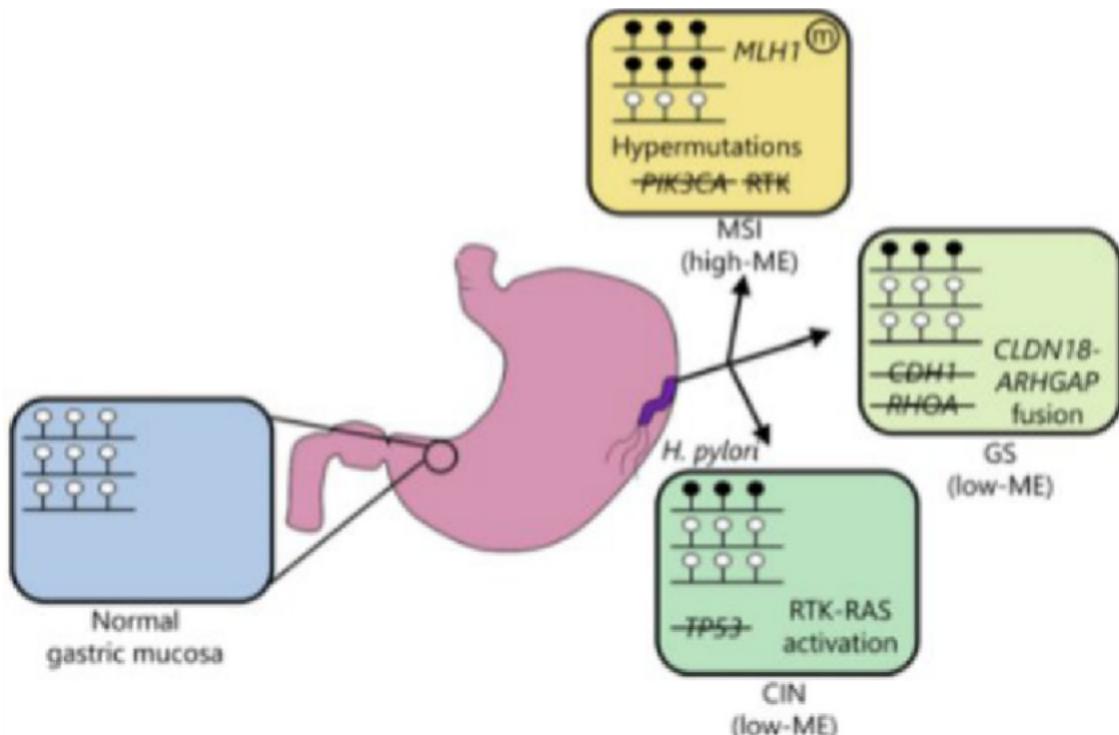
A atuação da IL-6 ocorre predominantemente através do complexo IL-6/IL-6R, desencadeando a ativação de vias de sinalização como JAK/STAT3, PI3K, MAPK e AMPK, que regulam mecanismos celulares essenciais, incluindo processos de proliferação, sobrevivência e expressão de genes pró-inflamatórios (SANTOS et al., 2021). O modulador negativo *SOCS1* normalmente restringe essa sinalização, mas em tecidos gástricos infectados por *H. pylori*, seu promotor encontra-se frequentemente hipermetilado, resultando em silenciamento gênico e ativação sustentada de STAT3 (JAN et al., 2021; LEITE, 2017; TO et al., 2004). Esse silenciamento epigenético do *SOCS1* tem sido associado à progressão tumoral, metástase linfônodal e a um pior prognóstico no câncer gástrico. A reativação de *SOCS1* por agentes desmetilantes diminui a fosforilação de STAT3 e bloqueia vias pró-tumorigênicas, sugerindo novas abordagens terapêuticas (OSHIMO et al., 2004).

Em paralelo, genes de reparo de DNA como *MLH1* e *MGMT* sofrem alterações epigenéticas que comprometem a manutenção da integridade genômica. O gene *MLH1*, participante do sistema de reparo por incompatibilidade de bases (MMR), é frequentemente silenciado por hipermetilação do seu promotor em tumores gástricos. Esse silenciamento resulta em instabilidade de microssatélites (MSI), condição associada à maior acúmulo de mutações em regiões críticas do genoma e ao desenvolvimento de câncer gástrico de subtipo epigenético HME (High Methylation Epigenotype). A perda da função de *MLH1* é particularmente observada em casos de gastrite atrófica associada à infecção por *H. pylori*, reforçando o elo entre inflamação crônica, desregulação epigenética e instabilidade genômica (SHEN et al., 2018; USUI et al., 2021), como ilustrado na Figura 8.

A infecção por *H. pylori* pode ainda modular diretamente a maquinaria de metilação, promovendo altos níveis de metilação em promotores gênicos, como os das conexinas, prejudicando a comunicação intracelular e favorecendo a transformação maligna. O silenciamento do gene MAP1LC3Av1, envolvido na autofagia celular, pode ser resultado de

infecções prolongadas das células epiteliais gástricas, como demonstrado por XI et al. (2023), e é ilustrado na Figura 9, que esquematiza os principais efeitos epigenéticos induzidos pela bactéria.

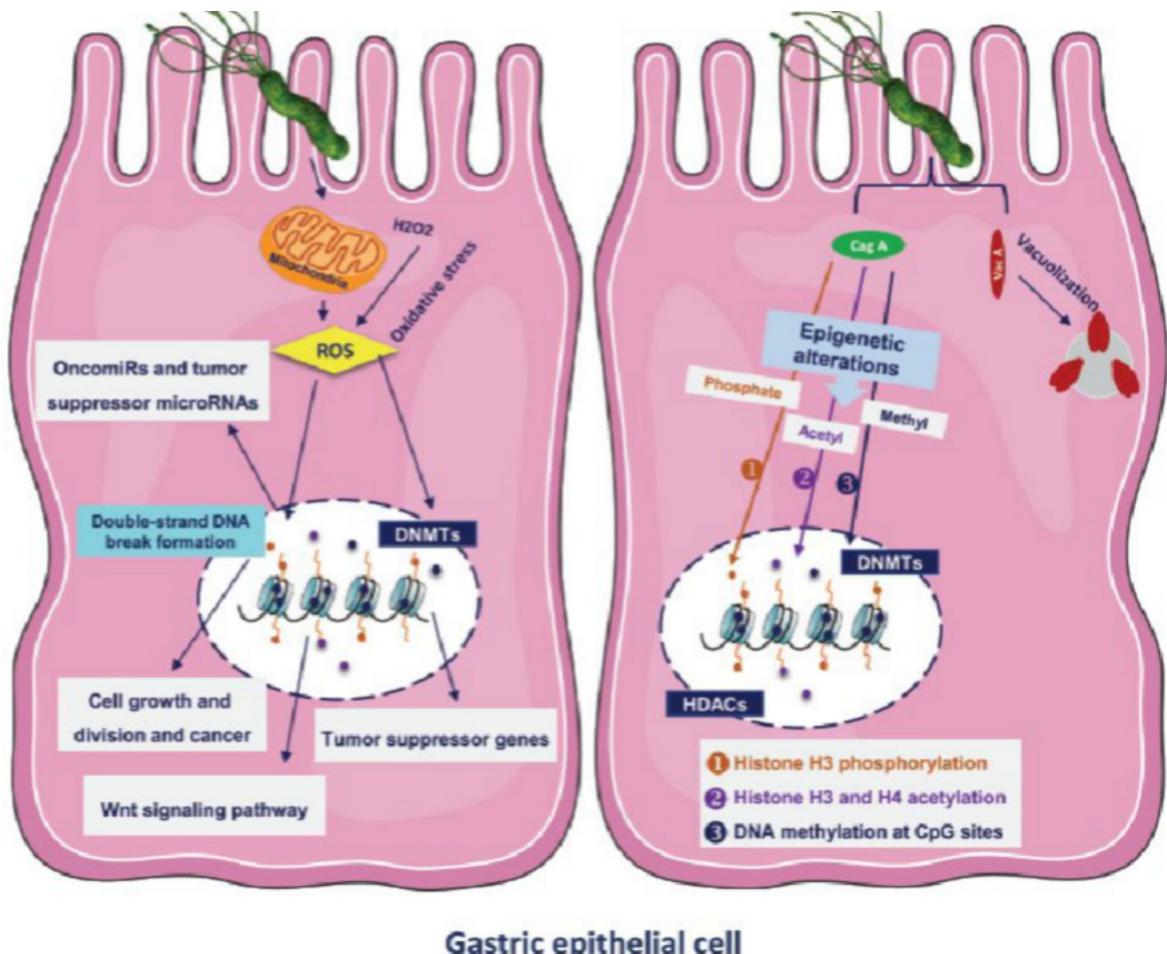
Figura 8 - Alterações moleculares em epigenótipos.



A hipermetilação do promotor de *MLH1* está associada ao fenótipo MSI e ao subtipo HME, caracterizado por alta carga mutacional. A infecção por *H. pylori* contribui para a transição da mucosa gástrica normal para perfis epigenéticos alterados. Genes mutados ou fundidos em cada subtipo são indicados. Adaptado de Usui et al. (2021)

O gene *MGMT* codifica a enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferase, responsável por remover adutos mutagênicos e citotóxicos da posição O6 da guanina, promovidos por agentes alquilantes, cujo acúmulo pode gerar mutações em oncogenes como K-ras. A hipermetilação de seu promotor resulta em silenciamento epigenético, comprometendo o reparo dessas lesões e, consequentemente, elevando o risco de transformação neoplásica no epitélio gástrico. Essa alteração apresenta maior prevalência em populações asiáticas, o que tem sido correlacionado a um aumento do risco de câncer gástrico, incluindo casos com metástase à distância (OUE et al., 2001; ZHANG et al., 2017). Estudos in vitro demonstraram que a restauração da expressão de *MGMT* por agentes desmetilantes confirma a relação causal entre a metilação promotora e a inativação gênica.

Figura 9 - Efeitos da infecção por *Helicobacter pylori* sobre a regulação epigenética em células epiteliais gástricas



A infecção por *H. pylori* promove estresse oxidativo e ativa toxinas bacterianas como CagA, levando à disfunção mitocondrial e produção de ROS. Esses estímulos modulam microRNAs e enzimas epigenéticas, como DNMTs e HDACs, resultando na metilação de promotores gênicos e silenciamento de genes supressores tumorais, favorecendo alterações celulares associadas à carcinogênese gástrica. Fonte: Adaptado de Vahidi et al. (2022).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar a associação entre metilação do DNA nos genes *IL6*, *SOCS1*, *MGMT* e *MHL1* e infecção por *H. pylori* através de amostras gástricas de pacientes do município de Vitória da Conquista, Bahia.

3.2. Objetivos Específicos

- Analisar o perfil de metilação do DNA da região promotora dos genes *IL6*, *SOCS1*, *MGMT* e *MHL1* em amostras de mucosa gástrica;
- Avaliar a associação entre o padrão de metilação dos genes *IL6*, *SOCS1*,

MGMT e MHL1 e a infecção por *H. pylori*;

- Elucidar os mecanismos epigenéticos envolvidos na etiopatogênese gástrica associada à infecção por *H. pylori*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS DETALHADOS

4.1. Casuística (Caracterização da População e Desenho do Estudo)

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (CAAE nº 79364617.0.0000.0055/2017), incluindo o uso do questionário socioeconômico aplicado aos participantes. Todos os voluntários aptos a participar da pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), com a garantia de confidencialidade das informações coletadas. O modelo do TCLE está apresentado no Anexo A.

No período entre 2019 e 2022 foram recrutados ao todo 144 pacientes adultos, com idade entre 18 e 80 anos, de ambos os sexos, submetidos à endoscopia gastroduodenal em hospitais de Vitória da Conquista, Bahia: Instituto Brandão de Reabilitação (IBR), Policlínica Sagrada Família e Hospital Geral de Vitória da Conquista.

Foram considerados critérios de exclusão de participantes: idade inferior a 18 anos ou superior a 80 anos; mulheres gestantes ou em lactação; histórico de tratamento prévio para erradicação de *H. pylori*; uso de antibióticos no mês anterior à realização do exame ou de inibidores de bomba de prótons nas duas semanas anteriores ao procedimento; diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica, desordens de coagulação ou presença de alterações anatômicas que impedissem a realização da endoscopia; imunossupressão; e história de cirurgia gástrica. Esses critérios foram verificados durante a triagem por meio de um questionário aplicado aos participantes, apresentado no Anexo B, que reúne informações clínicas, demográficas e socioeconômicas relevantes para o estudo.

Durante a realização do procedimento endoscópico foram coletadas amostras de biópsia do antro e do corpo gástrico dos pacientes para análise genética, obedecendo as condições ideais de assepsia, de acordo o protocolo de coleta. As amostras gástricas foram encaminhadas imediatamente para o Laboratório de Biologia Molecular do campus Anísio Teixeira da Universidade Federal da Bahia para a extração do DNA. As amostras extraídas foram armazenadas em freezer -20 até posteriores análises. Do total de pacientes recrutados, 44 (22 positivos e 22 negativos para infecção pelo *H. pylori*) foram selecionados para os ensaios de metilação, com base na qualidade e concentração do DNA extraído.

As análises de quantificação do DNA e de qPCR foram realizadas no Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular da UFBA-ICS. Posteriormente, as análises de

metilação foram conduzidas em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular da FOP/UNICAMP.

4.1.1. Critérios de positividade para *Helicobacter pylori*

A presença do *H. pylori* foi identificada inicialmente por meio do teste rápido da urease e confirmada por pelo menos um dos seguintes métodos: PCR em tempo real ou cultura microbiológica. Os pacientes foram considerados positivos para o *H. pylori* se apresentaram resultado positivo na PCR ou na cultura microbiológica. Pacientes com resultados negativos em todos os testes, incluindo teste da urease, foram classificados como *H. pylori* negativos.

4.2. Teste da Urease Pré-Formada

Para o teste rápido da urease, fragmentos da mucosa gástrica foram introduzidos em frascos contendo *H. pylori* Uréia Teste® e incubados a 37°C por até 24 horas. A leitura da reação foi feita ao final da primeira e da vigésima quarta horas. Uma mudança na coloração, de âmbar para rosa, indicava resultado positivo para a presença da bactéria.

4.3. Cultura Microbiológica

Para a cultura, as amostras foram cultivadas em meio ágar Brucella suplementado com sangue desfibrinado e antibióticos seletivos. As placas foram incubadas em ambiente microaerofílico a 37 °C por um período de até 7 dias.

4.4. Coleta da Amostra Biológica para Investigação Genética

Fragmentos de mucosa gástrica foram obtidos durante endoscopia gastroduodenal com o paciente em jejum de no mínimo 8 horas, depois de ter recebido diazepam (5mg por via oral) e anestesia tópica de faringe com cloridrato de lidocaína (Xilocaína spray a 10%). Fragmentos da mucosa gástrica foram colhidos da pequena curvatura do antro e da grande curvatura do corpo gástrico para o diagnóstico da infecção e estudo histopatológico.

4.5. Extração do Material Genético

O DNA total foi extraído a partir das biópsias gástricas utilizando o kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™), conforme protocolo do fabricante. O procedimento incluiu a lise enzimática do tecido com tampão de digestão e Proteinase K, seguida de

tratamento com RNase A para remoção de RNA. Após adição do tampão de lise e etanol, o material foi purificado por meio de colunas de centrifugação. O DNA eluído foi armazenado a -20 °C até sua utilização.

4.5.1. Quantificação de DNA

Na avaliação da qualidade e da concentração do DNA extraído, foram utilizadas duas técnicas complementares: a eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e observado sob transluminador de luz ultravioleta e a espectrofotometria, realizada no equipamento Nanodrop (Nanodrop Technologies, EUA) em laboratórios parceiros deste estudo. Amostras com razão de absorbância A260/A280 entre 1,8 e 2,0 foram selecionadas para as análises subsequentes.

4.6. Análise Genética

A genotipagem bacteriana foi realizada por PCR real time usando a tecnologia de TaqMan para os genes 16S rRNA e ureA, para confirmar a presença da bactéria, e o gene *cagA*, para identificar cepas mais virulentas. As reações foram conduzidas no equipamento QuanStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (PE Applied Biosystems, EUA), com volume total de 5 µL e parâmetros específicos de amplificação para cada gene alvo. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Primers específicos usados para genotipagem de *H. pylori* por PCR em tempo real (qPCR)

Gene	Primer	Sequence (5' – 3')	PCR (bp)
ureA	F	GAAGAAGGAGAGCTGGTAAA	116
	R	GGTATGCACGGTTACGAGTT	
16S rRNA	F	GGACACACTGGAACTGAGAC	162
	R	CCTAAACCTTCATCCTCCAC	
<i>cagA</i>	F	ACGCTCTGTCTTCTGTGTTAAT	146
	R	CACATTGTTACCTTGTGGTC	

F = primer forward; R = primer reverse; bp = pares de bases

4.7. Análise da Metilação

4.7.1. Tratamento e purificação do DNA com bissulfito

O DNA extraído das amostras foi submetido a tratamento com bissulfito de sódio que converte citosinas não metiladas em uracila, utilizando kit comercial EpiTect Bissulfite (QIAgen, Valencia, CA). Para isso, dissolveu-se o Mix bissulfito com água livre de RNase, conforme protocolo do fabricante. Agitou-se em vortex até que o mix estivesse completamente dissolvido. As reações foram preparadas em tubos de 200 µL de acordo a Tabela 2, adicionando cada componente na ordem listada.

Tabela 2 - Componentes da reação com bissulfito

Componentes	Volume por reação (µL)
Solução de DNA (1 ng)	Variável (máximo 20 µL)
Água livre de RNase	Variável (completar o volume da solução de
DNA	totalizando 20 µL)
Mix de bissulfito (dissolvido)	85
Tampão (buffer) proteção de DNA	35
Volume total	140

Após adição do buffer de proteção de DNA à mistura DNA-bissulfito, a coloração da reação mudou de verde para azul indicando mistura suficiente e pH correto para a conversão do bissulfito. Em seguida, a reação foi homogeneizada e incubada em termociclador conforme condições descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições do termociclador para conversão com bissulfito

Etapa	Tempo	Temperatura
Desnaturação	5 min	95 °C
Incubação	25 min	60 °C
Desnaturação	5 min	95 °C
Incubação	85 min (1h 25min)	60 °C
Desnaturação	5 min	95 °C
Incubação	175 min (2h 55min)	60 °C
Manter	Overnight	5 °C

Em seguida, foi realizado a purificação em colunas de centrifugação e eluição final em tampão EB. O DNA convertido foi armazenado a -20°C até a realização das análises de metilação.

4.7.2. MS-HRM (Methylation-Sensitive High Resolution Melting)

Os primers específicos dos genes analisados estão descritos na tabela 4. A reação de PCR foi realizada com o kit Type-it® HRM™ PCR (Qiagen) com volume final de 10 µL, contendo 1X HRM PCR Master Mix, 0,7 µM de cada iniciador e 50 ng de DNA tratado. O preparo do mix foi feito de acordo o protocolo do kit, enquanto o protocolo de ciclagem foi realizado segundo a tabela 5 para o LightCycler 480 (Roche). A rampa de HRM variou de 70 °C a 95 °C. O master mix foi utilizado como controle negativo, enquanto EpiTect® PCR Control DNA (Qiagen) foi utilizado para fazer os gradientes de percentual de metilação (0%, 25%, 50%, 75% e 100%).

Tabela 4 - Sequência dos primers específicos utilizados no MS-HRM

GENES	PRIMER 5' – 3' F	PRIMER 5' –3' R	CpG	AMPLICON SIZE
<i>IL-6</i>	GGCGATGGGGTTGAAGGG	CGTTAACCTCAAATCTACAATAC	6	120
<i>SOCS-1</i>	TCGCGGTTGTTATTAGGTGAAAG	CGAACCCGTAACACACCTTCCTA	12	140
<i>MGMT</i>	GCGTTTCGGATATGTTGGGATAGT	CCTACAAAACCACTCGAAACTAC	12	110
		CA		
<i>MHL1</i>	AGTTTTAAAAACGAATTAATAGG	ACTACCCGCTACCTAAAAAAATA	5	81
	AAGAG	TAC		

Tabela 5 - Protocolo de ciclagem para análise HRM no LightCycler 480 (Roche)

Etapa	Tempo	Temperatura	Ciclos
Etapa inicial de ativação do PCR (pre-incubation)	10 minutos	95 °C	1
Amplificação em 3 etapas:			45
Desnaturação	10 segundos	95 °C	
Anelamento	20 segundos	55 °C	
Extensão	20 segundos	72 °C	
HRM	1 minuto	95 °C	1
	1 minuto	70 °C	
	1 segundo	70 °C	
	Contínuo	95 °C	
Resfriamento (cooling)	30 segundos	40 °C	1

Os controles foram preparados com volume final de 20 µL conforme a tabela 6:

Tabela 6 - Preparo dos controles iniciais

	0%	25%	50%	75%	100%
DNA não metilado	10 µL	7,5 µL	5 µL	2,5 µL	-
DNA metilado	-	2,5 µL	5 µL	7,5 µL	10 µL
H2O	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

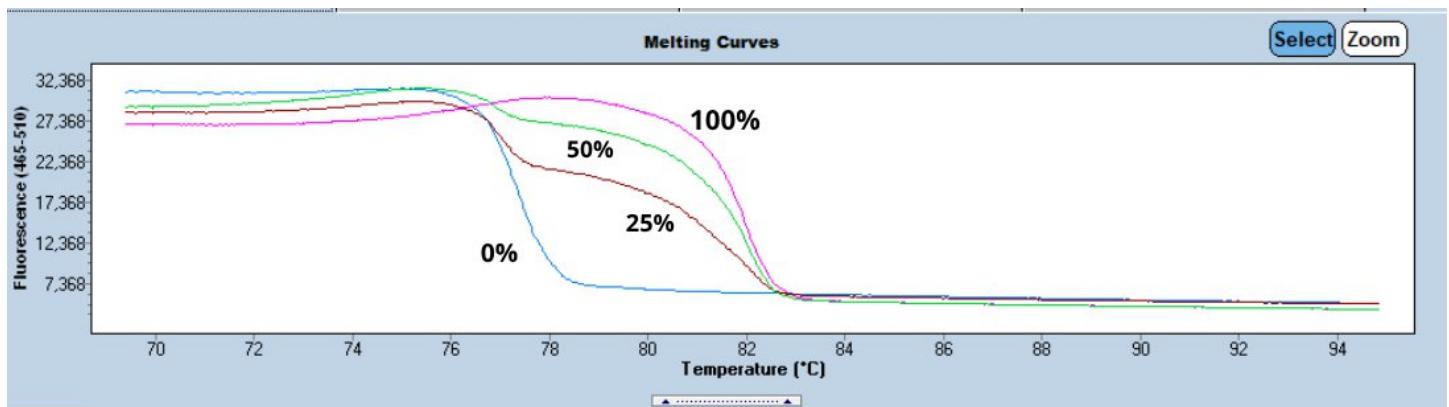
No entanto, o padrão de 75% foi descartado devido à baixa distinção em relação ao padrão de 50%. Com isso, o preparo final dos controles ficaram em 0%, 25%, 50% e 100% e foram pipetados diretamente na placa conforme quantidades presentes na tabela 7:

Tabela 7 - Preparo dos controles finais

	0%	25%	50%	100%
DNA não metilado	1 µL	0,75 µL	0,5 µL	-
DNA metilado	-	0,25 µL	0,5 µL	1 µL

As curvas de fusão obtidas permitiram a distinção progressiva entre os padrões, confirmando a sensibilidade do método (Figura 10).

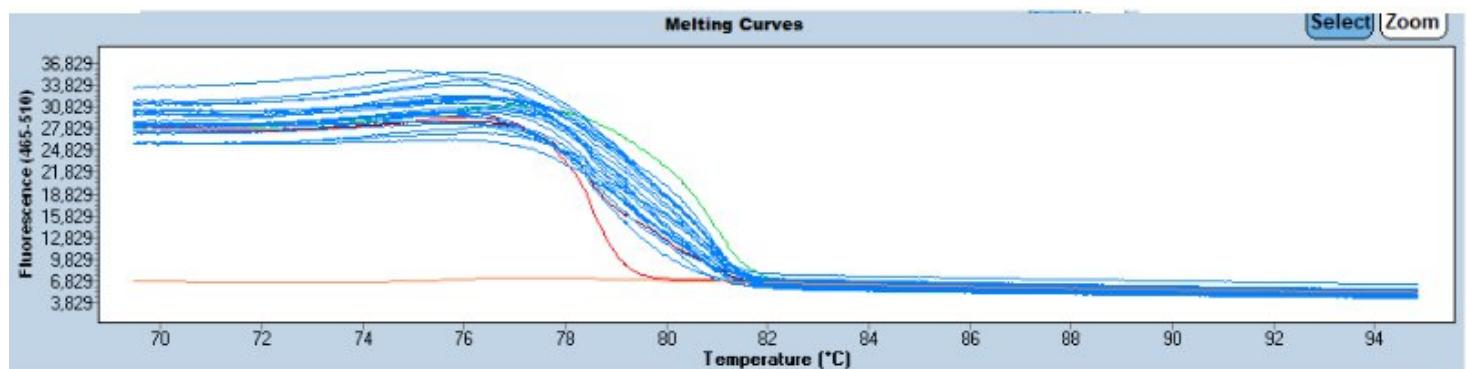
Figura 10 - Curvas de fusão dos controles de metilação obtidas por MS-HRM



Curvas de dissociação representando os padrões de metilação utilizados como controles (0%, 25%, 50% e 100%). Observa-se a separação progressiva das curvas de acordo com o aumento do percentual de metilação, com temperaturas de melting (T_m) distintas para cada grupo.

As amostras classificadas como positivas apresentaram curvas de fusão deslocadas em direção ao perfil dos controles metilados, indicando a presença de metilação parcial ou total nos genes avaliados (Figura 11).

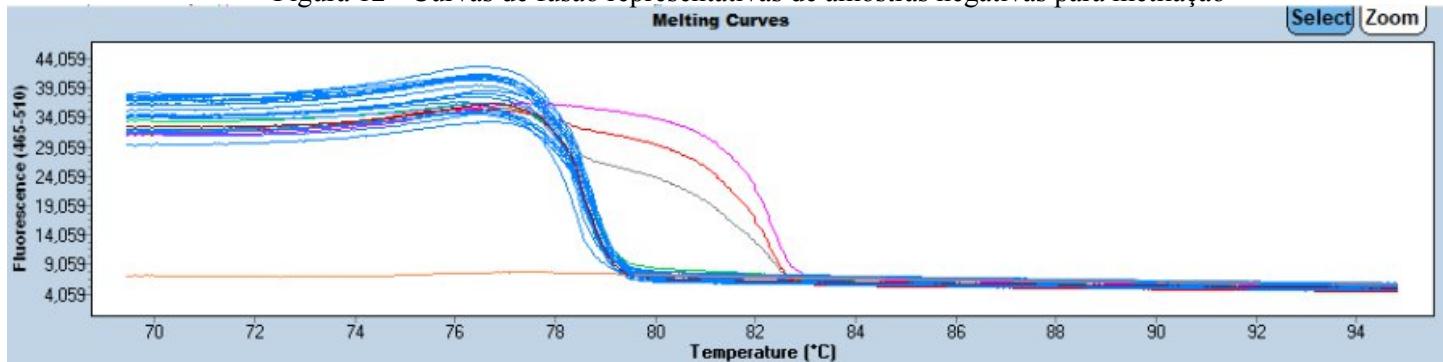
Figura 21 - Curvas de fusão representativas de amostras positivas para metilação



Curvas obtidas a partir de amostras que apresentaram metilação no gene analisado. As curvas deslocam-se em direção ao perfil dos controles metilados, indicando a presença de metilação parcial ou total nas regiões alvo.

Já as amostras negativas mostraram curvas semelhantes ao controle não metilado (0%), confirmando a ausência de metilação (Figura 12).

Figura 12 - Curvas de fusão representativas de amostras negativas para metilação



Curvas obtidas a partir de amostras sem metilação, que se alinham ao perfil do controle 0%, indicando ausência de metilação nos genes avaliados.

4.8. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS V.23 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). O teste t de Student foi aplicado para comparar os níveis médios de metilação dos genes analisados entre os grupos *H. pylori* positivo e negativo. Os valores médios e de desvio padrão foram estimados com base nas frequências observadas dentro dos intervalos de metilação de 0% a 25% e 25% a 50% de cada grupo.

As associações entre variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste qui-quadrado ou, quando apropriado, pelo teste exato de Fisher. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

REFERÊNCIAS

AMIEVA, Manuel; Peek, Richard M. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. GastroenterologyW.B. Saunders, , 1 jan. 2016.

AYA UKA, Fernanda et al. EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE DOENÇAS GASTROINTESTINAIS CAUSADAS POR *Helicobacter pylori*: UMA REVISÃO DA LITERATURA. 2023.

BACKERT, Steffen; TEGTMEYER, Nicole. Type iv secretion and signal transduction of *Helicobacter pylori* caga through interactions with host cell receptors. ToxinsMDPI AG, , 1 abr. 2017.

BAJ, Jacek et al. *Helicobacter pylori* virulence factors—mechanisms of bacterial pathogenicity in the gastric microenvironment. CellsMDPI, , 1 jan. 2021.

BARBOSA, Francivandi Coelho. Associação dos Polimorfismos em Genes de Interleucinas (IL1B-511, IL1RN, IL6 -174G e IL8 -251) com Lesões Gástricas Relacionadas ao *Helicobacter pylori*. Fortaleza: [S.n.]

BARBOSA, Joel Antonio; SCHINONNI, Maria Isabel. *Helicobacter pylori*: Association with gastric cancer and new insights into the virulence factors. Revista de Ciências Médicas e Biológicas, v. 10, n. 3, p. 254–262, 2011.

CAPPARELLI, Rosanna; IANNELLI, Domenico. Epigenetics and Helicobacter pylori. International Journal of Molecular SciencesMDPI, , 1 fev. 2022.

CHOI, Ji Min et al. Helicobacter pylori eradication can reverse the methylation-associated regulation of miR-200a/b in gastric carcinogenesis. Gut and Liver, v. 14, n. 5, p. 571–580, 1 set. 2020.

COELHO, Luiz Gonzaga Vaz et al. IVth Brazilian consensus conference on Helicobacter pylori infection. Arquivos de Gastroenterologia, v. 55, n. 2, p. 97–121, 1 abr. 2018.

COSTA, Débora Menezes da. Relação entre Helicobacter pylori, Metilação Gênica e Polimorfismos Genéticos do Hospedeiro no Câncer Gástrico. Fortaleza: [S.n.].

COSTA, Renan Augusto Lauria da et al. Helicobacter pylori E SEUS ASPECTOS CLÍNICOS-EPIDEMIOLÓGICOS: UMA REVISÃO DE LITERATURA/ HELICOBACTER PYLORI AND CLINICAL EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS: A LITERATURE REVIEW. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 2, p. 14420–14438, 2021.

COVER, Timothy L.; BLASER, Martin J. Helicobacter pylori in Health and Disease. Gastroenterology, v. 136, n. 6, p. 1863–1873, 2009.

DE MARTEL, Catherine et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. The Lancet Global Health, v. 8, n. 2, p. e180–e190, 1 fev. 2020.

DO AMARAL, Guilherme C. L. S. et al. 5-Aza-CdR promotes partial MGMT demethylation and modifies expression of different genes in oral squamous cell carcinoma. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, v. 127, n. 5, p. 425–432, 1 maio 2019.

FERREIRA, Raiane Aylla Alves et al. Helicobacter pylori NAS INFLAMAÇÕES GASTROINTESTINAIS. In: Enfermagem: contextualizando a educação em saúde. [S.I.]: Editora Científica Digital, 2022. v. 1 p. 103–115.

GATTI, Luciano Lobo et al. Interleukin-6 Polymorphisms, Helicobacter pylori Infection in Adult Brazilian Patients with Chronic Gastritis and Gastric Adenocarcinoma. Archives of Medical Research, v. 38, n. 5, p. 551–555, jul. 2007.

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 SciencesJapan Academy, , 2017.

HUANG, Fung Yu et al. Helicobacter pylori induces promoter methylation of E-cadherin via interleukin-1 β activation of nitric oxide production in gastric cancer cells. Cancer, v. 118, n. 20, p. 4969–4980, 15 out. 2012.

HUNT, R. H. et al. World gastroenterology organisation global guideline: Helicobacter pylori in developing countries. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 45, n. 5, p. 383–388, maio 2011.

IARC WORKING GROUP. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. Lyon: World Health Organization, 1994. v. 61.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: [S.n.].

JAN, Iqra et al. Helicobacter pylori Subdues Cytokine Signaling to Alter Mucosal Inflammation via Hypermethylation of Suppressor of Cytokine Signaling 1 Gene During Gastric Carcinogenesis. *Frontiers in Oncology*, v. 10, 25 jan. 2021.

JONES, P. A.; TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 10 ago. 2001.

KHUDAIBERGANOVA, N. Kh. et al. THE ROLE OF Helicobacter pylori INFECTION IN THE OCCURRENCE OF CHRONIC GASTRODUODENAL PATHOLOGY. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <www.neojournals.com>.

KUSTERS, Johannes G.; VAN VLIET, Arnoud H. M.; KUIPERS, Ernst J. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Clinical Microbiology Reviews*, jul. 2006.

LEITE, Mayra de Faria França. METHYLATION-SENSITIVE HIGH RESOLUTION MELTING (MS-HRM) ANALYSIS OF SOCS1, P16 AND TIMP2 GENES IN LPS-STIMULATED HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS. Piracicaba: [S.n.].

LI, Nianshuang et al. Helicobacter pylori CagA promotes epithelial mesenchymal transition in gastric carcinogenesis via triggering oncogenic YAP pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, v. 37, n. 1, 22 nov. 2018.

LIMA, Valeska Portela; RABENHORST, Silvia Helena Barem. Genes Associados à Virulência de Helicobacter pyloriRevista Brasileira de Cancerologia. [S.l.: S.n.].

LOBO GATTI, L. et al. Interleukin-6 polymorphism and Helicobacter pylori infection in Brazilian adult patients with chronic gastritis. *Clinical and Experimental Medicine*, v. 5, n. 3, p. 112–116, out. 2005.

MACHADO, Fernanda Subtil de Moraes et al. AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR Helicobacter pylori E ASSOCIAÇÃO COM LESÕES GÁSTRICAS EM SERVIÇO DE REFERÊNCIA DE JOINVILLE (SC). Joinville: [S.n.].

MAEKITA, Takao et al. High levels of aberrant DNA methylation in Helicobacter pylori-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clinical Cancer Research*, v. 12, n. 3 I, p. 989–995, 1 fev. 2006.

MONTECUCCO, Cesare; RAPPOLI, Rino. LIVING DANGEROUSLY: HOW Helicobacter pylori SURVIVES IN THE HUMAN STOMACH. Padova, Itália: [S.n.]. Disponível em: <www.nature.com/reviews/molcellbio>.

MUHAMMAD, Jibran Sualeh; ELADL, Mohamed Ahmed; KHODER, Ghalia. Helicobacter pylori- induced dna methylation as an epigenetic modulator of gastric cancer: Recent outcomes and future direction. *Pathogens* MDPI AG, , 1 mar. 2019.

NAKAJIMA, Takeshi et al. The presence of a methylation fingerprint of Helicobacter pylori Infection in human gastric mucosae. *International Journal of Cancer*, v. 124, n. 4, p. 905–910, 15 fev. 2009.

NIWA, Tohru et al. Inflammatory processes triggered by Helicobacter pylori infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Research*, v. 70, n. 4, p. 1430–1440, 15 fev. 2010.

OLIVEIRA, Graciela Santos Joana Ferreira de. TERRITORIALIDADES E PREVALÊNCIA DA H. pylori EM POPULAÇÃO RURAL DO MUNICÍPIO DE GOVERNADOR VALADARES. Governador Valadares: [S.n.].

OLIVEIRA, Patricia Amorim de et al. INFECÇÃO POR Helicobacter pylori E SUAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS. *Revista ft*, v. 28, n. 139, p. 25–26, 30 out. 2024.

OSHIMO, Yasuhiro et al. Epigenetic inactivation of SOCS-1 by CpG island hypermethylation in human gastric carcinoma. *International Journal of Cancer*, v. 112, n. 6, p. 1003–1009, 20 dez. 2004.

OUE, Naohide et al. PROMOTER HYPERMETHYLATION OF MGMT IS ASSOCIATED WITH PROTEIN LOSS IN GASTRIC CARCINOMA. [S.l.: S.n.].

PARK, Jin Young et al. Epidemiology of Helicobacter pylori and CagA-positive infections and global variations in gastric cancer. *Toxins*, v. 10, n. 4, 19 abr. 2018.

PERO, Raffaela et al. Beta-defensins and analogs in Helicobacter pylori infections: mRNA expression levels, DNA methylation, and antibacterial activity. *PLoS ONE*, v. 14, n. 9, 1 set. 2019.

POLK, D. Brent; PEEK, Richard M. Helicobacter pylori: Gastric cancer and beyond. *Nature Reviews Cancer*, jun. 2010.

SANTOS, M. P. et al. Increased expression of interleukin-6 gene in gastritis and gastric cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 54, n. 7, 2021.

SHEN, Shixuan et al. MLH1 promoter methylation and prediction/prognosis of gastric cancer: A systematic review and meta and bioinformatic analysis. *Journal of Cancer*, v. 9, n. 11, p. 1932–1942, 2018.

TAHARA, Sayumi et al. DNA methylation accumulation in gastric mucosa adjacent to cancer after Helicobacter pylori eradication. *International Journal of Cancer*, v. 144, n. 1, p. 80–88, 1 jan. 2019.

TO, K. F. et al. Constitutional activation of IL-6-mediated JAK/STAT pathway through hypermethylation of SOCS-1 in human gastric cancer cell line. *British Journal of Cancer*, v.

91, n. 7, p. 1335–1341, 4 out. 2004.

TOH, James W. T.; WILSON, Robert B. Pathways of gastric carcinogenesis, Helicobacter pylori virulence and interactions with antioxidant systems, vitamin C and phytochemicals. International Journal of Molecular SciencesMDPI AG, , 1 set. 2020.

USHIJIMA, Toshikazu; HATTORI, Naoko. Molecular pathways: Involvement of Helicobacter pylori-triggered inflammation in the formation of an epigenetic field defect, and its usefulness as cancer risk and exposure markers. Clinical Cancer Research, 15 fev. 2012.

USUI, Genki et al. DNA Methylation and Genetic Aberrations in Gastric Cancer. DigestionS. Karger AG, , 1 jan. 2021.

VAHIDI, Sogand et al. Performance of DNA Methylation on the Molecular Pathogenesis of Helicobacter pylori in Gastric Cancer; targeted therapy approach. Journal of PharmacopunctureKorean Pharmacopuncture Institute, , 30 jun. 2022.

WARREN, J. Robin; MARSHALL, Barry. UNIDENTIFIED CURVED BACILLI ON GASTRIC EPITHELIUM IN ACTIVE CHRONIC GASTRITIS. [S.I.: S.n.].

WASKITO, Langgeng Agung; SALAMA, Nina R.; YAMAOKA, Yoshio. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. HelicobacterBlackwell Publishing Ltd, , 1 set. 2018.

WOJDACZ, Tomasz K.; DOBROVIC, Alexander. Methylation-sensitive high resolution melting (MS- HRM): A new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. Nucleic Acids Research, v. 35, n. 6, mar. 2007.

WOJDACZ, Tomasz K.; DOBROVIC, Alexander; HANSEN, Lise Lotte. Methylation-sensitive high- resolution melting. Nature Protocols, v. 3, n. 12, p. 1903–1908, 2008.

XI, Yue et al. Helicobacter pylori regulates stomach diseases by activating cell pathways and DNA methylation of host cells. Frontiers in Cell and Developmental BiologyFrontiers Media SA, , 2023.

YAMASHITA, Satoshi et al. Distinct DNA methylation targets by aging and chronic inflammation: A pilot study using gastric mucosa infected with Helicobacter pylori. Clinical Epigenetics, v. 11, n. 1, 11 dez. 2019.

YU, Dan et al. Relationships between MGMT promoter methylation and gastric cancer: A meta- analysis. OncoTargets and Therapy, v. 9, p. 6049–6057, 5 out. 2016.

ZHANG, Yang et al. Helicobacter pylori associated aberrant methylation genes in blood leukocyte and gastric mucosa . Journal of Cancer, v. 12, n. 24, p. 7326–7333, 1 nov. 2021.

ZHANG, Zongxin et al. Promoter hypermethylation of MGMT gene may contribute to the pathogenesis of gastric cancer. Medicine (United States)Lippincott Williams and Wilkins, , 1 abr. 2017.

ZUO, Hong Peng et al. Hypomethylation of interleukin-6 promoter is associated with the risk of coronary heart disease. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 107, n. 2, p. 131–136, 1

ago. 2016.

CAPÍTULO 1: Methylation of *IL6*, *SOCS1*, *MGMT* and *MLH1* genes in gastric biopsies from patients with and without *Helicobacter pylori* infection

Methylation of *IL-6*, *SOCS1*, *MGMT* and *MLH1* genes in gastric biopsies from patients with and without *Helicobacter pylori* infection

Lidiane Ferraz Sandes¹, Iasmin Souza Lima¹, Gabriel Albernaz dos Santos¹, Thiago

Magalhães da Silva², Ana Paula de Souza³, Cintia Rodrigues Marques^{1*}.

¹ Multidisciplinary Institute of Health, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, BA, Brazil

²Department of Biological Sciences, State University of Southwest Bahia, Jequié, BA, Brazil

³Department of Morphology, Piracicaba School of Dentistry, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, SP, Brazil

Corresponding author: Cintia Rodrigues Marques, Multidisciplinary Institute in Health, Anísio Teixeira Campus, Federal University of Bahia, Rua Hormindo Barros, 58, Quadra 17, Lote 58. Bairro Candeias, CEP: 45.029-094, fax: +55 77 34292700, email: cintiabiomedica@yahoo.com.br

ABSTRACT

Introduction:

Helicobacter pylori infection has been associated with epigenetic modulation of genes involved in inflammation and immune response. However, the influence of this bacterium, especially of strains containing the virulence gene *cagA*, on the methylation of genes such as *IL-6*, *SOCS1*, *MGMT* and *MLH1* in gastric tissues has not yet been fully elucidated, especially regarding possible sex-related differences.

Materials and Methods:

Gastric samples from 44 patients undergoing upper digestive endoscopy were analyzed. The presence of *H. pylori* was confirmed by rapid urease test, microbiological culture, and PCR. The *cagA* gene was detected by qPCR. Methylation of the *IL-6*, *SOCS1*, *MGMT*, and *MLH1* genes was assessed by methylation-sensitive high-resolution

melting (MS-HRM) after treatment with bisulfite. Statistical analyses considered status for *H. pylori* infection, the presence of *cagA*, and stratification by sex.

Results:

The *IL-6* gene showed variable methylation levels, with a trend towards higher mean among patients positive for *H. pylori*, although lacking statistical significance. After stratification by sex, a significant association was observed only among men: all infected individuals showed a moderate (25% - 50%) methylation profile in contrast to 40% among uninfected individuals ($p = 0.035$). Among women, in turn, no significant differences were observed. The *SOCs1* and *MLH1* genes showed no detectable methylation levels. The *MGMT* gene showed methylation in only three patients, with low levels (0-25%).

Conclusion:

H. pylori infection may be associated with differential methylation of the *IL-6* gene in males, suggesting a possible role of sex in the epigenetic regulation of the *H. pylori*-induced gastric inflammatory response. These findings highlight the importance of considering sexual biological factors in studies on epigenetic mechanisms related to *H. pylori* infection.

Keywords: DNA methylation, *interleukin-6*, *Helicobacter pylori*, MS-HRM, genes.

INTRODUCTION

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a spiral-shaped, gram-negative bacterium that colonizes the human gastric epithelium. Discovered by Warren and Marshall in 1983¹, it was later classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a Group 1 carcinogen in 1994² due to its strong association with various gastric diseases. It is considered a primary etiological agent of chronic gastritis, peptic ulcers, mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma, and gastric adenocarcinoma³. Although most infections are asymptomatic, chronic colonization can lead to serious complications in genetically predisposed individuals⁴. *H. pylori*

infection affects a significant proportion of the global population, with highly variable prevalence across regions. In developing countries such as Brazil, prevalence rates can range from 60% to 90%, especially in areas with inadequate sanitation and high household density^{5,6}. The pathogenicity of *H. pylori* is associated with virulence genes, notably the *cagA* gene (cytotoxin-associated gene A), which has been linked to greater inflammatory potential and an increased risk of gastric cancer^{7,8}. The CagA protein produced by this gene is injected into gastric epithelial cells via a type IV secretion system, where it interferes with various signaling pathways, affecting processes such as cell proliferation, apoptosis, and cell adhesion⁹. Furthermore, studies suggest that the presence of the *cagA* gene may contribute to epigenetic alterations, such as methylation of promoter regions of tumor suppressor or inflammation-regulating genes¹⁰.

H. pylori infection can trigger epigenetic modifications, particularly DNA methylation, which regulates gene expression in eukaryotic cells^{11,12}. Prolonged inflammation resulting from active infection can add methyl groups to CpG islands in promoter regions, promoting the transcriptional silencing of genes involved in the inflammatory immunological response, DNA repair, and tumor suppression^{13,14}. This process may contribute to the persistence of infection, immune dysregulation, and the progression of pre-neoplastic lesions.

Among the genes affected by these mechanisms are *IL-6*, *SOCS1*, *MGMT*, and *MLH1*. The *IL-6* gene encodes a pro-inflammatory cytokine that plays a central role in the immune response; its overexpression has been associated with gastric carcinogenesis in individuals infected with *H. pylori*¹⁵. The *SOCS1* gene acts as a negative regulator of the JAK/STAT pathway and its inactivation by methylation has been observed in infected gastric tissues, promoting a chronic inflammatory environment¹⁶. The *MGMT* and *MLH1* genes, involved in DNA repair processes can be silenced by hypermethylation during chronic infections, leading to genomic instability and mutagenesis¹⁷.

Several studies indicate that the prevalence of *H. pylori* infection tends to be higher among men, who also exhibit more severe clinical manifestations and a higher risk of developing bactéria-associated gastric diseases^{18,19}. This disparity may be attributed to hormonal, immunological, and environmental factors that influence susceptibility to infection and its progression and pathological consequences. These findings underscore the importance of considering biological sex as a relevant variable in studies investigating *H. pylori* pathogenesis, including epigenetic modifications induced by the infection.

Therefore, the present study aimed to analyze the relationship between DNA methylation of the *IL-6*, *SOCS1*, *MGMT*, and *MLH1* genes and *H. pylori* infection in gastric biopsy samples from a Brazilian population. Additionally, we investigated the association between the methylation patterns of these genes in individuals infected with *cagA*-positive versus *cagA*- negative strains. To our knowledge, this is one of the first studies to address this issue in the Latin American population, where *H. pylori* infection rates are particularly high.

MATERIALS AND METHODS

Study population

This study was approved by the Research Ethics Committee of the State University of Southwest Bahia (CEP - UESB) (Approval No. 79364617.0.0000.0055/2017). All volunteers who were recruited and eligible to participate signed an Informed Consent Form (ICF), ensuring the confidentiality of the information collected.

This study recruited 144 patients, aged 18 to 80 years and of both sexes. These individuals underwent upper gastrointestinal endoscopy at health units in the city of Vitória da Conquista, Bahia, Brasil..

The exclusion criteria were: pregnant women, breastfeeding women, individuals who had previously undergone treatment for *H. pylori* eradication, those who had used antibiotics in the

month before the examination or proton pump inhibitors within two weeks before the procedure, as well as individuals with hypertension, previous gastric surgery, or technical difficulties that prevented endoscopy.

During the endoscopic procedure, mucosa samples from the antrum and gastric body were collected for genetic analysis. Of the patients recruited, 44 (22 *H. pylori*-positive and 22 *H. pylori*-negative) were selected for methylation assays, based on the quality and concentration of the DNA samples.

Positivity criteria for *Helicobacter pylori*

The presence of *H. pylori* was initially detected using the rapid urease test and confirmed by at least one of the following methods: real-time PCR or microbiological culture. Patients were considered *H. pylori*-positive if they tested positive by PCR and/or microbiological culture, alone or in combination with a positive rapid urease test. Patients with negative results in all tests were classified as *H. pylori*-negative.

For the rapid urease test, fragments of gastric mucosa were incubated in *H. pylori* Urea Test® at 37 °C for up to 24 hours. A color change from amber to pink was considered indicative of bacterial presence. For microbiological culture, samples were grown on Brucella agar supplemented with defibrinated blood and selective antibiotics. The plates were incubated in a microaerophilic environment at 37 °C for up to 7 days.

Bacterial genotyping was performed using the TaqMan real-time PCR technique, targeting the 16S rRNA and *ureA* genes, to confirm the presence of *H. pylori* and the *cagA* gene to identify more virulent strains. Reactions were carried out on a QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (PE Applied Biosystems, USA) in a total volume of 5 µL, using specific amplification parameters for each target gene. The primers used are listed in Supplementary Table 1.

DNA extraction and quantification

Genomic DNA was extracted from gastric biopsies using the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™), following the manufacturer's protocol. The procedure involved cell lysis, RNase treatment, ethanol precipitation, and purification of the genetic material through centrifugation columns.

The quality and concentration of the extracted DNA were assessed using two complementary techniques: 1% agarose gel electrophoresis and spectrophotometry with a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA). Samples exhibiting an A260/A280 absorbance ratio between 1.8 and 2.0 were selected for subsequent analysis.

Methylation Analysis

Extracted DNA samples were treated with sodium bisulfite using the EpiTect® Bisulfite kit (Qiagen®, Valencia, CA) to convert unmethylated cytosines into uracils. Methylation levels were assessed by methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM) using the Type- it® HRM™ PCR Master Mix (Qiagen®) in a LightCycler® 480 II thermal cycler (Roche, Mannheim, Germany).

For reaction control and sample classification, standard dilutions of fully methylated DNA mixed with unmethylated DNA were prepared at the following proportions: 0%, 25%, 50%, 75%, and 100%. Sample methylation levels were classified by comparison with the standard curves, using the following categories: 0%, 0-25%, 25%, 25-50%, and 50%.

The MS-HRM technique provides a global methylation estimate across the amplified region, without enabling analysis of individual CpG sites. Data normalization was performed using the LightCycler® 480 II software, adjusting melting profiles to the reference curves^{20,21}. Primer design for the *IL-6*, *SOCS1*, *MGMT*, and *MLH1* genes followed the guidelines described by Wojdacz et al.²², Planello et al.²³, Amaral et al.²⁴, and Lima et al.²⁵, with the sequences detailed in Supplementary Table 2.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS V.23 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). The Student's *t*-test was used to compare mean methylation levels of the analyzed genes between the *H. pylori*-positive and -negative groups. Mean and standard deviation values were estimated based on the observed frequencies within each group's 0%-25% and 25%-50% methylation intervals. Associations between categorical variables were assessed using the Chi-squared test or, when appropriate, Fisher's exact test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Characterization of the Patients and Samples

Patients with active *H. pylori* infection (cases) had a mean age of 41.18 ± 13.79 years, whereas patients without infection (controls) had a mean age of 46.34 years ± 17.66 . The clinical and demographic characteristics of the participants, including gastrointestinal symptoms, number of household residents, gender distribution, and family history, are summarized in Table 1.

Methylation of the *IL-6* gene and association with *Helicobacter pylori* infection Methylation of the *IL-6* gene promoter region was assessed in patients with and without *H. pylori* infection. Among *H. pylori*-positive individuals, 6 (27.3%) exhibited low methylation levels (0-25%) and 16 (72.7%) exhibited moderate methylation levels (25-50%). In the *H. pylori*-negative group, 9 (42.9%) showed low methylation, while 12 (57.1%) showed moderate methylation.

Although the chance of presenting moderate methylation was twice as high among those infected compared to those not infected (OR = 2.00; 95% CI: 0.56-7.62), the difference between the groups was not statistically significant ($p = 0.284$), as shown in Table 2.

Association between *IL-6* methylation and the *cagA* virulence factor

Analysis of *IL-6* methylation considering the presence of the *cagA* virulence gene showed that among *cagA*-positive patients, 5 (27.8%) exhibited low methylation and 13 (72.2%) exhibited moderate methylation. Among the *cagA*-negative patients, 9 (37.5%) had low methylation and 15 (62.5%) had moderate methylation. The risk of moderate methylation in the promoter region of the *IL-6* gene was also higher among *cagA*-positive patients compared to *cagA*-negative patients (OR = 1.56; 95% CI: 0.41-5.85), although without statistical significance ($p = 0.508$), as shown in Table 2. Additionally, the mean percentagem of *IL-6* methylation per group was estimated to increase statistical power. The mean percentagem of *IL-6* methylation per group was calculated, treating the methylation intervals of 0%-25% and 25%-50% as class intervals. The estimated mean percentage of methylation was 30.68% (SD = 11.39) in the *H. pylori*-positive group and 26.78% (SD = 12.67) in the negative group ($p = 0.294$, Student's *t*-test). Regarding *cagA* status, the mean methylation values were 30.55% (SD = 11.52) for positives and 28.12% (SD = 12.36) for negatives ($p = 0.520$ by Student's *t*-test), as shown in Supplementary Table 3.

Analysis stratified by sex and age

Considering the possible influence of sex on methylation levels, the data were stratified by men and women. The distribution of *IL-6* gene methylation levels according to *H. pylori* infection and the presence of the *cagA* gene is shown in Table 3.

Among men, a statistically significant association was observed between *H. pylori* infection and the *IL-6* methylation profile: 100% of infected individuals ($n = 8$) exhibited moderate methylation, whereas in the negative group, only two individuals (40%) showed this pattern ($p = 0.035$). Among women, no significant difference was observed in the percentage of *IL-6*

methylation when comparing *H. pylori*-positive and *H. pylori*-negative individuals ($p = 0.765$). No association was observed in the analysis of *cagA* positivity status and the *IL-6* methylation profile among men ($p = 0.192$). However, 100% of *cagA*-positive individuals ($n = 6$) exhibited a moderate methylation profile compared to 57.1% of those who were *cagA*-negative. Finally, no significant association among women was found between *cagA* positivity status and the *IL-6* methylation profile ($p = 1.0$).

An additional stratified analysis by median age (≤ 40 years vs. > 40 years) revealed no significant associations (data not shown).

Analysis of the *SOCS1*, *MLH1* and *MGMT* genes

Methylation of the promoter regions of the *SOCS1* and *MLH1* genes was not detected in any of the samples analyzed, regardless of *H. pylori* infection status. The complete absence of methylation indicates a stable epigenetic pattern for these genes under the conditions evaluated. As for the *MGMT* gene, methylation was identified in only three individuals (6.82%), all with low levels (0-25%). Of these, one patient (4.55%) was positive for *H. pylori* and two (9.09%) were negative. Given methylation's low frequency and intensity, no statistical analyses were performed for this gene.

DISCUSSION

This study analyzed the methylation levels of the *IL-6*, *SOCS1*, *MGMT*, and *MLH1* genes according to *H. pylori* and *cagA* status in 44 patients by MS-HRM technique, finding a potential sex-dependent effect for *IL-6* methylation profile. To the best of our knowledge, this is the first initiative of its kind carried out in a admixed Latin American population with a high prevalence of *H. pylori* infection. Among the sociodemographic variables analyzed, a non-significant difference was observed in

the number of residents per household: while all the individuals in the control group lived in households with up to four residents (100%), 18.18% of the case group lived in households with five to seven people. This higher household density among infected individuals may reflect conditions that facilitate the transmission of *Helicobacter pylori*, as described in the literature, which identifies household overcrowding as one of the main risk factors for infection, particularly in lower socioeconomic contexts⁵.

Although studies suggest an association between *H. pylori* infection and gastrointestinal symptoms, such as abdominal pain⁶, the data from this study revealed a slightly higher frequency of abdominal pain among individuals in the control group (63.6%) compared to those infected (59.1%), suggesting that, in this case, the presence of symptoms was not directly related to the infection.

Among the genes analyzed, only *IL-6* displayed variable methylation profiles across the groups. *H. pylori* infection was associated with a higher frequency of moderate methylation (25-50%) of the *IL-6* gene, particularly in the male group, where a statistically significant difference was observed. These findings support the hypothesis that *H. pylori* infection can epigenetically modulate genes involved in gastric inflammation, as previously suggested for *IL-6* and *SOCS1* in other contexts^{15,26}.

Stratification by sex revealed that the association between *H. pylori* infection and higher levels of *IL-6* methylation was significantly observed only in men, indicating that sex-related biological factors may influence epigenetic regulation in response to infectious agents. Literature suggests that sex hormones can affect epigenetic enzymes, such as DNA methyltransferases²⁷, and that differences in gene expression patterns and immune response between sexes can modulate the epigenetic response^{28,29}. Furthermore, the higher prevalence of *H. pylori* infection in men may indicate greater exposure or susceptibility, with possible epigenetic implications. This disparity may also explain the clinical differences observed

between the sexes in the context of infection, such as greater severity or risk of disease progression in males^{18,19}.

Despite its recognized association with more severe forms of gastric inflammation, the presence of the *cagA* gene showed no significant effect on *IL-6* methylation levels in this sample. In the literature, the association of this virulence factor with the methylation profile of different genes has been controversial, with some studies report either the presence or absence of a correlation between *cagA* and specific epigenetic modifications. This variability can be attributed to factors such as the genetic diversity of the sample, the methodology used, the timing of infection, and environmental influences^{30,31}.

Regarding the other genes analyzed, the lack of methylation in the *SOCS1* and *MLH1* genes may reflect the biological characteristics of the stage of infection studied. These genes do not appear to undergo significant epigenetic modifications during gastric inflammation's early or intermediate stages. Previous studies have also indicated that methylation of *MLH1* and *SOCS1* tends to occur late, particularly in the transition to pre-neoplastic or neoplastic changes^{32,33}.

Methylation of the *MGMT* gene was observed in only three patients, all with low levels (0- 25%). This pattern suggests that methylation of this gene may occur under specific conditions or in more advanced stages of gastric carcinogenesis, since other studies have described the inactivation of *MGMT* in association with gastric tumor progression^{34,35}.

From a technical perspective, factors such as the location of the CpG sites analyzed, the use of the MS-HRM technique (which does not allow the analysis of methylation at individual CpG sites)³⁶, and the small size may have limited the detection of low-level methylation. Although adjustments were made to primer concentration and annealing temperature, other variables such as DNA quality and the standardization of controls may have also impacted the results. Moreover, most of the samples were collected from a private hospital in the city, which may reflect a specific socioeconomic profile of the study participants. This may indirectly influence

epigenetic susceptibility due to differences in environmental exposure, diet, and healthcare access. Future studies could consider using complementary techniques such as bisulfite sequencing or quantitative PCR with specific probes.

In summary, the findings of this study underscore the complexity of interactions between *H. pylori* and epigenetic mechanisms, with particular emphasis on the potential role of *IL-6* as a target for methylation regulation. Although no overall statistically significant association was found, the observed trend, particularly in men, suggests that infection may influence the methylation of genes involved in the inflammatory response. Further research with larger sample sizes and more sensitive methodologies is needed to explore these findings in greater depth and evaluate their potential as biomarkers for infection-related gastric diseases.

CONCLUSION

In conclusion, this study provides evidence that *Helicobacter pylori* infection may influence *IL-6* gene methylation levels, particularly among male patients, suggesting a sex-dependent epigenetic response. Although no statistically significant association was observed in the overall sample, a trend toward a higher frequency of moderate methylation was noted among those infected, indicating a potential epigenetic modulation associated with the infection.

The lack of methylation in the *SOCS1* and *MLH1* genes, along with the low levels detected for *MGMT*, supports the hypothesis that these epigenetic alterations are not common in the early stages of infection or may require additional conditions to be activated, such as prolonged exposure to the bacteria or genetic predisposition. Our findings contribute to a great.

Understanding the contribution of molecular mechanisms involved in the inflammatory response induced by *H. pylori* infection and in the progression of gastric diseases.

Author Contributions:

Research, L.F.S., I.S.L. and G.A.S.; Methodology, L.F.S., G.A.S. and A.P.S.; Data curation, I.S.L.; Formal analysis, T.M.S.; Resources, T.M.S.; Writing—original draft preparation, L.F.S.; Writing—review and editing, I.S.L., T.M.S. and C.R.M.; Supervision, A.P.S. and C.R.M.; Project administration, C.R.M.; Study design, C.R.M.; All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Funding:

This study was funded by the Research for the SUS Program: Shared Health Management (PPSUS), through Notice 003/2017, a partnership between the Bahia State Research Support Foundation (FAPESB), the Bahia State Health Department (SESAB), the Ministry of Health (MS) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). This work also received financial support from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), process no. 88887.749330/2022-00.

Ethical approval:

This study was conducted by the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethics Committee of the Institute of Health Sciences of the Federal University of Bahia, under protocol number 79364617.0.0000.0055/2017.

Informed consent:

All participants signed the informed consent form.

Data availability:

The data supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon

reasonable request.

Acknowledgments

We want to thank doctors Delano Brito Almeida, Manuel Antonio Lescano and Lafontaine Cunha Santana, as well as the staff of the digestive endoscopy unit and the microbiology laboratory, for their support in collecting the samples. We thank Prof. Fabricio Freire de Melo for collaborating in the *Helicobacter pylori* culture stages. We would also like to thank the Immunopharmacology and Molecular Biology Laboratory of the Institute of Health Sciences of the Federal University of Bahia for their technical support in the qPCR analyses. We acknowledge the collaboration of Amanda Coelho Freitas, Isabelle Angela Santana Santos and Deise Kelly Queiroz Santos Trindade for their help with patient recruitment, sample processing and molecular analysis. Finally, we thank the patients who agreed to participate in this study.

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest.

REFERÊNCIAS

1. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983;321(8336):1273–1275.
2. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. IARC Monographs. 1994;61:177–240.
3. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):449–490.
4. Hunt RH, Xiao SD, Megraud F, et al. *Helicobacter pylori* in developing countries. *World Gastroenterology Organisation Global Guideline*. *Gut*. 2011;60(9):1189–1204.
5. Curado MP, de Oliveira MM, Silva DRM, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52:e20190157. doi:10.1590/0037-8682-0157-2019
6. Coelho LGV, Maguinilk I, Zaterka S, et al. *Helicobacter pylori* infection: update of the IV Brazilian Consensus Conference. *Arq Gastroenterol*. 2018;55(2):97-101. doi:10.1590/S0004-2803.201800000-34

7. Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis. *Cell Host Microbe.* 2014;15(3):306–316.
8. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(11):629–641.
9. Hatakeyama M. Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2017;93(4):196–219.
10. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, et al. High levels of aberrant DNA methylation in *H. pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res.* 2006;12(3):989–995.
11. Ushijima T, Hattori N. Molecular pathways: involvement of *Helicobacter pylori*-triggered inflammation in the formation of an epigenetic field defect, and its usefulness as cancer risk and exposure markers. *Clin Cancer Res.* 2012;18(4):923–929. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2011
12. Muhammad JS, Eladl MA, Khoder G. *Helicobacter pylori*-induced DNA methylation as an epigenetic modulator of gastric cancer: recent outcomes and future direction. *Pathogens.* 2019;8(1):23.
13. Shen S, Chen X, Li H, et al. *MLH1* promoter methylation and prediction/prognosis of gastric cancer: a systematic review and meta and bioinformatic analysis. *Cancer.* 2018;9:1932–1942.
14. Huang FY, Chan AO, Lo RC, et al. *Helicobacter pylori* induces promoter methylation of E-cadherin via interleukin-1 β activation of nitric oxide production in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2012;18(18):4974–4983.
15. Santos MP, Pereira JN, Delabio RW, et al. Increased expression of interleukin-6 gene in gastritis and gastric cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2021;54(7):e10687. Published 2021 May 17. doi:10.1590/1414-431X2020e10687
16. Jan I, Rather RA, Mushtaq I, et al. *Helicobacter pylori* subdues cytokine signaling to alter mucosal inflammation via hypermethylation of suppressor of cytokine signaling 1 gene during gastric carcinogenesis. *Front Oncol.* 2021;10:604747.
17. Alvarez MC, Santos JC, Maniezzo N, et al. MGMT and MLH1 methylation in *Helicobacter pylori*-infected children and adults. *World J Gastroenterol.* 2013;19(20):3043–3051. doi:10.3748/wjg.v19.i20.3043
18. de Martel C, Parsonnet J. *Helicobacter pylori* infection and gender: a meta-analysis of population-based prevalence surveys. *Dig Dis Sci.* 2006;51(12):2292–2301.

19. Ibrahim A, Morais S, Ferro A, Lunet N, Peleteiro B. Sex-differences in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in pediatric and adult populations: systematic review and meta-analysis of 244 studies. *Sci Rep.* 2017;7:14778.
20. Reed GH, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics.* 2007;8(6):597–608.
21. Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(6):e41.
22. Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc.* 2008;3(12):1903–1908.
23. Planello AC, Singhania R, Kron KJ, et al. Pre-neoplastic epigenetic disruption of transcriptional enhancers in chronic inflammation. *Oncotarget.* 2016;7(13):15772–15786. doi:10.18632/oncotarget.7513.
24. Amaral GCLS, Planello AC, Borgato G, et al. 5-Aza-CdR promotes partial *MGMT* demethylation and modifies expression of different genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2019;127(5):424–433.
25. Lima DG, Amaral GCLS, Planello AC, Borgato GB, Guimarães GN, Souza AP. Combined therapy with cisplatin and 5-AZA-2CdR modifies methylation and expression of DNA repair genes in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2022;15(2):39-49.
26. To KF, Chan MW, Leung WK, et al. Constitutional activation of IL-6-mediated JAK/STAT pathway through hypermethylation of SOCS-1 in human gastric cancer cell line. *Br J Cancer.* 2004;91(7):1335-1341. doi:10.1038/sj.bjc.6602133
27. Klinge CM. Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *J Cell Biochem.* 2008;105(6):1342–1351. doi:10.1002/jcb.21936
28. Naumova AK, Al Tuwaijri A, Morin A, et al. Sex- and age-dependent DNA methylation at the 17q12-q21 locus associated with childhood asthma. *Hum Genet.* 2013;132(7):811–822. doi:10.1007/s00439-013-1299-9
29. Spiers H, Hannon E, Schalkwyk LC, et al. Methylomic trajectories across human fetal brain development. *Genome Res.* 2015;25(3):338–352. doi:10.1101/gr.180273.114
30. Park JY, Forman D, Waskito LA, Yamaoka Y, Crabtree JE. Epidemiology of Helicobacter pylori and CagA-positive infections and global variations in gastric cancer. *Toxins (Basel).* 2018;10(4):163. doi:10.3390/toxins10040163

31. Li Y, Chang X, Zhang J, et al. *Helicobacter pylori* CagA promotes epithelial mesenchymal transition in gastric carcinogenesis via triggering oncogenic YAP pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;38(1):115.
32. Hu G, Qin L, Zhang X, Ye G, Huang T. Epigenetic silencing of the MLH1 promoter in relation to the development of gastric cancer and its use as a biomarker for patients with microsatellite instability: a systematic analysis. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45(1):148–162.
33. Oshima Y, Nakayama H, Ito R, et al. Epigenetic inactivation of SOCS-1 by CpG island hypermethylation in human gastric carcinoma. *Int J Cancer.* 2004;112(6):1003–1009. doi:10.1002/ijc.20508.
34. Yu D, Cao T, Han YD, Huang FS. Hypermethylation of MGMT gene promoter in gastric cancer. *OncoTargets Ther.* 2016;9:6049-6057. doi:10.2147/OTT.S114052
35. Zhang Z, Zhang L, Wang H, et al. Promoter hypermethylation of MGMT gene may contribute to the pathogenesis of gastric cancer: a PRISMA-compliant meta-analysis. *OncoTargets Ther.* 2017;10:573-582. doi:10.2147/OTT.S123283
36. Pajares MJ, Palanca-Ballester C, Urtasun R, Alemany-Cosme E, Lahoz A, Sandoval J. Methods for analysis of specific DNA methylation status. *Epigenomics.* 2020;12(13):1095-1113. doi:10.2217/epi-2020-0079

TABLES

Table 1. Sociodemographic characteristics and their relationship with *H. pylori* infection among study participants.

Sociodemographic characteristics	<i>H. pylori</i> Status			P value
	Total (%) n=44	Control (%) n=22	Cases (%) n=22	
Age (M, SD)	43,77 (15,88)	46,34 (17,66)	41,18 (13,79)	0,1399
Gender, n (%)				
Male	14 (31,82)	6 (27,27)	8 (36,36)	
Female	30 (68,18)	16 (72,73)	14 (63,64)	0,7470
Ethnicity, n (%)				
mixed race	25 (56,82)	11 (50,0)	14 (63,64)	
White	13 (29,55)	8 (36,36)	5 (22,73)	
Black	5 (11,36)	3 (13,64)	2 (9,09)	0,5098
Asian	1 (2,27)	0 (0,0)	1 (4,55)	
Water source in the household, n (%)				
Public network	39 (88,64)	19 (86,36)	20 (90,91)	1,0

Sociodemographic characteristics	<i>H. pylori</i> Status			P value
	Total (%) n=44	Control (%) n=22	Cases (%) n=22	
Well/stream/Other	5 (11,36)	3 (13,64)	2 (9,09)	
Basic sanitation, n (%)				
Sewage system	38 (86,36)	18 (81,82)	20 (90,91)	
Septic tank/alternative drainage	6 (13,64)	4 (18,18)	2 (9,09)	0,6640
Number of residents in the household, n (%)				
1-4	40 (90,91)	22 (100,0)	18 (81,82)	
5-7	4 (9,09)	0 (0,0)	4 (18,18)	0,1078
Presence of abdominal pain, n (%)				
Yes	27 (61,36)	14 (63,64)	13 (59,09)	
No	17 (38,64)	8 (36,36)	9 (40,91)	1,0
The most common location of pain	Epigastric	Epigastric	Epigastric	

Family history of gastrointestinal diseases, n (%)				
Yes	24 (54,55)	14 (63,64)	10 (45,45)	
No	20 (45,45)	8 (36,36)	12 (54,55)	0,3640

Table 2 - Association between *IL-6* gene methylation levels, *H. pylori* infection and presence of the *cagA* virulence factor.

Groups	<i>IL-6</i> Methylation		OR (95% CI)	Pvalue
	0% - 25%	25% - 50%		
<i>H. pylori</i> , n (%)				
Negative	9 (42.9)	12 (57.1)	1	
Positive	6 (27.3)	16 (72.7)	2.0 (0.56 - 7.62)	0.284
<i>cagA</i> , n (%)				
Negative	9 (37.5)	15 (62.5)	1	
Positive	5 (27.8)	13 (72.2)	1.56 (0.41 - 5.85)	0.508

Table 3 - Association between *IL-6* methylation, *H. pylori* infection and presence of the virulence factor *cagA* and stratified by sex.

Groups	<i>IL-6</i> Methylation		OR (95% CI)	Pvalue
	0% - 25%	25% - 50%		
Men				
<i>H. pylori</i> n (%)				
Negative	3 (60.0)	2 (40.0)	1	
Positive	0 (0.0)	8 (100.0)	-	0.035
<i>cagA</i> , n (%)				
Negative	3 (42.9)	4 (57.1)	1	
Positive	0 (0.0)	6 (100.0)	-	0.192
Women				
<i>H. pylori</i> , n (%)				
Negative	6 (37.5)	10 (62.5)	1	
Positive	6 (42.9)	8 (57.1)	0.80 (0.18 - 3.46)	0.765
<i>cagA</i> , n (%)				
Negative	6 (35.3)	11 (64.7)	1	
Positive	5 (41.7)	7 (58.3)	0.76 (0.16 - 3.48)	1.0

Data in bold are statistically significant.

5. SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table 1. Specific primers used for *H. pylori* genotyping by real-time PCR (qPCR).

Gene	Primer	Sequence (5' – 3')	PCR (bp)
<i>urea</i>	F	GAAGAAGGAGAGCTGGTAAA	116
	R	GGTATGCACGGTTACGAGTT	
<i>16S rRNA</i>	F	GGACACACTGGAACTGAGAC	162
	R	CCTAAAACCTTCATCCTCCAC	
<i>cagA</i>	F	ACGCTCTGTCTTCTGTGTTAAT	146
	R	CACATTGTTACCTTGTGGTC	

F = forward primer; R = reverse primer; bp = base pairs

Supplementary Table 2. Sequence of specific primers used for methylation analysis by MS-HRM.

Genes	Primer 5' – 3'	Sequence	CpG	Amplicon size (pb)
<i>IL-6</i>	F	GGCGATGGGTTGAAGGG	6	120
	R	CGTTAACCTCAAATCTACAATAC		
<i>SOCS-1</i>	F	TCGCGGTTGTTATTAGGTGAAAG	12	140
	R	CGAACCCGTAACACACCTTCCTA		
<i>MGMT</i>	F	GCGTTCGGATATGTTGGGATAGT	12	110
	R	CCTACAAAACCACCTCGAAACTACCA		
<i>MHL1</i>	F	AGTTTTAAAAACGAATTAATAGGAAGAG	5	81
	R	ACTACCCGCTACCTAAAAAAATATAC		

F = forward primer; R = reverse primer; bp = base pairs; CpG = number of CpG sites in the amplicon.

Supplementary Table 3: Comparison of mean methylation levels for *IL-6* according to *H. pylori* infection and the presence of the virulence factor *cagA*.

Groups	% IL-6 Methylation, mean (SD)	Pvalue
<i>H. pylori</i>		
Negative	26.78 (12.67)	0.294
Positive	30.68 (11.39)	
<i>cagA</i>		
Negative	28.12 (12.36)	0.520
Positive	30.55 (11.52)	

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo experimental analisou a relação entre a infecção por *Helicobacter pylori* e os padrões de metilação dos genes *IL6*, *SOCS1*, *MGMT* e *MLH1* em amostras de biópsia gástrica de uma população brasileira, considerando a influência da presença do gene *cagA*, marcador de virulência da bactéria. Os resultados sugeriram que a infecção causada pela bactéria pode influenciar a metilação do gene *IL6*, especialmente entre os homens, indicando uma possível resposta epigenética relacionada ao sexo. Embora não tenham sido observadas associações significativas com a presença da cepa *cagA*-positiva, notou-se uma tendência à metilação moderada em indivíduos infectados. A ausência de metilação nos genes *SOCS1* e *MLH1*, bem como os baixos níveis detectados para *MGMT*, indicam que essas alterações epigenéticas podem não ser frequentes nas fases iniciais da infecção ou dependem de fatores adicionais, como predisposição genética ou exposição prolongada. Ao abordar uma população latino-americana, onde as taxas de infecção por *H. pylori* são elevadas, este trabalho contribui com dados pioneiros, reforçando a relevância da investigação epigenética como ferramenta complementar na compreensão da fisiopatologia gástrica e no desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas mais precisas.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB

Autorizada pelo Decreto Estadual nº 7344 de 27.05.98

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP / UESB

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa "Validação de testes sorológicos para o diagnóstico de infecção por *Helicobacter pylori* e fatores de virulência a ela associados nas regiões sul e sudoeste da Bahia". Eu, Thiago Magalhães da Silva, professor adjunto do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Jequié, sou o pesquisador responsável por esse projeto. Nesse estudo pretendemos avaliar se alguns exames de sangue podem ser usados de forma confiável para descobrir a presença da bactéria *H. pylori* no estômago dos pacientes em nossa região. Além disso, pretendemos investigar também se esses exames de sangue são adequados para descobrir algumas formas mais "perigosas" dessa bactéria entre os indivíduos da nossa população.

O motivo que nos leva a estudar esse assunto é que essa bactéria pode causar doenças graves, como gastrite, úlcera e câncer de estômago. Dessa forma, testar se esses exames de sangue são confiáveis é importante tanto para facilitar o trabalho dos médicos, dando mais uma opção de exame para descobrir se as pessoas têm ou não a bactéria, quanto para realizar estudos com um número maior de pessoas no futuro, já que os exames de sangue são mais simples e baratos do que a endoscopia (exame do estômago que o senhor(a) está prestes a realizar).

Para este estudo adotaremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): antes da endoscopia o senhor(a) irá responder a um questionário e em seguida será feita uma coleta de sangue do braço do senhor(a), na mesma quantidade que é usada para fazer um exame de sangue comum. Além disso, durante a endoscopia o médico irá pinçar dois pedacinhos a mais do seu estômago, que serão utilizados para descobrir a presença da bactéria através de exames feitos no laboratório. Esses exames (cultura da bactéria e exame de DNA da bactéria) são os mais poderosos para determinar se o indivíduo tem ou não a *H. pylori*, sendo portanto ideais para comparar com os exames de sangue que pretendemos testar. Além disso, caso a amostra de sangue coletada para realizar os exames desse estudo não seja toda utilizada, gostaríamos de pedir sua autorização para que ela possa ser guardada para ser utilizada no futuro na realização de outros exames que porventura sejam necessários para maior esclarecimento sobre as doenças causadas pela bactéria *H. pylori*.

Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido(a) em todas as formas que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. Você poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não causará qualquer punição ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo pesquisador que irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação. Esse estudo apresenta riscos eventuais de dor ou desconforto, os quais tentarão ser minimizados o máximo possível, já que tanto a coleta de sangue quanto a endoscopia serão feitas em local adequado e por profissionais treinados e capacitados. Também com relação ao questionário que será aplicado no momento da entrevista, o senhor(a) tem assegurado o direito de se recusar a responder quaisquer perguntas que possam lhe causar desconforto ou constrangimento, sem sofrer nenhum prejuízo por conta disso. Apesar disso, você tem assegurado o direito a compensação ou indenização no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa. O principal benefício desse estudo é a possibilidade de tornar disponível para a nossa população exames de sangue mais simples e baratos para descobrir a presença da bactéria *H. pylori*, como também de certos tipos mais "perigosos" dessa bactéria. Além disso, ofereceremos aos voluntários que concordarem em



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB

Autorizada pelo Decreto Estadual nº 7344 de 27.05.98

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP / UESB

participar do estudo a realização de exames de laboratório mais poderosos para detectar a bactéria, que por serem mais difíceis de realizar e também mais caros não são feitos de rotina. Os resultados estarão à sua disposição quando finalizados. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

Eu, _____ fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e posso modificar a decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Jequié, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do(a) participante

Impressão digital (se for o caso)

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: THIAGO MAGALHÃES DA SILVA
ENDEREÇO: RUA JOSÉ MOREIRA SOBRINHO, S/N - UESB
FONE: (73) 3528-9744 / E-MAIL: thiago@uesb.edu.br

CEP/UESB- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
RUA JOSÉ MOREIRA SOBRINHO, S/N - UESB



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB

Autorizada pelo Decreto Estadual nº 7344 de 27.05.98

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP / UESB

JEQUIÉ (BA) - CEP: 45206-190

FONE: (73) 3528-9727 / E-MAIL: cepuesb.jq@gmail.com

Pergunta	Resposta	Assinatura
Aceita que o sangue possa ser guardado, sujeito ao seu consentimento para novos exames além do acima especificado.	() Sim () Não	

ANEXO B – Questionário Socioeconômico



PROJETO: "Validação de testes sorológicos para o diagnóstico de infecção por Helicobacter pylori e fatores de virulência a ele associados nas regiões sul e sudoeste da Bahia".

Questionário Nº _____ Data: _____

Entrevistador: _____

Local da entrevista: _____

Antes de iniciar a entrevista, checar previamente se o paciente atende aos seguintes critérios (em caso de resposta afirmativa a qualquer um dos critérios, não recrutar):

- Paciente gestante ou em lactação Sim Não
- História de cirurgia gástrica Sim Não
- Submetido a tratamento para erradicação do *H. pylori* há menos de 6 meses Sim Não
- Fez uso de antibióticos há menos de 30 dias Sim Não
- Fez uso de IBP há menos de 15 dias Sim Não

Dados do Entrevistado:

Nome completo: _____

Idade: _____ anos Data de nascimento: _____

Sexo: Masculino Feminino

Raça/Cor autodeclarada*: Branca Parda Preta Amarela (Asiática) Indígena

Raça/Cor classificada pelo entrevistador: Branca Parda Preta Amarela (Asiática) Indígena

Estado civil: Solteiro Casado União consensual Outros _____

*Para menores de 12 anos utilizar a declaração feita pelos pais ou responsáveis.

Filiação:

Nome de mãe: _____

Naturalidade: _____

Grau de Escolaridade do voluntário:

- | | | |
|---|---|--|
| <input type="checkbox"/> Analfabeto | <input type="checkbox"/> 1º grau incompleto | <input type="checkbox"/> 2º grau completo |
| <input type="checkbox"/> Assina apenas o nome | <input type="checkbox"/> 1º grau completo | <input type="checkbox"/> Superior incompleto |
| <input type="checkbox"/> Alfabetizado | <input type="checkbox"/> 2º grau incompleto | <input type="checkbox"/> Superior completo |
| <input type="checkbox"/> Pós-graduado | | |

Grau de Escolaridade da mãe (para voluntários <18 anos):

- | | | |
|---|---|--|
| <input type="checkbox"/> Analfabeto | <input type="checkbox"/> 1º grau incompleto | <input type="checkbox"/> 2º grau completo |
| <input type="checkbox"/> Assina apenas o nome | <input type="checkbox"/> 1º grau completo | <input type="checkbox"/> Superior incompleto |
| <input type="checkbox"/> Alfabetizado | <input type="checkbox"/> 2º grau incompleto | <input type="checkbox"/> Superior completo |
| <input type="checkbox"/> Pós-graduado | | |

Ocupação atual: _____ Aposentado Desempregado

Renda da família:

- | | | |
|--|--|--|
| <input type="checkbox"/> <R\$ 998,00 | <input type="checkbox"/> R\$ 998,00 a R\$ 1.996,00 | <input type="checkbox"/> >R\$ 1.996,00,00 a R\$ 2.994,00 |
| <input type="checkbox"/> >R\$ 2.994,00,00 a R\$ 3.992,00 | <input type="checkbox"/> >R\$ 3.992,00,00 a R\$ 4.990,00 | <input type="checkbox"/> >R\$ 4.990,00 |

Tipo de Habitação:

- Casa Apartamento Barraco Quarto (1 cômodo e sempre de tijolos. Do contrário, assinalar barraco)

De onde vem a água usada na habitação?

- Água da Embasa/Emasa (incluindo "gato") com canalização interna
 Água da Embasa/Emasa (incluindo "gato") com ponto exclusivo fora da residência (pode ser do vizinho)
 Chafariz
 Outros _____ (especificar)

Para onde vão os dejetos sanitários (fezes e urina) da sua habitação?

- Rede de esgoto
 Rede de drenagem
 Escadaria drenante
 Fossa séptica [fechada (esvaziada periodicamente) ou seguida de sumidouro]
 Fossa séptica [fossa rudimentar, lançamento na rua ou na rede de drenagem]
 Buraco escavado
 Canal ou vala a céu aberto na rua, riacho, rio
 Não sabe / não respondeu

Quantos cômodos tem a habitação? (Excluir banheiro e varandas) R: _____

Quantos cômodos são usados para dormitório? R: _____

Quantos pessoas moram na residência? R: _____

Quantos crianças moram na residência? R: _____

No caso de voluntários <12 anos:

Número de crianças mais jovens que o voluntário _____

Número de crianças mais velhas que o voluntário _____

A rua onde fica a residência é pavimentada?

- Sim Não

Há quanto tempo mora na residência?

- Há menos de 6 meses De 6 meses até menos de 2 anos De 2 anos até menos de 5 anos

- Há mais de 5 anos

Frequentou creche alguma vez na vida? (Para crianças <12 anos)

- Sim Não

Possui plano de saúde?

Sim Não

Fumante/Ex-fumante: Sim Não

Se sim: Quantidade /Dia

Por quanto tempo fuma/fumou (em anos)? _____

Quantos drinques (latinha de cerveja, taça de vinho ou dose de bebida destilada), em média, você tomou por semana no último ano?

Nenhum 1-2 3-6 7-10 Mais de 10
Dor abdominal?

Sim Não

Localização da dor:

Epigástrica Perumbilical

Apresenta dor abdominal tipo queimação?

Sim Não

Apresenta dor abdominal que te faz despertar à noite?

Sim Não

Apresenta plenitude pós-prandial (sensação de estômago cheio ou pesado após refeições)?

Sim Não

Apresenta flatulência (gases)?

Sim Não

Apresentou náuseas (enjoos) nos últimos meses?

Sim Não

Apresentou vômitos nos últimos meses?

Sim Não

Na família existe alguém que já apresentou problemas ou doenças relacionadas ao estômago ou intestino (exemplo, diarreias constantes, perda de peso, problemas com ingestão de glúten, sangue nas fezes, cólicas constantes)?

Sim Não